

УДК 612.753:615.03](045)

Регенерация кости на фоне локального воздействия инсулиноподобного фактора роста-1 (экспериментальное исследование)

А. А. Тихоненко¹, Н. В. Дедух², Л. М. Бенгус², С. А. Хмызов²

¹Клиника «Genesis», Симферополь. Украина

²ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины», Харьков

The experimental study carried out on 30 white laboratory rats. It was found that double local administration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) stimulates reparative osteogenesis in bone defect modeled in the distal metaphysis of the femur. Thus, on early observation stage (3rd day) in the defect area of treated animals the density of undifferentiated stromal cells and fibroblasts in the area of restructuring blood clot was increased. At the same time in the control group of rats fibroblasts were revealed only in granulation tissue located in intertrabecular spaces of cancellous bone. During electron microscopic analysis it was shown that on 3th day in rats treated with IGF-1 the process of bone wound cleansing from products of fibrin decay was more active as compared with control animals. This confirms presence of numerous functional active macrophages in blood clot. It is proved that on the 5th day after the defect creation there were fibroblasts of high functional activity and preosteoblasts in the area of bone regenerate in rats treated with IGF-1. After 7 days the osteoblasts density was increased in the experimental series compared with the control one. There was discovered an improvement the quality of bone tissue in adjacent area due to extrafocal deposition of bone in lytic areas, cracks and crevices. On the 14th and 21st day it was revealed an increased area of bone in defects of the main animal experimental series comparing to control one at 19.86 % and 24.78 % respectively.

У результаті експериментальних досліджень, проведених на 30 білих лабораторних щурах, встановлено, що дворазове локальне введення інсулиноподібного фактору росту-1 (ІФР-1) стимулює репаративний остеогенез у кістковому дефекті, який моделювали в дистальному метафізі стегнової кістки. Так, на ранніх термінах спостереження (3-я доба) у ділянці дефекту пролікованих тварин була підвищена щільність малодиференційованих стромальних клітин і фібробластів у зоні перебудови кров'яного згустку. Водночас у контрольних щурів фібробласти виявлені лише в грануляційній тканині, розташованій у міжтрабекулярних просторах губчастої кістки. Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що на 3-ю добу спостереження в регенераті щурів, пролікованих ІФР-1, активніше, ніж в контрольних, перебігали процеси очищення кісткової рани від продуктів деструкції фібрину. На це вказує наявність у кров'яному згустку численних функціонально активних макрофагів зі значною кількістю вторинних лізосом та фагосом у цитоплазмі. Доведено, що на 5-у добу після виконання дефекту в ділянці кісткового регенерату щурів, пролікованих ІФР-1, розташовувалися фібробласти в стані високої функціональної активності та преостеобласти. На 7-у добу щільність остеобластів була підвищеною в дослідній серії порівняно з контрольною. Виявлено підвищення якості прилеглої до ділянки дефекту кісткової тканини через апозіційне нашарування кістки в ділянках лізису, тріщинах та щілинах. У процесі проведення морфометричного аналізу встановлено, що на 14 та 21-у добу площа кісткової тканини в дефектах тварин дослідної серії була підвищеною порівняно з контролем на 19,86 та 24,78 % відповідно.

Ключевые слова: инсулиноподобный фактор роста-1, регенерация кости, экспериментальная модель

Введение

Проблема оптимизации и стимуляции регенерации кости в ортопедии и травматологии приобретает особую актуальность при наличии больших по размерам и сложных костных дефектов. Среди многочисленных факторов роста обращает на себя внимание инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1), являющийся одним из важнейших гормональных посредников и регуляторов гормона роста. ИФР-1 может действовать на костную ткань как системно, поступая к органам-мишеням из крови, так и локально — на аутокринно/паракринном или тканевом уровнях [1]. ИФР-1 регулирует процессы роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма, в частности костной ткани. В циркулирующей крови ИФР существуют в виде комплекса со связующими белками, определяющими биодоступность и регулирующими взаимодействие между ИФР и их рецепторами [1].

Гены ИФР-1 экспрессируются клетками скелетных тканей. При повреждении кости ИФР-1 обнаруживают в области заживления перелома. Доказано, что ИФР-1 повышает дифференцировку остеобластов и костеобразование [2], стимулирует биосинтез коллагена I типа и ускоряет формирование костного матрикса [3–5], способствует сохранности структуры коллагена в микроокружении кости за счет угнетения в остеобластах экспрессии интерстициальной коллагеназы [4, 5]. Суперэкспрессия ИФР-1 в остеобластах мышей под влиянием остеокальцина приводит к повышению минеральной плотности компактной и губчатой кости, а также объема и толщины костных трабекул [1, 6]. Подавление биосинтеза ИФР-1 коррелирует с угнетением дифференциации остеобластов [7]. Кроме этого, ИФР-1 опосредует селективное анаболическое действие паратиреоидного гормона и тироксина на костную ткань *in vitro* и *in vivo* [2].

Однако следует отметить, что большинство существующих работ касаются влияния ИФР-1 на процессы роста, развития и метаболизма костной ткани с углубленным изучением механизма его действия на молекулярном уровне. Вопросы же действия ИФР-1 непосредственно на регенерацию костной ткани на тканевом уровне, особенно на ранних стадиях заживления дефекта, освещены недостаточно, что и обусловило необходимость проведения данного исследования.

Цель работы: на основе морфологических исследований изучить особенности репаративного процесса в области дефекта кости, воспроизведенного у крыс, в условиях локального воздействия ИФР-1.

