

УДК [616.718.5-001.5:616.395]-092.9:612.753

СТРУКТУРНІ ЗМІНИ КІСТКОВОГО РЕГЕНЕРАТУ ЗА УМОВ КЛІТИННОГО ЗНЕВОДНЕННЯ ОРГАНІЗМУ

Слісаренко О. В. *

Сумський державний університет
вул. Римського-Корсакова, 2, 40007, Суми, Україна
(отримано 24.05.2013, надруковано 02.07.2013)

Дослідження проведено на білих лабораторних щурах-самцях зрілого віку, яким наносився дірчастий дефект великогомілкової кістки на фоні змодельованого клітинного зневоднення. З початку експерименту відбувається порушення відсоткового складу клітинних елементів регенерату, причому зі зростанням ступеня дегідратації зміни стають більш вираженими. В подальшому спостерігаються дисрегенераторні зміни та затримка формування тканинних структур, що проявляється у наявності грануляційної тканини на 15 добу при середньому та важкому ступенях та фіброретикулярної - на 24 добу при важкому ступені. Разом з цим протягом спостереження відбувається зниження вмісту основних хімічних елементів, порушення мікротвердості та затримка росту кістки в цілому. Наслідком цих змін є загальна затримка формування кісткового мозоля.

Ключові слова: травма, великогомілкова кістка, репаративна регенерація, клітинна дегідратація.

* anatomy_sumy@mail.ru

Вступ.

У сучасній медицині пошук шляхів оптимізації остеогенезу та виявлення причин порушення процесу репаративної регенерації кісток є актуальною проблемою. В останні роки спостерігається зростання інвалідності внаслідок травм опорно-рухового апарату. Травматичні ушкодження кісток займають стійке третє місце серед населення України по інвалідизації [2]. На процес загоєння перелому впливають дуже багато як внутрішніх, так і зовнішніх чинників. Серед внутрішніх чинників, можна виділити вік, соматичні захворювання, стан імунної системи тощо. Дуже багато зовнішніх чинників таких як, дія солей тяжких металів, свинцю, радіації, алкоголю і дегідратація організму негативно впливають на регенерацію.

Таким чином, процес загоювання переломів кісток залежить від багатьох чинників, його розлади мають відповідне підґрунтя та, виходячи з цього, й певну специфічність у своїх проявах. Одним із таких чинників є дегідратаційні порушення водно-сольового обміну організму, які є супутником багатьох патологічних станів організму [7]. Незважаючи на значну кількість публікацій

присвячених особливостям репаративного остеогенезу під впливом різних факторів, в літературі недостатньо даних стосовно впливу порушень водно-сольового обміну на процеси регенерації кісток.

Мета дослідження.

Дослідити морфо-функціональні зміни регенерату великогомілкової кістки, які відбуваються за умов впливу клітинної дегідратації у тварин зрілого віку.

Об'єкт і методи дослідження.

З метою вивчення особливостей репаративної регенерації кісток за умов клітинного зневоднення організму проведено експериментальні дослідження на 60 білих лабораторних щурах-самцях.

Всі тварини до початку дослідження знаходилися на звичайному харчовому раціоні та утриманні, яке здійснювали відповідно до "Санітарних правил створення, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)". Дослідження проводили в однакових для всіх серій експериментів умовах. Досліди на тваринах виконували відповідно до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», прийнятих Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Відповідно до моделі експерименту тварини були розподілені на такі серії:

I СЕРІЯ – контрольна: в умовах стерильної операційної під ефірним наркозом наносився дірчастий дефект великогомілкової кістки стоматологічним бором діаметром 1,2 мм на медіальній поверхні середньої третини діафіза. Операційну рану ушивали, тварин виводили з наркозу та далі утримували в стаціонарних умовах віварію. Після операції тварини знаходилися на загальному раціоні і були розподілені по строкам згідно стадіям репаративного остеогенезу.

II СЕРІЯ – зрілі щурі віком 8 місяців з дірчастим дефектом великогомілкових кісток, яким моделювалось клітинне зневоднення. Щурі отримували як пиття 1,2% гіпертонічний розчин кухонної солі, а як їжу – гранульований комбікорм. Тварини цієї серії були поділені на три групи, відповідно ступеням дегідратації. Легкий ступінь досягався протягом 7-10 днів, середній - 16-20 днів, важкий - 28-30 днів. По досягненню відповідного ступеня клітинного зневоднення, тваринам експериментальних серій завдавали травму великогомілкових кісток і переводили на звичайний питний раціон.

