

УДК 616-001.52

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ И НЕКОЛЛАГЕНОВЫХ БЕЛКОВ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ПРОЦЕССЕ ОСТЕОРЕПАРАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕПАРАТА «ВИНФАР»**Миханов В.А., Полякова В.С., Мхитарян Е.Е., Мещеряков К.Н., Бакаева Н.Р., Шурыгина Е.И.***ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург, e-mail: vmikhanov@gmail.com*

В ходе эксперимента выполнялись открытые переломы большеберцовой кости крыс с последующей инъекцией в область перелома препарата «Винфар» и иммуногистохимическим исследованием микропрепаратов тканей зоны перелома. В результате были выявлены особенности динамики изменений содержания коллагеновых и неколлагеновых белков межклеточного матрикса в костной мозоли при заживлении перелома диафиза кости на различных сроках репаративного гистогенеза костной ткани при использовании препарата «Винфар». Было установлено, что в опытной группе показатели синтеза коллагена II на всех сроках эксперимента значительно ниже таковых по сравнению с контролем. Относительная объемная плотность коллагена II типа в эндостальной мозоли всегда меньше таковой в периостальной мозоли. Уменьшение в эндостальной мозоли коллагена I и II типа в опыте на 28, а в контроле на 44 сутки эксперимента объясняется её редукцией, соответственно более ранней в опытной группе. Уменьшение содержания остеокальцина происходит в более ранние сроки по сравнению с коллагеновыми белками, что, вероятно, связано с меньшей молекулярной массой остеокальцина и, следовательно, большей скоростью катаболизма. Экспериментально доказано, что консолидация перелома диафиза большеберцовой кости при применении препарата «Винфар» происходит в более ранние сроки.

Ключевые слова: фактор роста фибробластов, коллаген, остеокальцин, «Винфар»**IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF TRENDS IN THE COLLAGEN AND NON-COLLAGEN PROTEINS EXTRACELLULAR MATRIX IN THE PROCESS OF USING THE DRUG OSTEOREPARATION «VINFAR»****Mikhanov V.A., Polyakova V.S., Mkhitaryan E.E., Mescheryakov K.N., Bakaeva N.R., Shurygina E.I.***Orenburg State Medical University, Orenburg, e-mail: vmikhanov@gmail.com*

In the experiment performed open tibial fractures with subsequent injections in rats to fracture the drug «Vinfar» and immunohistochemical studies of tissue photomicrographs of fracture zones. As a result, the peculiarities of the dynamics of changes in the content of collagen and non-collagenous proteins in the extracellular matrix in the healing callus bone shaft fractures at different dates reparative histogenesis of bone tissue using the drug «Vinfar». It has been found that the performance in the test group II collagen synthesis at all stages of the experiment is much lower compared with those of controls. The relative volume density of type II collagen in endosteal callus is always less than that of the periosteal callus. Decrease in endosteal callus collagen type I and II in the experiment at 28, and the control on day 44 of the experiment is explained by its reduction, respectively, earlier in the test group. Reduction of osteocalcin occurs at an earlier timing compared to collagenous proteins, which is probably due to the lower molecular weight osteocalcin and hence greater rate of catabolism. It is experimentally proved that the consolidation of the fracture of the tibial shaft when using the drug «Vinfar» occurs at an earlier date.

Keywords: fibroblast growth factor, collagen, osteocalcin, «Vinfar».

Репарация костной ткани является одной из важнейших проблем регенеративной медицины, особенно травматологии, реконструктивной хирургии, стоматологии [4]. Ежегодно в мире травматизм, связанный с переломами костей, растет. При этом большой проблемой является высокая степень инвалидизации, закономерно увеличивающаяся с возрастом пострадавших [3]. В связи с этим перед современной медициной возникает задача стимуляции посттравматической регенерации костной ткани, особенно при ограничении собственных компенсаторных реакций организма,

обусловленном различными этиологическими факторами [1]. На процесс заживления переломов костей большое значение оказывает качественное и количественное содержание белков межклеточного матрикса костной ткани в области перелома на различных сроках остеорепарации, продуцируемых клетками фибробластического, хондробластического и остеобластического дифференнов. Местная стимуляция пролиферативной активности клеток выше перечисленных дифференнов – один из путей решения задачи активации посттравматической остеорепарации. С этой целью

используют стимуляторы регенерации – репаранты, к которым относятся факторы роста и, в частности, фактор роста фибробластов (ФРФ) [6].