Материал и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 30 белых лабораторных крысах (возраст 2 мес., живая масса (150 ± 15) г) популяции экспериментально-биологической клиники ИППС им. проф. М. И. Ситенко НАМН. Работу проводили при соблюдении всех правил гуманного отношения к экспериментальным животным согласно «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других целях» и закону Украины [8, 9]. Крысы находились под постоянным ветеринарным наблюдением, их содержали на стандартном пищевом рационе.

Для морфологических исследований проведено две серии экспериментов:

1-я — моделирование дырчатого дефекта в области дистального метафиза бедренной кости (контрольная серия);

2-я — моделирование дырчатого дефекта в области дистального метафиза бедренной кости и лечение ИФР-1 (опытная серия).

Контрольная и опытная группы включали по 15 животных.

Животным опытной серии на 1 и 3-и сутки после операции вводили 0,08 мкг ИФР-1 в область дефекта. Для морфологического исследования животные были выведены из опыта на 3, 5, 7, 14 и 21-е сутки.

Техника хирургического вмешательства при моделировании дефекта в кости

Хирургическое вмешательство выполняли под общим внутримышечным наркозом (аминазин — 10 мг/кг, кетамин — 50 мг/кг) в условиях асептики. Для моделирования в бедренной кости дефекта латеральным доступом в области дистального метафиза, обнажая кость, стоматологическим бором (диаметром 2 мм) выполняли транскортикальный метафизарный дефект на глубину 2 мм. Рану послойно ушивали. В послеоперационном периоде животные находились под постоянным наблюдением. Крыс выводили из эксперимента путем ингаляционной передозировки эфира для наркоза.

Методы исследования материала

В работе использованы морфологические, поляризационно-оптические и электронно-микроскопические методы для оценки течения репаративного процесса, а также выполнена морфометрия площадей новообразованной костной ткани в дефекте.

Для морфологических исследований выделяли фрагменты бедренных костей крыс с областью воспроизведенного дефекта и фиксировали их в 10 % растворе нейтрального формалина. После промывки образцы декальцинировали в растворе 4 % азотной кислоты, обезвоживали в спиртах возрастающей

крепости и заключали в целлоидин [10]. Гистологические срезы толщиной 7–9 мкм изготавливали на санном микротоме «Reichert». После окраски железным гематоксилином по Вейгерту докрашивали эозином, а также пикрофуксином по Ван-Гизон. Окрашенные срезы анализировали в микроскопе «Axiostar Plus» (Carl Zeiss). Фотографировали препараты с помощью цифровой фотокамеры Canon EOS-300D.

Для электронно-микроскопических исследований фрагменты ткани размером 1 мм³ из области дефекта метафиза бедренной кости префиксировали в 5 % параформальдегид-глутаральдегидном фиксаторе Карновского. Постфиксацию проводили в 1 % растворе четырехоксида осмия. Материал дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации и ацетоне, заключали в смесь эпона с аралдитом [11]. Ультратонкие срезы толщиной 50–70 нм контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Reynolds [12]. Материал исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе ЭМВ-100БР. Цифровые негативы электронограмм изготавливали с помощью фотокамеры Canon EOS-300D.

Морфометрические исследования регенерата выполняли для определения площади формирующейся в дефекте костной ткани на 14 и 21-е сутки. Для этого на центральном срезе области дефекта оценивали площадь новообразованной костной ткани с помощью квадратно-сетчатой окулярной вставки (на площади 19600 мкм²) по методике Г. Г. Автандилова [13], подсчитывая количество точек пересечений квадратов, которые попадали на новообразованную костную ткань.

Статистические методы. Полученные цифровые показатели обработаны методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента (прикладной пакет STATISTICA 5.11 for Windows). Расчеты проведены на персональном компьютере. Уровень достоверности принят 95 %.

Результаты и их обсуждение

В области травматического повреждения на 3-и сутки у *нелеченных животных* выявлен кровяной сгусток с признаками реорганизации в краевых участках, прилежащих к материнской кости. В кровяном сгустке располагались нити фибрина, области гомогенизации гематомы, сотоподобные полости и клетки типа мононуклеарных лейкоцитов, а также единичные макрофаги, лимфоциты и плазматические клетки (рис. 1).

В глубоких отделах дефекта в области губчатой кости в межтрабекулярных пространствах, открытых к зоне дефекта, формировались поля незре-

лой грануляционной ткани. В ней располагались единичные тонкие волокна, не имеющие четкой ориентации и не формирующие пучки. В клеточном составе грануляционной ткани преобладали малодифференцированные соединительнотканые клетки небольшого размера с округлым ядром, окруженным узким ободком цитоплазмы, отмечены единичные фибробласты и лимфоциты. Выявлены малодифференцированные фибробластоподобные клетки — так называемые звездчатые фибробласты.

В грануляционной ткани обнаружены единичные кровеносные сосуды с расширенными просветами и сосудистые полости — синусоиды, высланные клетками фибробластического дифферона.

На участках в области межтрабекулярных пространств губчатой кости отмечены очаги некроза костного мозга как отражение посттравматического повреждения.

