

УДК 616.711-002.5-089

Особенности репаративного остеогенеза в условиях использования синтетического материала на основе сульфата кальция на модели экспериментального туберкулезного остита

С.В. Искровский, М.Л. Витовская, Н.В. Заболотных, Т.И. Виноградова,
А.С. Кафтырев, М.С. Сердобинцев, Е.С. Кириллова, Ю.Н. Левашев

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии»
Минздрава России

The features of reparative osteogenesis in the case of experimental tuberculate ostitis with the application of synthetic calcium sulfate's material

S.V. Iskrovskiy, M.L. Vitovskaya, N.V. Zabolotnuih, T.I. Vinogradova,
A.S. Kaftuirev, M.S. Serdobintsev, E.S. Kirillova, Yu.N. Levashev

St.-Petersburg Research Institute for Phthisiopulmonology of the Ministry of Health
of the Russian Federation

Резюме

Изучены особенности репаративного остеогенеза в условиях использования пластического материала OsteoSet-T для замещения костных дефектов у 12 кроликов на модели экспериментального туберкулезного остита, вызванного чувствительным к противотуберкулезным препаратам стандартизованным штаммом *M. tuberculosis Erdman*. Проведен сравнительный анализ результатов применения OsteoSet-T и аутокостной пластики. Эффективность оценивали через 1 мес. после хирургического вмешательства по данным рентгенологического обследования и гистологического изучения срезов костной ткани. Установлено, что применение OsteoSet-T в сравнении с пластикой аутокостью привело к снижению активности специфического воспаления и к стимуляции репаративного остеогенеза. По данным рентгенологического обследования у животных с пластикой OsteoSet-T

зарегистрированы уменьшение частоты выявления признаков специфического воспаления, рассасывание пластического материала и формирование в зоне операции собственной костной ткани.

Патоморфологическое исследование показало снижение воспалительных и дистрофических изменений костной ткани в области пластики, усиление новообразования остеοидной ткани различной степени дифференцировки и костных балок, активацию мегакариоцитарного и миелоидного ростков кроветворения костного мозга.

Ключевые слова: экспериментальный туберкулезный остит; некрэктомия; пластика дефекта; OsteoSet-T; аутокость; репаративный остеогенез.

Summary

We studied the reparative osteogenesis features during the application of OsteoSet-T in the substitution of bone

defects of 12 rabbits on the experimental model of tuberculate ostitis, caused by the standard strain of *M. tuberculosis Erdman*, sensitive to antitubercular medicaments. We performed the comparative analysis of the results of Osteoset-T and autologous bone plasty. The effectiveness of the method was evaluated 1 month after the surgery according to the data of the X-ray and histology of the bone tissue sections.

The comparison of the Osteoset-T and autologous bone plasty shows that the former one leads to the decrease of specific inflammation activity and stimulates the reparative osteogenesis. The X-ray examination of the animals with the Osteoset-T plasty shows the decrease of the specific

inflammation activity, resolution of the plastic material the growth of a new bone in the zone of performed surgery. Pathomorphological study shows the decrease of inflammatory and dystrophic changes of the bone in the zone of performed plasty, the increase of new osteoid tissue growth with different differentiation degree, the increase of bone bar growth and the activation of megakaryocytic and myeloid sprouts of medullar hematopoiesis.

Keywords: experimental tubercular ostitis; necrectomy; defect plasty; Osteoset-T; autologous bone; reparative osteogenesis.

Введение

Заболеваемость туберкулезом костей и суставов (КСТ) сохраняет лидирующие позиции среди внелегочных локализаций туберкулеза, его доля выросла с 25,7 в 2005 г. до 34,8% в 2012 г. [1]. По частоте поражения среди иных костно-суставных локализаций 10–20% занимает туберкулезный гонит [2]. Одной из главных проблем при хирургическом лечении пациентов, страдающих КСТ, до сих пор остается пластическое замещение дефектов, образующихся в костной ткани после удаления очага специфического воспаления [3]. Поэтому все большую актуальность приобретает поиск новых пластических материалов как природного, так и синтетического происхождения. Применение имплантатов синтетического и природного происхождения при пластике дефектов костной ткани сопровождается определенными рисками, характерными для использования аутологичных и аллогенных костных материалов [4]. К ним можно отнести частичный лизис пересаженной кости, ее усталостное или перестроечное разрушение, развитие гнойной инфекции и иммуногенных реакций в лишенной источника питания кости, а также недостаточность местного кровоснабжения окружающих тканей [5, 6]. Осложнения различной степени тяжести, регистрируемые в 20–49% случаев и нередко требующие повторных вмешательств [7], длительные сроки иммобилизации, необходимые для перестройки костной ткани и приживления трансплантата, значительно увеличивают сроки пребывания больных в стационаре [8].