В 2011 году на кафедре травматологии и ортопедии Оренбургской государственной медицинской академии разработан препарат «Винфар», содержащий ФРФ (Патент № 2427644 от 27.08.2011), выделенный из метаболитов штамма бактерий *Bacillus subtilis* 804.

Цель исследования – изучение особенностей динамики изменений содержания коллагеновых и неколлагеновых белков межклеточного матрикса в костной мозоли при заживлении перелома диафиза кости в условиях применения препарата «Винфар».

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование проведено на 70 половозрелых крысах-самцах линии «Вистар». Все исследования на животных были выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза СССР от 13.11.1984 г. № 724). Животным под ингаляционным наркозом формировали открытый поперечный перелом средней трети диафиза левой большеберцовой кости. В опытной группе (ОГ) животным в область перелома на 1 и 2 сутки эксперимента вводили по 0,5 мл препарата «Винфар», в контрольной группе (КГ) – 0,5 мл физ. раствора. Осуществлена естественная иммобилизация посредством сохранившей целостность малоберцовой кости. Животных выводили из опыта на 3, 14, 21, 28, 44 и 61 сутки. Фрагменты отломков костей с костной мозолью фиксировали в 10% нейтральном формалине (на фосфатном буфере) с последующей декальциацией смесью: Трилон Б + 40% NaOH + H₂O (дист.), обезвоживанием в спиртах возрастающей крепости, заливкой кусочков парафином – целлоидином и изготовлением гистосрезов толщиной 5,0 мкм. Исследования проводили с использованием гистологических, иммуногистохимических методов и морфометрии. Гистологическое исследование включало окраску гематоксилином Майера и эозином. При проведении иммуногистохимических методов исследования для выявления экспрессии Osteocalcin (маркер созревания костной ткани), collagen II (маркер хондрогенеза) и collagen I (в нашем исследовании – маркер остеогенеза) использовались соответственно антитела anti-Osteocalcine («SPRING Bioscience», США), anti-Collagene II Type и anti-Collagene I Type («GeneTex», США). Используемая система детекции – Reveal Polyvalent HRP – DAB Detection System («SPRING Bioscience», США). Подсчет площади остеокальцина и коллагеновых волокон производился в относительных значениях (относительная объемная плотность – ООП), как отношение площади остеокальцина и/или коллагеновых волокон к общей площади тканевых элементов, в пределах исследуемого гистосреза на 1 микрофотографии (равной 1 полю зрения) при увеличении x300 минимум в 5 полях зрения (микрофотографий) для каждого показателя. При проведении статистической обработки результатов вычисляли средние значения абсолютных и относительных величин (M), ошибки средних величин (m) и t-критерий

Стьюдента. Различия считали достоверно значимыми, при уровне вероятности $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На 3 сутки у животных контрольной группы (КГ) в периостальной зоне перелома синтез остеокальцина незначителен и составляет $0,218 \pm 0,009\%$, тогда как в опытной группе (ОГ) ООП остеокальцина в 2 раза выше – $0,423 \pm 0,013\%$ (рис. 1). Экспрессия коллагена I типа в ОГ (ООП $9,40 \pm 0,62\%$) больше таковой группы контроля (ООП $3,92 \pm 0,31\%$) почти в 3 раза. У животных контрольной группы ООП коллагена II типа составляет $4,77 \pm 0,11\%$, что незначительно превышает данный показатель в ОГ (ООП коллагена II типа $4,03 \pm 0,08\%$).