Через 3, 15 та 24 добу після операції відповідно до основних стадій репаративного остеогенезу [3], тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом і для дослідження забирали травмовані великогомілкові кістки.

Методи дослідження

1. Гістологічне дослідження ділянки дефекту. Для приготування гістологічних препаратів використовували загальноприйняту методику. Гістологічні зрізи товщиною близько 10 мкм забарвлювали гематоксилін-еозином [1]. Отримані препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа "OLIMPUS" з цифровою відеокамерою. Зображення зберігали на вінчестері з подальшим друком кольорових ілюстрацій.

Морфометричні дослідження проводили за допомогою комп'ютерних програм "SEO imageLab". Через 3 дні після нанесення дефекту, вимірювався клітинний склад регенерату (фібробласти, макрофаги, лімфоцити, плазмоцити, нейтрофіли та малодиференційовані клітини (МДК)) у вигляді відсотка від їх загальної кількості в ділянці дефекту. В наступні терміни визначали площу

грануляційної, фіброретикулярної, грубоволокнистої та пластинчастої тканин.

2. Визначення хімічного складу.

Ділянку кістки з дефектом виділяли і висушували до сталої ваги при температурі 105°C у сушильній шафі. Після цього висушену тканину упродовж 48 годин спалювали в порцелянових тиглях у муфельній печі при температурі 450°C. Шляхом зважування золи вираховували загальну кількість мінеральних речовин. Отриманий попіл розчиняли в 2мл 10% соляній та 1мл азотній кислотах і доводили бідистильованою водою до 10 мл загального об'єму. За загальноприйнятою методикою на атомному абсорбційному спектрофотометрі С-115М1 визначали кількість кальцію, калію, натрію, магнію, міді, цинку, заліза і марганцю.

3. Растрова електронна мікроскопія регенерату.

Фрагмент кістки з дефектом протягом доби фіксували в 2,5% буферному розчині глютаральдегіду. Далі зразок дофіксували осмієм та зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації (від 50% до 96%). Після цього, досліджувані зразки приклеювали до металевого струмопровідного столика клеєм, з подальшим напиленням вуглицем в вакуумній установці ВУП-5. Проводили вивчення морфологічних особливостей регенерату за допомогою електронного мікроскопа РЕММА-102 при збільшенні від 10 до 2500 разів.

4. Визначення мікротвердості кістки.

Вивчення мікротвердості [5] проводили за допомогою приладу ПМТ-3 лише на 24 добу спостереження. Перед проведенням дослідження поверхню кістки шліфували та фіксували зразок на металевому столику за допомогою епоксидних смол. Визначення числа твердості проводили в місці травми та на поверхні материнської кістки на відстані 10 мм від місця травми [4].

5. Остеометрія. Для виявлення загальних змін росту та формоутворення травмованих кісток на 24 добу проводили остеометричне дослідження великогомілкових кісток щурів, а саме найбільшу довжину кістки, найбільшу ширину проксимального та дистального епіфізів, найбільшу ширину та передньо-задній розмір середини діафіза.

Результати досліджень та їх обговорення. На 3 добу після нанесення перелому, місце дефекту заповнене гематою,

площа якої дещо більша з кожним наступним ступенем за розміри площі контрольної групи.

При легкому ступені серед клітин у регенераті відбувається зростання лімфоцитів на 7,39% ($p < 0,05$), плазмоцитів на 9,80% ($p < 0,05$) і нейтрофілів на 10,70%, кількість всіх інших клітин падає, на 2,54% - вміст фібробластів, на 2,97% - макрофагів, на 22,03% ($p < 0,05$) - МДК. У регенераті досить часто зустрічаються молоді, секретуючі та гинучі клітини.

При середньому ступені грануляційна тканина характеризується порушенням кількісного клітинного складу регенерату. Це відбувається завдяки зростанню вмісту лімфоцитів на 9,48% ($p < 0,05$), плазмоцитів на 11,49% ($p < 0,05$), нейтрофілів на 13,55% ($p < 0,05$), МДК на 3,18% та зниженню кількості фібробластів – на 10,65% ($p < 0,05$) і макрофагів на 19,59% ($p < 0,05$) (рис. 1).