В надкостнице материнской кости, прилежащей к области травматического повреждения, располагались единичные фибробласты со слабоокрашенными лизированными ядрами. На расстоянии от повреждения надкостница была утолщена, состояла из набухших пучков коллагеновых волокон, между которыми располагались узкие лентовидные пролифераты из фибробластов. Среди последних обнаружены клетки крупных размеров с гипохромным ядром и базофильной цитоплазмой, что свидетельствует об активизации в них биосинтеза белков. Надкостница над областью травматического повреждения отсутствовала. Прилежащая к дефекту материнская кость не содержала остеоцитов, в ней располагались пустые лакуны или лакуны с некротическими клетками. В сосудистых каналах находились распадающиеся эритроциты.

На 3-и сутки у *леченых животных* в области травматического повреждения кости обнаружены нити фибрина, небольшие очаги нерассосавшегося кровяного сгустка, перемежающиеся с незрелой грануляционной тканью, территории которой значительно превышали таковые в контрольной группе животных. Грануляционная ткань в основном была представлена фибробластами различной степени зрелости, макрофагами, единичными плазматическими клетками, лимфоцитами и малодифференцированными соединительноткаными клетками (рис. 2).

Электронно-микроскопический анализ позволил выявить в зоне дефекта леченных животных множество макрофагов в состоянии высокой функциональной активности. Были обнаружены клетки с признаками активизации фагоцитоза продуктов деструкции. Макрофаги содержали в цитоплазме

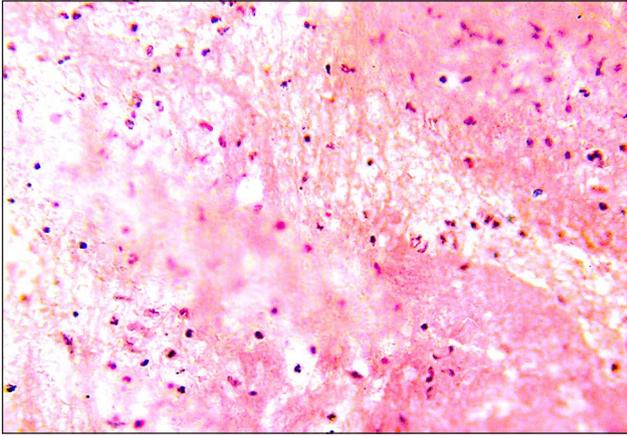


Рис. 1. Фото гистопрепарата. Кровяной сгусток в области травматического повреждения. Нити фибрина, области гомогенизации гематомы, сотоподобные полости, клетки типа мононуклеарных лейкоцитов, единичные макрофаги. Контрольная серия. 3-и сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 400

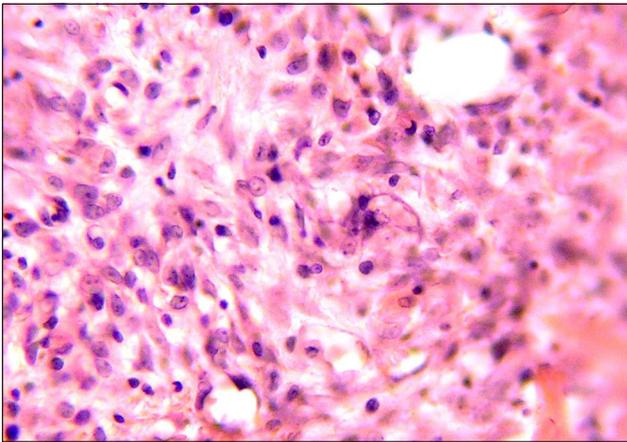


Рис. 2. Фото гистопрепарата. Незрелая грануляционная ткань. Фибробласты. Мало дифференцированные соединительнотканые клетки, единичные лимфоциты, макрофаги и плазматические клетки. Опытная серия. 3-и сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 400

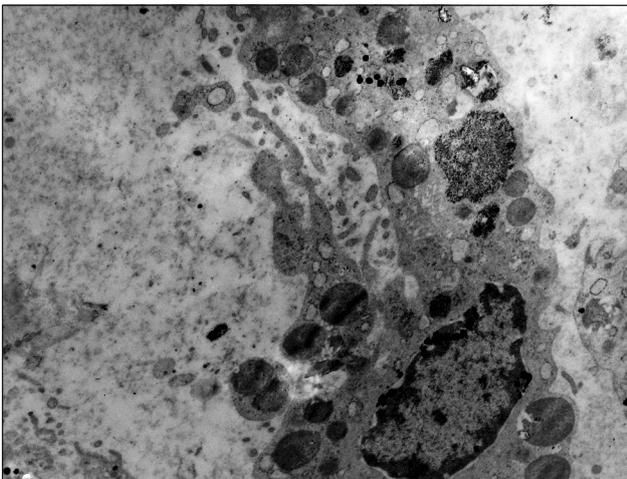


Рис. 3. Фото гистопрепарата. Функционально активный макрофаг с многочисленными фаголизосомами, вторичными лизосомами и мультивезикулярными тельцами в цитоплазме. Множество цитоплазматических отростков — псевдоподий макрофага. Опытная серия. 3-и сутки. Контрастировано по Рейнольдсу. Ув. 8000