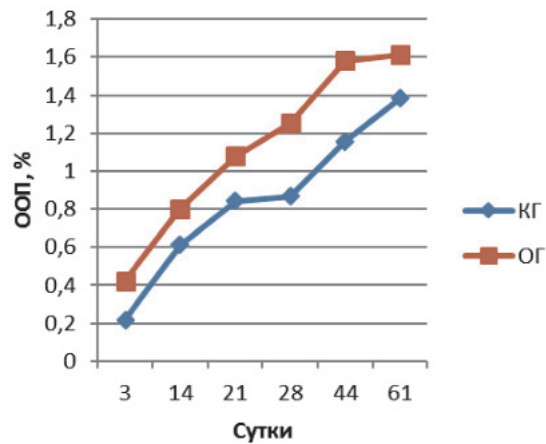


Рис. 1. ООП остеокальцина в периостальной мозоли

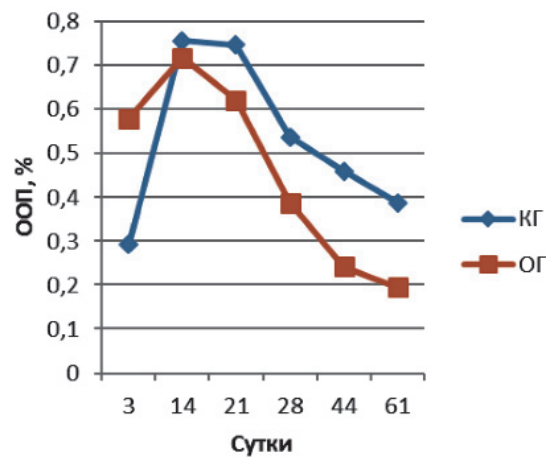


Рис. 2. ООП остеокальцина в эндостальной мозоли

В эндостальной костной мозоли на 3 сутки эксперимента содержание остеокальцина в ОГ вдвое больше КГ и незначительно превышает аналогичные показатели

периостальной зоны (ООП остеокальцина КГ $0,293 \pm 0,011\%$ и ООП остеокальцина ОГ $0,579 \pm 0,013\%$) (рис. 2). ООП коллагена I типа в эндостальной мозоли в обеих группах втрое, а ООП коллагена II типа – четырехкратно меньше, чем в периостальной мозоли (рис. 3, 4).

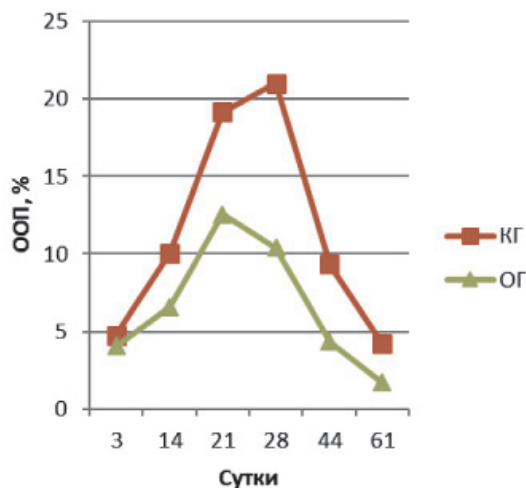


Рис. 3. ООП коллагена II типа в периостальной мозоли

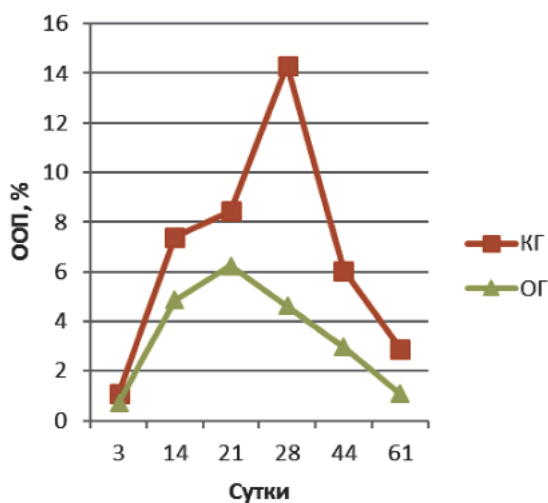


Рис. 4. ООП коллагена II типа в эндостальной мозоли

На 14 сутки у животных КГ в периостальной зоне перелома ООП остеокальцина составляет $0,612 \pm 0,024\%$, а в ОГ ООП остеокальцина – $0,802 \pm 0,031\%$. Экспрессия коллагена I типа в ОГ (ООП $15,21 \pm 0,23\%$) на этом сроке, по сравнению с предыдущим, значительно возрастает и по-прежнему больше таковой группы контроля (ООП $9,24 \pm 0,12\%$). У животных контрольной группы ООП коллагена II типа составляет $10,04 \pm 0,16\%$, что почти двукратно превышает данный показатель в ОГ (ООП коллагена II типа $6,58 \pm 0,27\%$).

В эндостальной костной мозоли на 14 сутки эксперимента содержание остеокальцина в КГ (ООП $0,757 \pm 0,007\%$) незначительно превышает ООП остеокальцина ОГ ($0,718 \pm 0,008\%$). ООП коллагена I типа эндостальной мозоли в КГ – $3,33 \pm 0,08\%$, в ОГ – $6,97 \pm 0,13\%$. ООП коллагена II типа КГ – $7,41 \pm 0,22\%$, в ОГ – $4,86 \pm 0,39\%$.