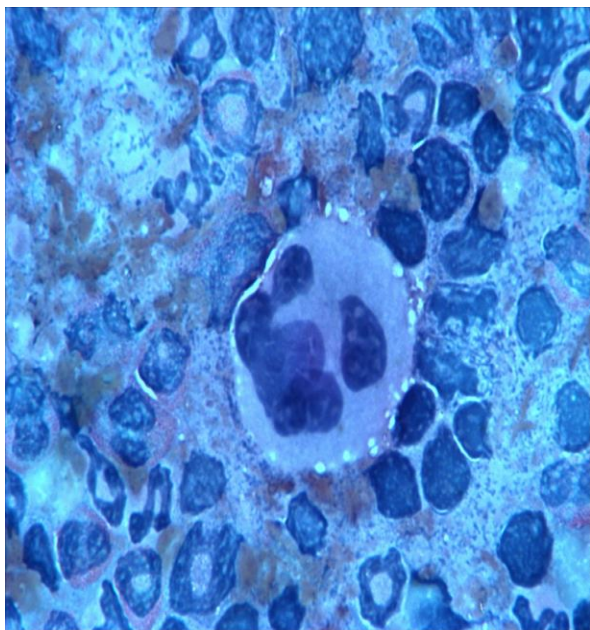


Рис. 1. Регенерат діяфіза великогомілкової кістки щура за умов середнього ступеня клітинного зневоднення на 3-тню добу після травми. Забарвлення гематоксилін – еозин. Zoom X 400.

На 3 добу після нанесення перелому, при важкому ступені клітинного зневоднення, зона дефекту повністю заповнена масивною гематомою, площа якої перевищує контроль. У цей період відбувається значне порушення клітинного складу. У клітинному складі на фоні збільшення лімфоцитів, плазмоцитів, нейтрофілів, МДК, зменшується кількість фібробластів та макрофагів на 17,74% ($p < 0,05$) і 22,97% ($p < 0,05$) відповідно.

На 15 добу спостереження зона дефекту заповнена грубоволокнистою і пластинчастою кістковими тканинами, площа яких зменшена в порівнянні з контрольною групою тварин на 5,17% ($p < 0,05$) і на 11,81% - при легкому ступені, на 10,3% ($p < 0,05$) та на 14,99% - при середньому ступені, при важкому - на 12,66% ($p < 0,05$) та на 21,20% ($p < 0,05$) відповідно. Водночас у регенераті між трабекулами грубоволокнистої тканини спостерігається фіброретикулярна тканина, площа якої збільшена в порівнянні з контролем на 26,40% - при легкому ступені, на 4,95% – при середньому та на 2,14% - при важкому. При середньому та важкому ступенях серед фіброретикулярної тканини наявні залишки грануляційної тканини, площа якої збільшується та складає $6,16 \pm 0,14\%$ та $7,15 \pm 0,19\%$, відповідно. Кісткова тканина представлена незрілою тканиною з затримкою перебудови первинної у вторинну. Кісткові балочки грубоволокнистої тканини різного ступеня зрілості, але переважно є незрілими, на поверхні яких виявляється невелика кількість первинних остеобластів. По краю дефекту спостерігаються порожні остеоцитарні лакуни з вогнищами резорбції та мікротріщини.

Після 24 доби спостереження в регенераті переважає грубоволокниста і пластинчаста кісткові тканини. Площа грубоволокнистої тканини збільшується при легкому ступені на 5,37% ($p < 0,05$), при середньому – на 10,24% ($p < 0,05$), при важкому – на 5,09%. Вона складається з витончених та в тій чи іншій мірі деформованих трабекул, на поверхні яких знаходиться невелика кількість остеобластів. Між трабекулами простір заповнений кістковим мозком та кровоносними судинами, а при важкому ступені ще й залишками фіброретикулярної тканини, що не спостерігається у контрольній групі тварин. Площа пластинчастої тканини зменшена в порівнянні з контролем від 6,59% - при легкому ступені до 8,14% ($p < 0,05$) – при важкому. Сформовані пластинки розташовані у вигляді кругів різних розмірів, які мають спільний центр у вигляді судин та інтенсивне забарвлення. Між сформованим кістковим мозком і материнською кісткою відсутнє повне з'єднання та спостерігаються порожні лакуни, які не заповнені остеоцитами (рис. 3). Ці процеси не характерні для даної стадії регенерації у тварин контрольної групи.