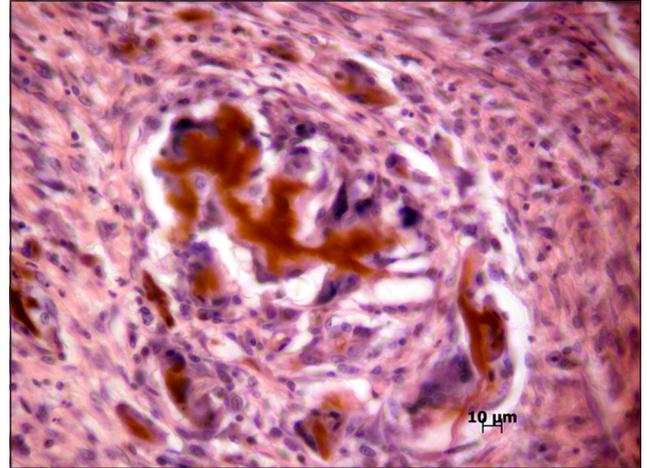


Рис. 4. Фото гистопрепарата. Грануляционная и фиброретикулярная ткань в области дефекта. Остатки кровяного сгустка. Контрольная серия. 5-е сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 400

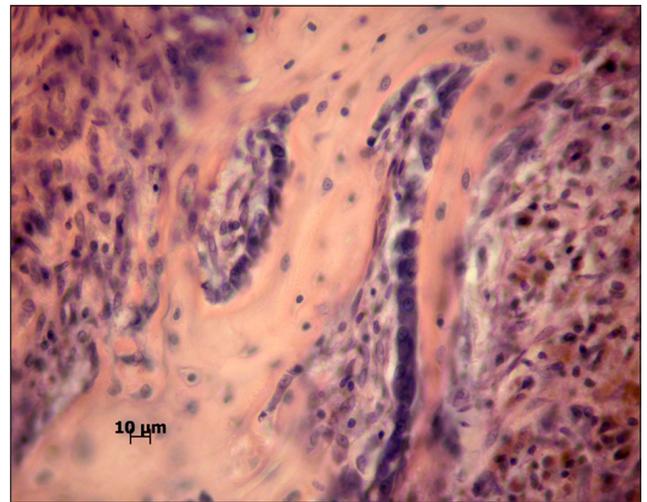


Рис. 5. Фото гистопрепарата. Новообразованные костные трабекулы и остеогенная фиброретикулярная ткань в области дефекта. Высокая плотность остеобластов на поверхности костных трабекул. Опытная серия. 5-е сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 400

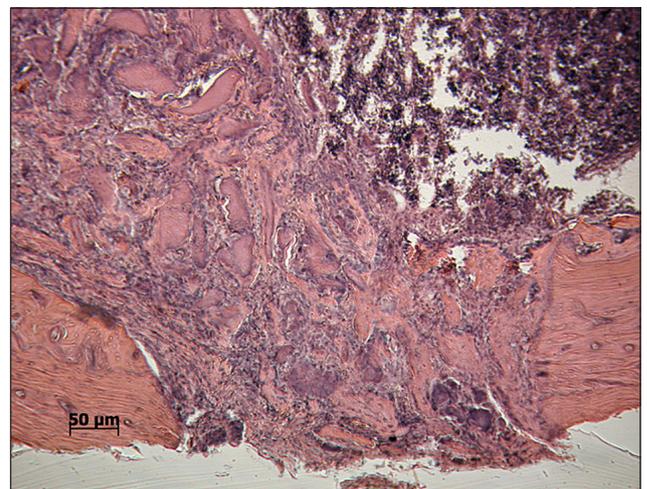


Рис. 6. Фото гистопрепарата. Губчатая кость в области дефекта. Контрольная серия. 14-е сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

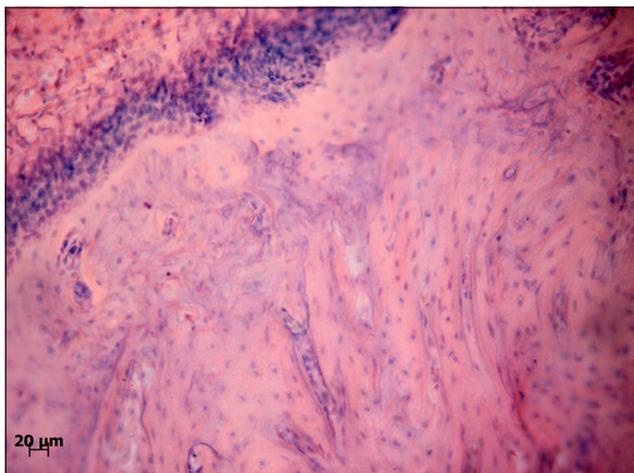


Рис. 7. Фото гистопрепарата. Компактизация регенерата в области кортекса материнской кости. Опытная серия. 14-е сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 200

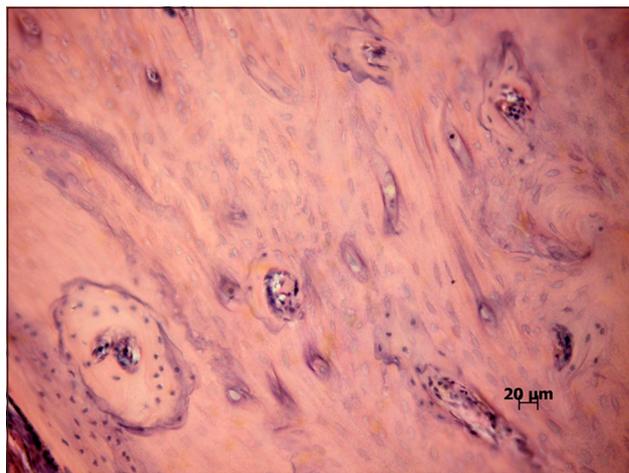


Рис. 9. Фото гистопрепарата. Губчатая кость в области метафизарного дефекта. Надкостница расширена. Контрольная серия. 21-е сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 200