На 21 сутки у животных КГ в периостальной зоне перелома ООП остеокальцина составляет $0,841 \pm 0,035\%$, а в ОГ ООП остеокальцина – $1,078 \pm 0,027\%$. Экспрессия коллагена I типа в ОГ (ООП $20,7 \pm 1,01\%$) на этом сроке возрастает и по-прежнему больше таковой группы контроля (ООП $11,25 \pm 1,12\%$). У животных контрольной группы ООП коллагена II типа составляет $19,16 \pm 0,98\%$, в ОГ ООП коллагена II типа – $12,55 \pm 0,52\%$, т.е. происходит двукратное увеличение экспрессии коллагена II по сравнению с предыдущим сроком.

В эндостальной костной мозоли на 21 сутки эксперимента содержание остеокальцина в КГ (ООП $0,747 \pm 0,008\%$) незначительно превышает ОГ (ООП $0,621 \pm 0,013\%$), ООП остеокальцина которой меньше значений предыдущего срока, что означает более раннее (по сравнению с КГ) начало редукции эндостальной мозоли. ООП коллагена I типа эндостальной мозоли в КГ – $8,47 \pm 0,89\%$, в ОГ – $19,24 \pm 1,72\%$. ООП коллагена II типа КГ – $8,44 \pm 0,36\%$, в ОГ – $6,25 \pm 0,32\%$.

На 28 сутки у животных КГ в периостальной зоне перелома содержание остеокальцина по сравнению с предыдущим сроком почти не изменяется и составляет $0,866 \pm 0,023\%$, тогда как в ОГ ООП остеокальцина увеличивается на четверть и достигает $1,253 \pm 0,056\%$. Экспрессия коллагена I типа в ОГ (ООП $29,85 \pm 1,03\%$) на этом сроке возрастает на треть и по-прежнему больше таковой группы контроля (ООП $16,23 \pm 1,08\%$). У животных контрольной группы ООП коллагена II типа составляет $21,01 \pm 1,12\%$, в ОГ ООП коллагена II типа – $10,38 \pm 1,02\%$, т.е. в ОГ в отличие от КГ происходит уменьшение экспрессии коллагена II по сравнению с предыдущим сроком, что, вероятно, связано с хондролизом хряща и остеогенной реорганизацией периостальной мозоли (это подтверждается увеличением ООП коллагена I типа, см. выше).

В эндостальной костной мозоли на 28 сутки эксперимента содержание остеокальцина уменьшается в обеих группах животных, но тем не менее в КГ ООП ($0,538 \pm 0,019\%$) двукратно превышает ООП остеокальцина ОГ ($0,288 \pm 0,012\%$), что подтверждает более выраженную

редукцию эндостальной мозоли в опытной группе по сравнению с контролем. ООП коллагена I типа эндостальной мозоли в КГ продолжает увеличиваться – $10,52 \pm 0,07\%$, тогда как в ОГ двукратно уменьшается – $12,09 \pm 0,22\%$, так же, как и уменьшение содержания остеокальцина, подтверждая развитие эндостальной мозоли в КГ и выраженность процесса её редукции в ОГ на данном сроке эксперимента. ООП коллагена II типа КГ – $14,32 \pm 0,72\%$, в ОГ – $4,61 \pm 0,41\%$.

На 44 сутки у животных КГ в периостальной зоне перелома ООП остеокальцина составляет $1,156 \pm 0,034\%$, а в ОГ ООП остеокальцина уже на данном сроке достигает значений (ООП $1,582 \pm 0,026\%$), близких с ООП нормальной (около 1,6%) костной ткани [2]. Экспрессия коллагена I типа в ОГ (ООП $42,43 \pm 2,21\%$) на этом сроке возрастает на четверть и по-прежнему двукратно больше таковой группы контроля (ООП $21,23 \pm 1,94\%$) (рис. 5). У животных контрольной группы ООП коллагена II типа составляет $9,35 \pm 0,97\%$, в ОГ ООП коллагена II типа – $4,33 \pm 0,82\%$, т.е. происходит уменьшение экспрессии коллагена II в обеих группах по сравнению с предыдущим сроком, из-за остеогенной реорганизацией периостальной мозоли, что также подтверждается увеличением ООП коллагена I типа, см. выше.