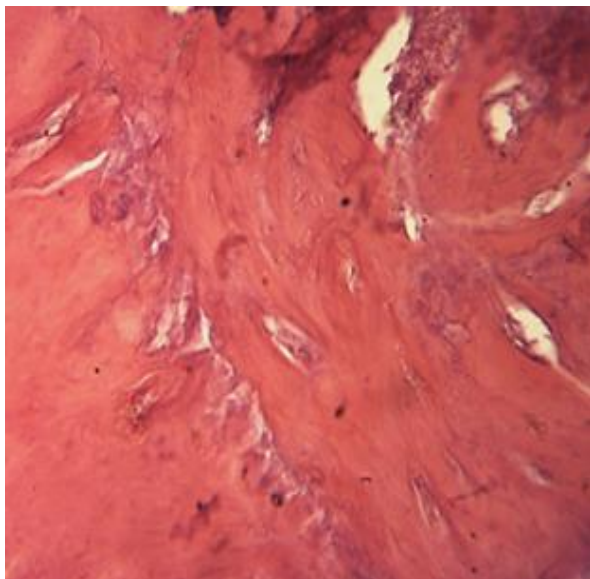


Рис. 3. Регенерат діяфіза великогомілкової кістки щура за умов важкого ступеня клітинного зневоднення на 24-ту добу після перелому. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoom X 100.

У хімічному складі регенерату протягом усього строку дослідження спостерігається поступове зменшення відносно контролю кількості кальцію, калію, марганцю, міді, цинку, мінеральних речовин та води відносно контролю, а кількість магнію навпаки, незначно підвищується. При легкому ступені відбувається підвищення натрію на 4,16% - на 3 добу, на 4,33% - на 15 добу, на 6,81% - на 24 добу, а при середньому падає з 21,21% ($p < 0,05$) до 16,23% ($p < 0,05$) і при тяжкому з 38,34% ($p < 0,05$) до 30,19% ($p < 0,05$). Майже аналогічна картина відбувається з вмістом заліза, його рівень на 3 та 15 добу кожного ступеня вище, а на 24 добу рівень нижче за контрольні показники і при важкому ступені падає на 8,46%.

Методом растрової електронної мікроскопії підтверджені гістологічні дані. На 3 добу дефект заповнений гематомою, яка складається з остеогенних елементів, клітинних елементів крові, фібрину та колагенових волокон. На 15 добу грубоволокниста кісткова тканина різної зрілості. Трабекули, з кожним наступним ступенем, стають більш потоншими, місцями з розривами, на їх поверхні зустрічаються поодинокі остеобласти (рис.4). Біля краю материнської кістки можна побачити остеоцитарні лакуни на різних етапах формування. На 24 добу дефект чітко відокремлений від материнської кістки.



Рис. 4. Сканограма поверхні травмованої кістки щура за умов клітинної дегідратації важкого ступеня через 15 днів після нанесення дефекту. 3б. x 860.

Вивчення мікротвердості великогомілкових кісток свідчить про погіршення показників. Так, у зоні перелому при легкому ступені відбувається зниження мікротвердості на 3,31%, а на віддалені від цієї ділянки – на 4,64% ($p < 0,05$), при середньому – у дефекті та на відстані від нього показники знижується на 10,82% ($p < 0,05$) та на 7,92% ($p < 0,05$) відповідно. Важкий ступінь характеризується зменшенням показників мікротвердості, в порівнянні з контрольною серією, на 14,91% у зоні регенерату та на 10,36% на відстані від дефекту.

Із затримкою морфологічних змін регенерату та погіршенням досліджуваних параметрів, що викликано дегідратаційними порушеннями, остеометричні показники не є виключенням. Протягом дослідження отримані дані вказують на затримку росту кістки. Травмовані кістки стають більш короткими за контрольні, з меншою шириною проксимального та дистального епіфізів, натомість діяфіз незначно потовщується за рахунок ширини та передньо-заднього розміру. При легкому ступені довжина кістки нижча за контроль на 3,55%, з меншою шириною проксимального та дистального епіфізів - на 0,98% і 0,41%. При середньому - травмована кістка коротша на 5,59% ($p < 0,05$) та ширина проксимального діяфізу зменшена на 1,58%. При важкому - довжина кістки зменшується на 8,37% ($p < 0,05$), ширина проксимального і дистального епіфізів – на 3,16% ($p < 0,05$) і 2,09%, відповідно, натомість відбувається

потовщення діафізу кістки, завдяки збільшенню передньо-заднього розміру і ширини.

Висновки.

У тварин зрілого віку на третю добу спостереження виникають порушення клітинних співвідношень у вигляді збільшення кількості лімфоцитів, нейтрофілів та зменшення - фібробластів та макрофагів. Це впливає на подальше протікання процесу регенерації, тому що перша стадія є пусковою у репаративному процесі. За умов впливу клітинного зневоднення утворення повноцінного кісткового мозоля не відбувається. Так, в умовах важкого ступеня відмічається затримка формування кісткових структур, про що свідчить не тільки зменшення площі пластинчастої кісткової тканини та збільшення грубоволокнистої, а навіть залишки грануляційної та фібронетикулярної тканин в останній термін спостереження, що не характерно для даної стадії репаративного остеогенезу.