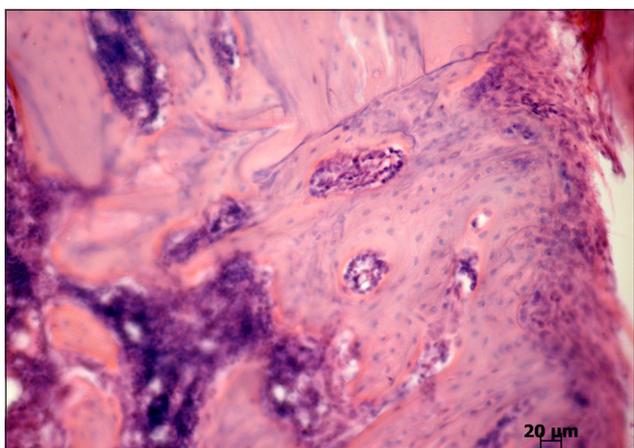


Рис. 8. Фото гистопрепарата. Аппозиционные напластования костной ткани в области остеонов и очагов rareфикации. Кортекс материнской кости. Опытная серия. 14-е сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 200

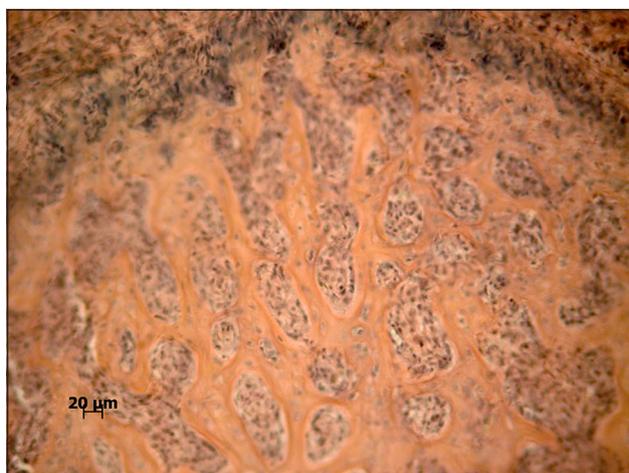


Рис. 10. Фото гистопрепарата. Регенерат в области дефекта представлен пластинчатой костью. Опытная серия. 21-е сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 200

многочисленные фагосомы и фаголизосомы, мультивезикулярные тельца, а также большое количество вторичных лизосом (рис. 3). Цитоплазматическая мембрана макрофагов имела многочисленные выросты — псевдоподии, обеспечивающие эффективность фагоцитоза внеклеточных продуктов деструкции. В контрольной серии в регенератах животных присутствовали единичные макрофаги без признаков активации фагоцитоза. Известно, что макрофаги играют важную роль в регенерации костной ткани [14]. Нарушение миграции макрофагов, снижение их плотности в области травматического повреждения может привести к нарушению репаративного остеогенеза [15].

Были выявлены также единичные макрофаги с признаками апоптоза. В таких клетках наблюдали распад клеточного ядра на фрагменты. Возле макрофагов, находящихся на стадии гибели, экс-

трацеллюлярно присутствовали высвободившиеся вторичные лизосомы.

В грануляционной ткани в области травматического повреждения губчатой кости плотность сосудов как синусоидного, так и капиллярного типов была высокой. Сосуды синусоидного типа имели широкие просветы без четко оформленной стенки. Новообразованные капилляры характеризовались узкими просветами, оболочка которых была выстлана эндотелиоцитами.

В структуре регенерата обнаруживали клетки остеобластического дифферона, они располагались в основном в области губчатой кости, формируя небольшие скопления на поверхности материнских трабекул. В межтрабекулярных пространствах, прилежащих к области дефекта, среди красного костного мозга обнаружены очаги клеточного детрита. Надкостница вблизи зоны травматического повреждения

Таблица 1

Клеточный состав в области кровяного сгустка в метафизарном дефекте бедренной кости крыс контрольной и опытной групп (M ± m, %)

Типы клеток	Серии эксперимента		P
	Опыт (n = 6)	Контроль (n = 6)	
Нейтрофильные гранулоциты	15,95 ± 0,99	24,1 ± 2,17	< 0,001
Лимфоциты	13,73 ± 1,0	22,36 ± 1,71	< 0,05
Макрофаги	14,1 ± 1,1	10,8 ± 0,9	< 0,05
Плазмоциты	5,5 ± 0,76	6,3 ± 0,52	> 0,05
Тканевые базофилы	6,0 ± 0,71	4,9 ± 0,45	> 0,05
Фибробласты	21,6 ± 2,06	16,8 ± 0,98	< 0,001
Малодифференцированные соединительнотканые клетки	24,2 ± 0,6	12,3 ± 1,07	< 0,001

была отечной и разволокненной. В ней определяли фиброзный и остеогенный слой. Фиброзный слой был расширенным за счет пролиферации фибробластов, остеогенный — узким, в нем полоской располагались остеобласты. Надкостница не перекрывала область травматического повреждения.

В прилежащей к дефекту материнской кости отмечены признаки деструктивных посттравматических нарушений — на поверхности отсутствовали остециты, костные каналы были запустевшими.

Для оценки реорганизации кровяного сгустка в области травматического повреждения проанализирован клеточный состав (табл. 1).

Как свидетельствуют данные, представленные в табл. 1, перестройка кровяного сгустка в дефекте леченых животных протекала значительно интенсивнее, чем в контроле. Выявлено уменьшение в 1,8 раза количества нейтрофилов, повышение в 1,3 раза количества макрофагов, в 1,28 раз фибробластов и в 1,96 раз малодифференцированных соединительнотканых клеток.