достальной мозоли в ОГ по сравнению с контролем. ООП коллагена I типа эндостальной мозоли в КГ все еще увеличивается – $12,2 \pm 0,49\%$, тогда как в ОГ уменьшается – $8,75 \pm 0,53\%$, подтверждая развитие эндостальной мозоли в КГ и продолжение процесса её редукции в ОГ на данном сроке эксперимента. ООП коллагена II типа КГ – $6,04 \pm 0,12\%$, в ОГ – $2,97 \pm 0,47\%$.

На 61 сутки у животных КГ в периостальной зоне перелома ООП остеокальцина увеличивается на четверть по сравнению с предыдущим сроком и достигает $1,384 \pm 0,028\%$, а в ОГ ООП остеокальцина почти не изменяется, составляя $1,612 \pm 0,031\%$. Экспрессия коллагена I типа в ОГ (ООП $69,25 \pm 2,23\%$) на этом сроке возрастает более чем на треть и на треть больше таковой группы контроля (ООП $46,09 \pm 1,74\%$), на данном сроке достигая значений близких с ООП коллагена I нормальной (около 70,0%) костной ткани [2]. У животных контрольной группы ООП коллагена II типа составляет $4,19 \pm 0,13\%$, в ОГ ООП коллагена II типа – $1,68 \pm 0,09\%$, т.е. происходит двукратное уменьшение экспрессии коллагена II в обеих группах по сравнению с предыдущим сроком, из-за остеогенной реорганизации периостальной мозоли, что также подтверждается увеличением ООП коллагена I типа, см. выше.

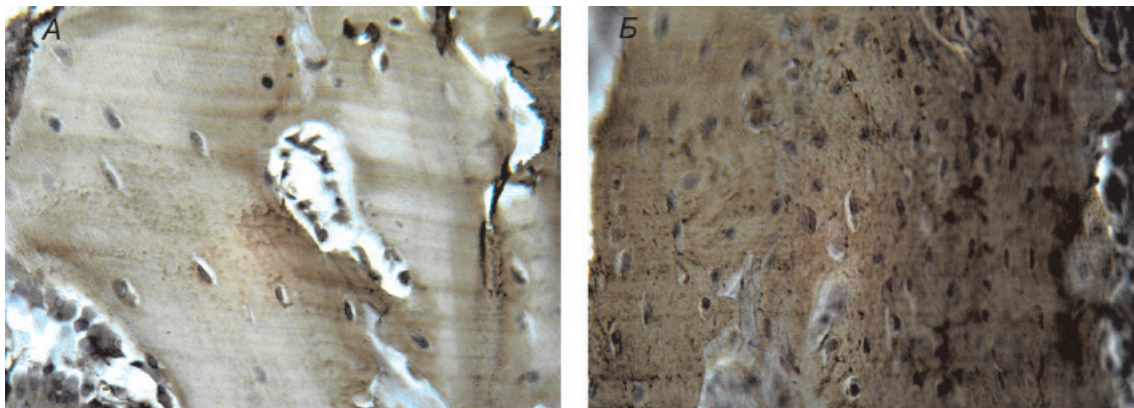


Рис. 5. А – контрольная группа, периостальная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа (коричневого цвета), об. ув. х 600; Б – опытная группа, периостальная зона перелома (мозоль), иммуногистохимическая реакция на выявление экспрессии коллагена I типа (коричневого цвета), об. ув. х 600

В эндостальной костной мозоли на 44 сутки эксперимента содержание остеокальцина продолжает уменьшаться в обеих группах животных и по-прежнему, в КГ ООП ($0,460 \pm 0,017\%$) двукратно превышает ООП остеокальцина ОГ ($0,242 \pm 0,028\%$) из-за более выраженной редукции эн-

В эндостальной костной мозоли на 44 сутки эксперимента содержание остеокальцина продолжает уменьшаться в обеих группах животных и по-прежнему в КГ ООП ($0,388 \pm 0,008\%$) двукратно превышает ООП остеокальцина ОГ ($0,195 \pm 0,017\%$) из-за более выраженной редукции эн-

эндостальной мозоли в ОГ по сравнению с контролем. ООП коллагена I типа эндостальной мозоли в КГ начинает уменьшаться только на данном сроке – $8,87 \pm 0,05\%$, подтверждая только начавшийся процесс редукции эндостальной мозоли, тогда как в ОГ ООП коллагена I типа составляет $8,01 \pm 0,02\%$, достигая значений близких с ООП коллагена I нормальной костной ткани (около 7,0–8,0%). ООП коллагена II типа в КГ – $2,9 \pm 0,03\%$, в ОГ – $1,09 \pm 0,02\%$.