Зниження кількості майже всіх досліджуваних хімічних елементів регенерату кістки викликає гальмування процесів мінералізації та затримання репаративної регенерації кісткової тканини, що в свою чергу приводить до погіршення показників мікротвердості та затримки росту кістки, а саме зменшення її довжини і ширини епіфізів.

Перспективи подальших досліджень.

Затримка процесу репаративної регенерації кісток за умов порушення водно-електролітного балансу свідчить про необхідність розробки шляхів корекції морфологічних змін у регенераті, викликаних зневодненням організму.

Список опрацьованої літератури:

1. Корж М.О. Регенерація кістки – актуальна для ортопедів та травматологів проблема/

М.О. Корж// Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 76.

2. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации/ Н.А. Корж, Н.В. Дедух // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 76-84.
3. Погорелов М.В. Морфофункциональная оценка репаративного остеогенезу / М.В. Погорелов, В.І. Бумейстер // Таврический медико-биологический вестник. – 2008. – Т. 11, № 3.- С. 120-126.
4. Паршев С.Н. Микротвердость материалов / С.Н. Паршев, Н.Ю. Полозенко // ВолгГТУ, Волгоград, 2004. – 15 с.
5. Чиркова А.М. Гистоморфометрические особенности дистракционных регенератов, формирующихся после нарушения целостности большеберцовой кости различными способами/ А.М. Чиркова, Т.А. Силантьева, С.А. Ерофеев // Материалы научной конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей.- СПб, 2004. – С.13-14.
6. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method / S.N. Danilchenko, O.V. Kalinkevich, M.V. Pogorelov [et. all] // Journal of Biomedical Materials Research Part A – 2011. – Vol. 96A, № 4. – P. 639 – 647.
7. Gerstenfeld L.C. Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing / L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn // J. Musculoskel Neuron Interact. – 2003. – Vol. 3, № 4. – P. 297 – 303.

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОСТНОГО РЕГЕНЕРАТА ПРИ УСЛОВИИ КЛЕТОЧНОГО ОБЕЗВОЖИВАНИЯ ОРГАНИЗМА

Слисаренко О. В.

Сумский государственный университет

ул. Римского-Корсакова, 2, 40007, Сумы, Украина

Исследование проведено на белых лабораторных крысах-самцах зрелого возраста, которым наносился дырчатый дефект большеберцовой кости на фоне смоделированного клеточного обезвоживания. Сначала эксперимента происходит нарушение процентного содержания клеточных элементов регенерата, причем, с ростом степени дегидратации изменения приобретают большую выраженность. Далее наблюдаются дисрегенераторные изменения и задержка формирования тканевых структур, что проявляется наличием остатка грануляционной ткани на 15 сутки при средней и тяжелой степенях и фибронетикулярной - на 24 сутки при тяжелой степени, что не характерно для контрольной

группы животных. Вместе с этим происходит снижение содержания основных химических элементов, нарушение микротвердости в сторону ухудшения и задержка роста кости в целом. Следствием этих изменений является общая задержка формирования костной мозоли.

Ключевые слова: травма, большеберцовая кость, репаративная регенерация, клеточная дегидратация.

STRUCTURAL CHANGES OF THE BONE REGENERATE DURING CELLULAR DEHYDRATION

Slisarenko O. V.

Sumy State University

2, Rymskogo-Korsakova St., 40007, Sumy, Ukraine

Reparative bones regeneration peculiarities under cellular dehydration were researched on aged laboratory male rats. The shin bone was fractured under cellular dehydration modeling. From the commencement of the experiment the percentage composition of regenerate cells changed. Increasing dehydration caused more changes. Further dehydration conditions resulted in disregenerative changes and tissue structure inhibition, which is evident due to the remains of the granulation tissue on the 15th day under the medium and high dehydration levels and the remains of the fibroreticular tissue – on the 24th day under the high dehydration level. The changes were not detected in the control set of animals. These changes were confirmed with the raster electron microscopy. One can also observe the reduction of the basic chemical elements, hardness disturbance, and general growth inhibition. The result of these changes is general inhibition of callus formation.

Key words: trauma, shin bone, reparative osteogenesis, cellular dehydration.