Область воспроизведенного в кости дефекта на 5-е сутки у животных без лечения была заполнена остатками нерассосавшегося кровяного сгустка, грануляционной и на участках фиброретикулярной тканями (рис. 4).

Грануляционная ткань была представлена неупорядоченными тонкими пучками незрелых коллагеновых волокон, среди которых обнаруживали фибробласты, малодифференцированные соединительнотканые клетки, единичные макрофаги и лимфоциты. Плотность кровеносных сосудов снижена по сравнению с предыдущим сроком исследования (3-и сутки). Сосуды, расположенные в грануляционной ткани, были в основном капиллярного типа и имели узкие просветы, лишь в областях, прилежащих к кровяному сгустку, обнаружены сосуды синусоидного типа.

На небольших территориях, в основном в области губчатой кости, выявлены участки остеогенной фиброретикулярной ткани, в которой преобладали

фибробласты и единичные остеобласты, расположенные среди неупорядоченно переплетающихся коллагеновых волокон. Плотность сосудов капиллярного типа в основном массиве фиброретикулярной ткани была низкой.

В кортексе и губчатой кости, прилежащих к области дефекта, прогрессировали деструктивные нарушения: по сравнению с предыдущим сроком наблюдения были расширены участки кости без остецитов, обнаруживали очаги гомогенизации матрикса. Надкостница над областью травматического повреждения не сформировалась. В прилежащих к дефекту областях она отечна, пучки коллагеновых волокон разволокнены, плотность фибробластов низкая. Единичные остеобласты располагались на поверхности кортекса, но не формировали сплошного остеогенного слоя.

В отличие от регенератов контрольных животных область дефекта на 5-е сутки у животных с введением ИФР-1 была практически полностью заполнена фиброретикулярной тканью остеобластического типа и грубоволокнистыми костными трабекулами (рис. 5), перемежающимися с фиброретикулярной тканью, в которой среди пучков коллагеновых волокон располагались зрелые фибробласты. Эти клетки имели удлиненную форму, ядро с преобладанием гетерохроматина и цитоплазму с многочисленными преимущественно параллельно ориентированными канальцами гранулярной эндоплазматической сети, которые образовывали анастомозы с крупными овальными митохондриями и частично просветленным матриксом. Такое взаимодействие митохондрий и эндоплазматической сети наблюдали в компартментах клетки, требующих высокого уровня энергообеспечения для биосинтетических процессов. В перичеллюлярном пространстве таких фибробластов определяли многочисленные разнонаправленные коллагеновые волокна.

Остеобласты формировали небольшие островки, выступающие как прообраз остеоида. Клетки имели

крупные гипохромные ядра, окруженные обильной базофильной цитоплазмой, что свидетельствует об их функциональной активности.

Над остеобластами нередко располагались остеопрогениторные клетки — преостеобласты с крупным эухромным ядром и большим ядрышком. На ультраструктурном уровне между преостеобластами были выявлены щелевидные контакты, присутствие которых свидетельствует о процессе обмена метаболитами, ионами, внутриклеточными медиаторами и сигнальными макромолекулами между этими клетками [16]. Кроме того, щелевидные контакты координируют активность клеток за счет обмена биологически активными веществами.

На участках костной ткани, прилежащей к области травматического повреждения в лакунах резорбции находились остеокласты, участвующие в ремоделировании отломков и осколков кости в области регенерата. Известно, что остеобласты и остеокласты играют ключевую роль в процессе регенерации кости [17], однако нельзя недооценивать значение других клеток — макрофагов, лимфоцитов, фибробластов, — принимающих участие в регенерации кости на ранних стадиях и обеспечивающих необходимый комплекс взаимодействия для ее течения [18].

Надкостница, прилежащая к краевым отделам дефекта, утолщена, представлена набухшими пучками коллагеновых волокон, между которыми располагались фибробласты. Проллифераты фибробластов выявляли и над областью травматического повреждения, где они формировали непрерывный слой. Остеобластический слой надкостницы был расширенным и утолщенным, состоял из 2–3 рядов остеобластов. На участках надкостницы формировались незрелые костные трабекулы. Однако на этот срок исследования периостальный регенерат полностью не перекрывал область травматического повреждения.

В прилежащей к дефекту материнской костной ткани выявлены признаки репаративных проявлений — резорбтивные полости заполнены фиброретикулярной тканью, а на их стенках формировались генерации новой костной ткани. В межтрабекулярных областях поврежденные участки костного мозга замещала ретикулофиброзная ткань.

Регенерат на 7-е сутки в кости контрольной серии животных частично заполнял область дефекта. Он был представлен тремя типами тканей: грануляционной, занимающей значительные территории, небольшими полями фиброретикулярной ткани, а в глубоких отделах губчатой кости формировался остеоид и грубоволокнистая костная ткань. Послед-

няя была локализована в основном на поверхности костных трабекул материнской кости и в виде небольших островков располагалась в эндостальной области регенерата.

В фиброретикулярной ткани фибробласты характеризовались различной зрелостью, располагались вдоль коллагеновых волокон. Обнаружены единичные сосуды капиллярного типа с узкими просветами. При оценке сети коллагеновых волокон под поляризационным микроскопом выявлено, что они выполнены коллагеном I типа, однако ориентационная упорядоченность их низкая.