Заключение

В обеих сравниваемых группах сращение отломков кости проходит хрящевую стадию, подтверждаемую экспрессией коллагена II типа, но в ОГ из-за преобладания интрамембранного остеогенеза показатели синтеза коллагена II на всех сроках эксперимента значительно ниже таковых по сравнению с контролем. ООП коллагена II типа при сопоставимых сроках в эндостальной мозоли всегда меньше таковой в периостальной мозоли, что объясняется лучшей неоваскуляризацией эндостальной костной мозоли и, следовательно, оксигенацией эндостальной зоны перелома из-за более значительной миграции предшественников эндотелиоцитов со стороны эндоста и красного костного мозга. Уменьшение в эндостальной мозоли ООП коллагена I и II типа в опыте на 28, а в КГ только на 44 сутки эксперимента объясняется её редукцией, соответственно более ранней в ОГ. При этом уменьшение ООП остеокальцина происходит в более ранние сроки по сравнению с коллагеновыми белками, что, вероятно, связано с меньшей молекулярной массой остеокальцина и, следовательно, большей скоростью катаболизма. Отсутствие значимого увеличения остеокальцина в периостальной зоне перелома у животных ОГ в отличие от КГ на 61 сутки эксперимента (по сравнению с 44 сутками) подтверждает завершение реорганизации периостальной костной мозоли в компактное вещество кортикальной кости диафиза.

Таким образом, динамика изменений коллагеновых и неколлагеновых белков эндостальной и периостальной мозолей в процессе заживления перелома диафиза большеберцовой кости подтверждает более

ранние сроки консолидации при применении препарата «Винфар», что, вероятно, обусловлено мощным ангиогенным воздействием входящего в его состав ФРФ, а также влиянием на пролиферативную активность клеток хондрогенного и остеогенного дифференоров, ответственных за синтез соответствующих белков межклеточного матрикса.

Список литературы

1. Алексеев А.А., Бобровников А.Э. Местное применение стимуляторов регенерации для лечения ран // *Комбустиология*. – 2010. – Вып. 41. – С. 5–15.
2. Вавилова Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие. – 2-е изд., испр. и доп. – 2008. – 208 с.
3. Марков Д.А. Стимуляция репаративного гистогенеза при лечении диафизарных переломов длинных костей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 2008. – 23 с.
4. Омеляненко Н.П. Современные возможности оптимизации репаративной регенерации костной ткани / Н.П. Омеляненко, С.П. Миронов, Ю.И. Денисов-Никольский и др. // *Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. – 2002. – № 4. – С. 85–88.
5. Kanczler J.M., Oreffo R.O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone // *Eur. Cell Mater*. – 2008. – Vol. 15. – P. 100–114.
6. Ornitz D.M. Fibroblast growth factors // *Genon Biology*. – 2001. – № 2. – P. 3005.1–3005.12.

References

1. Alekseev A.A., Bobrovnikov A.E. *Kombustiologiya*, 2010, no. 41, pp. 5–15.
2. Vavilova T.P. *Biokhimiya tkanei i zhidkosti polostei rta: uchebnoe posobie*, 2-e izd., ispr. i dop., 2008, 208 p.
3. Markov D.A. *Stimulyatsiya reparativnogo gistogenez pri lechenii diafizarnykh perelomov dlennykh kostei*, Avtoref. dis. kand. med. nauk, Saratov, 2008, 23 p.
4. Omel'yanenko N.P., Mironov S.P., Denisov-Nikolskii Yu.I. i dr. *Vestn. travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova*, 2002, no. 4, pp. 85–88.
5. Kanczler J.M., Oreffo R.O. *Eur. Cell Mater*, 2008, Vol. 15, pp. 100–114.
6. Ornitz D.M. *Genon Biology*, 2001, no. 2, pp. 3005.1–3005.12.

Рецензенты:

Стадников А.А., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, Оренбургский государственный медицинский университет, г. Оренбург;

Красиков С.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой химии и фармацевтической химии, Оренбургский государственный медицинский университет, г. Оренбург.