Грануляционная ткань представлена редко расположенными фибробластами, малодифференцированными соединительнотканскими клетками, имеющими характерную структурную организацию — небольшое округлое ядро окружено узким слоем слабобазофильной цитоплазмы.

Надкостница над областью дефекта не сформирована. В участках надкостницы, прилежащих к дефекту, отмечены вызванные травматическим повреждением реактивные изменения — гиперплазия фибробластов на участках и разрыхление пучков коллагеновых волокон за счет отека.

У животных *опытной группы на 7-е сутки* в области регенерата преобладали фиброретикулярная ткань остеогенного типа и новообразованная костная. Последняя располагалась не только в глубоких отделах дефекта, но и в области кортекса. Отмечена повышенная плотность остеобластов на поверхности губчатой материнской кости.

В фиброретикулярной ткани остеогенного типа коллагеновые волокна представлены коллагеном I типа. Они располагались упорядочено, формируя остеоид. Периост не перекрывал область травматического повреждения. В прилежащих к дефекту областях надкостницы в остеобластическом слое формировались незрелые костные трабекулы, напластовывающиеся на кортекс материнской кости. Плотность кровеносных сосудов в надкостнице в областях, смежных с регенератом, была высокой по сравнению с участками, дистанцированными от травматического повреждения.

На 14-е сутки исследования у животных *контрольной группы* область дефекта была заполнена новообразованными костными трабекулами, формирующими мелкопетлистую сеть, в межтрабекулярных пространствах которой располагалась фиброретикулярная ткань остеогенного типа. Периост в виде узкого фиброзного слоя перекрывал зону дефекта.

В кортексе материнской кости на расстоянии от области травматического повреждения выявляли

обширные очаги лизиса костной ткани, формирование которых возможно связано с обеднением минералами участков кости, прилежащей к области травматического повреждения (рис. 6).

Регенерат в области дефекта кортекса на 14-е сутки у животных с введением ИФР-1 выполнен пластинчатой костной тканью с расширенными сосудистыми каналами, заполненными фиброретикулярной тканью (рис. 7). Плотность остеоцитов, располагающихся на поверхности кости, высокая. Клетки имели небольшие гипохромные ядра, узкую цитоплазму и находились в лакунах.

Граница между материнской костью в области кортекса и регенератом, заполняющим область дефекта, на этот срок исследования сохранялась. На поверхности материнской кости плотность остеоцитов была повышена по сравнению с кортексом контрольных животных.

В кортексе на расстоянии от области травматического повреждения в очагах микротрещин и щелей как отражение травматического повреждения кости или участков остеолизиса имело место аппозиционное напластование новообразованной костной ткани с высокой плотностью остеоцитов (рис. 8).

В области губчатой кости новообразованные костные трабекулы были покрыты слоем остеобластов, имеющих крупное ассиметрично расположенное гипо- или гиперхромное ядро и обильную слабобазофильную цитоплазму, что свидетельствует об их функциональной активности.

В опытной группе животных на этот срок исследования надкостница расширена за счет остеобластического слоя и новообразованной губчатой кости, сформировавшейся на поверхности по типу «коробок».

У животных контрольной серии на 21-е сутки зона дефекта была заполнена мелкопетлистой губчатой костью, в узких межтрабекулярных пространствах которой располагалась ретикулофиброзная ткань (рис. 9). При исследовании области регенерата и компактной кости, спаянной с регенератом, в поляризованном свете обнаружены костные трабекулы, представленные костной тканью различной зрелости.

В области кортекса у животных опытной серии на 21-е сутки дефект полностью выполнен компактной костью с высокой плотностью остеоцитов (рис. 10). Большая часть сосудистых каналов в регенерате сохраняла разнонаправленную ориентацию относительно оси конечности, поэтому травмированная область четко определялась. Отличительной особенностью остеорепарации является формирование плотного периостального регенерата, пере-

Таблица 2

Площадь костной ткани (%) в регенератах метафизарного дефекта бедренной кости крыс

Серия эксперимента	Сутки	
	14-е	21-е
Контрольная	48,67 ± 2,31	66,66 ± 4,25 P1 < 0,01
Опытная	68,56 ± 3,25 P < 0,01	91,44 ± 3,94 P1 < 0,01 P < 0,01

Примечания: P — достоверность отличий между опытной и контрольной сериями; P1 — по сравнению с предыдущим сроком.

крывающего зону дефекта, который представлен костной тканью с высокой плотностью остеобластов в краевых отделах.

Аналогичные результаты были получены S. Srouji и соавт. [20], которые на модели сегментарного дефекта большеберцовой кости у крыс доказали, что введение в зону дефекта гидрогелевых подложек с ИФР-1 способствует достоверному повышению костеобразования через 4 и 6 недель после операции по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили физиологический раствор.

Для объективизации данных о регенерации кости в опытной и контрольной группах был проведен морфометрический анализ регенерата для оценки площадей, занимаемых костной тканью (табл. 2).

При анализе данных морфометрического исследования выявлено, что на 14-е сутки площадь костной ткани была повышена в опытной серии на 19,86 % по сравнению с контрольной, а на 21-е сутки площадь костной ткани в опытной серии повышена на 24,78 %.

Выводы

В результате экспериментальных исследований, проведенных на 30 белых лабораторных крысах, выявлено, что введение инсулиноподобного фактора роста-1 стимулирует репаративный остеогенез в моделированном дефекте в дистальном метафизе бедренной кости. Так, на ранних сроках исследования (3-и сутки) в кровяном сгустке в области дефекта повышена плотность малодифференцированных соединительнотканых клеток и фибробластов, в то время как в контрольной серии эксперимента фибробласты обнаружены только в грануляционной ткани, расположенной в межтрабекулярных пространствах губчатой кости.

Проведенный электронно-микроскопический анализ зоны дефекта дистального метафиза бедренной кости крыс, пролеченных ИФР-1, показал, что на 3-и сутки наблюдения в регенерате активнее, чем в контрольной группе животных, протекают процессы очистки костной раны от продуктов

деструкции и фибрина, на что указывает наличие в кровяном сгустке множества функционально активных макрофагов с многочисленными вторичными лизосомами и фагосомами в цитоплазме. Методами ультраструктурного анализа доказано, что на 5-е сутки после воспроизведения дефекта в области костного регенерата крыс, пролеченных ИФР-1, присутствовали фибробласты в состоянии высокой биосинтетической активности, преостеобласты, между которыми определяли щелевидные контакты, что в целом свидетельствует об активизации остеогенеза на фоне проводимого лечения. На 7-е сутки плотность остеобластов была повышена в опытной серии по сравнению с контрольной. Выявлено улучшение качества прилежащей к области дефекта костной ткани за счет аппозиционного напластования кости в очагах лизиса, трещинах и щелях. После проведения морфометрического анализа установлено, что на 14 и 21-е сутки площадь костной ткани была повышена в опытной серии на 19,86 и 24,78 % соответственно по сравнению с контрольной серией.

Список литературы

1. Yakar S. IGF-1 and bone: new discoveries from mouse models review / S. Yakar, H.-W. Courtland, D. Clemmons // *J. Bone Mineral Research*. — 2010. — Vol. 25, № 12. — P. 2543–2552.
2. Giustina A. Growth Hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton / A. Giustina, Gh. Mazziotti, E. Canalis // *Endocrine Reviews*. — 2008. — Vol. 29, № 5. — P. 535–559.
3. Canalis E. Insulin-like growth-factors and their role in osteoporosis / E. Canalis, D. Agnusdei // *Calcified tissue international*. — 1996. — Vol. 58, № 3. — P. 133–134.
4. Jadowiec J. A. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents / J. A. Jadowiec, A. B. Celil, J. O. Hollinger // *Expert Opin. Biol. Ther.* — 2003. — Vol. 3, № 3. — P. 409–423.
5. Salgado A. J. Bone tissue engineering: state of the art and future trends / A. J. Salgado, O. P. Coutinho, R. L. Reis // *Macromol. Biosci.* — 2004. — Vol. 4. — P. 743–765.
6. Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation / G. Zhao, M. C. Monier-Faugere, M. C. Langub [et al.] // *Endocrinology*. — 2000. — Vol. 141. — P. 2674–2682.
7. Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures / E. Canalis, J. Pash, B. Gabbitis [et al.] // *Endocrinology*. — 1993. — Vol. 133. — P. 33–38.
8. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. — (Міжнародний документ Ради Європи). — Режим доступу до документу: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137.
9. Україна. Закони. Про захист тварин від жорстокого поводження (Стаття 26) [№ 3447-IV від 21.02.2006].
10. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 542 с.
11. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. — М.: Мир, 1975. — 324 с.
12. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *J. Cell Biol.* — 1963. — Vol. 17. — P. 208–212.
13. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1990. — 356 с.
14. Macrophages accumulate in the early phase of tendon-bone healing / S. Kawamura, L. Ying, H. Kim [et al.] // *J. Orthop. Res.* — 2005. — Vol. 23, Iss. 6. — P. 1425–1432.
15. Impaired fracture healing in macrophage migration inhibitory factor-deficient mice / T. Kobayashi, S. Onodera, E. Kondo [et al.] // *Osteoporosis International*. — 2011. — Vol. 22, № 6. — P. 1955–1965.
16. *Molecular Biology of the cell* / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis [et al.] — 4th ed. — New York: Garland Science; 2002.
17. Schindeler A. Pre-clinical fracture repair studies [Электронный ресурс] / A. Schindeler: meeting Report from the 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (September 11–15, 2009). — Denver, Colorado, 2009. — Режим доступа: <http://www.nature.com/bonekey/knowledgeenvironment/2009/0912/bonekey20090418/full/bonekey20090418.html>.
18. Grundnes O. Effects of macrophage activation on bone healing / O. Grundnes, O. Reikeraas // *J. Orthop. Sci.* — 2000. — Vol. 5, № 3. — P. 243–247.
19. Пат. 2090888 С2 Российская Федерация, МПК G01N33/48. Способ прогнозирования течения сращения перелома длинной трубчатой кости / Челноков А. Н., Кутепов С. М., Новицкая Н. В., Осипова А. В. — № 94005486/14; заявл. 15.02.1994; опубл. 20.09.1997.
20. Bone defect repair in rat tibia by TGF-beta1 and IGF-1 released from hydrogel scaffold / S. Srouji, I. Blumenfeld, A. Rachmiel, E. Livne // *Cell Tissue Bank*. — 2004. — Vol. 5, № 4. — P. 223–230.

Статья поступила в редакцию 17.10.2013

BONE REGENERATION ON THE BACKGROUND OF THE LOCAL IMPACT OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 (EXPERIMENTAL STUDY)

A. A. Tihonenko¹, N. V. Diedukh², L. M. Bengus², S. A. Khmyzov²

¹ «Genesis» Clinic, Simferopol, Ukraine

² SI «Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Science of Ukraine», Kharkiv