Одним из современных синтетических материалов является OsteoSet-T — кристаллический сульфат кальция в сочетании с 4% тобрамицином и стеариновой кислотой. OsteoSet-T обладает выраженным остеоиндуктивным действием и в последние годы успешно применяется в хирургии хронического остеомиелита и при ревизионном эндопротезировании крупных суставов [9]. Биосовместимость OsteoSet-T с

костной тканью показана в экспериментальных и клинических исследованиях [10, 11].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей репаративного остеогенеза при применении OsteoSet-T для замещения костных дефектов при хирургическом лечении экспериментального туберкулезного остита.

Материал и методы

Работа выполнена на 12 половозрелых кроликах-самцах породы «шиншилла» массой 2,5–3,0 кг, полученных из питомника лабораторных животных РАМН «Рапполово» (Ленинградская область). Животные содержались в стандартных условиях вивария, пищевой рацион соответствовал приказу Минздрава СССР № 1179 от 10 октября 1983 г. «Нормативы затрат кормов для лабораторных животных», в соответствии с правилами, утвержденными МЗ СССР 06.07.73 со свободным доступом к воде. Исследования проводили в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123 и «Правилами лабораторной практики» (приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»). Туберкулезный остит моделировали по оригинальной методике [12] введением в дистальный эпиметафиз бедра стандартизированной культуры *M. tuberculosis Erdman* (1×10^6 КОЕ), чувствительной к противотуберкулезным препаратам. Анестезиологическое пособие включало: препарат для анестезии золетил (золозепам + тилетамин, Вирбак СА, Франция) в дозе 25 мг/кг массы тела (внутривенно в краевую ушную вену); миорелаксант рометар (xylazinum, Биовет, Чехия) в виде 2% раствора внутримышечно в объеме 1,0–1,5 мл. С целью профи-

лактики инфекционных послеоперационных осложнений проводили 5-дневный курс неспецифической антибиотикотерапии (цефалоспорины 1-го или 2-го поколения).

Животным опытной группы ($n=6$) после рентгенологической визуализации очага специфического воспаления назначали этиотропную терапию (изониазид, 10 мг/кг, подкожно; этамбутол и пиразинамид, 20 мг/кг внутривенно). Через 1 мес. лечения выполняли некрэктомию очага, операционный дефект замещали биокомпозитным материалом OsteoSet-T. В группе сравнения ($n=6$) в качестве трансплантата использовали аутокостный материал, полученный из гребня крыла подвздошной кости. Через 1 мес. после выполнения пластики проводили забор аутопсийного материала для рентгенологических и гистологических исследований. Кроликов выводили из опыта с использованием летальных доз эфирного наркоза. Для гистологического изучения участок кости фиксировали в 10% формалине, декальцинировали трилоном Б, заливали в парафин и окрашивали гематоксилином и эозином, а также азур II-эозином. Исследование препаратов осуществляли при увеличении $\times 150$, $\times 300$ и $\times 600$ с помощью эргономичного микроскопа Olympus BX45, снабженного программным обеспечением Olympus DP-Soft.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием непараметрического критерия U Вилкоксона–Манна–Уитни и Фишера.

Результаты

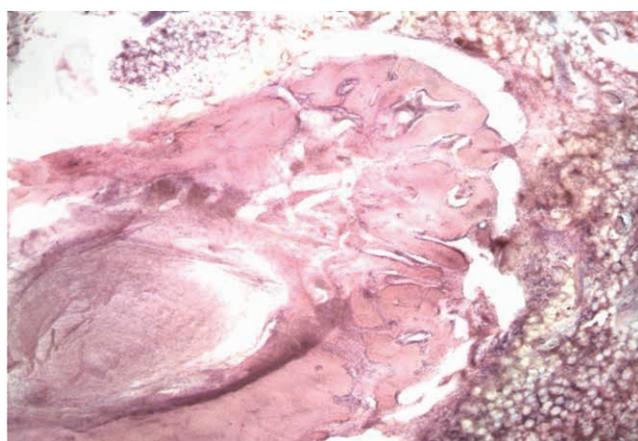
Скорость рассасывания OsteoSet-T, по данным рентгенологического обследования, значительно превышала таковую при использовании аутокостного трансплантата. К моменту окончания эксперимента (1 мес. после пластики) в опытной группе низкая плотность имплантата зарегистрирована в 100% случаев (рис. 1А), тогда как в контрольной группе в 66,7% наблюдений сохранялась визуализация имплантата средней плотности, свидетельствующая о его замедленной перестройке. При этом у кроликов с использованием OsteoSet-T на фоне изменения плотности имплантата обнаружено появление первичных признаков формирования костной ткани по регистрации облаковидного компонента и трабекулярной массы (в 33,3 и в 66,7% случаев в опытной группе против 0% в контрольной группе, $p < 0,05$, рис. 1Б). Параллельно при использовании OsteoSet-T в 2 раза реже отмечался признак воспалительного процесса — периостальная реакция, которая выявлена в 33,3% случаев (при 66,7% случаев в группе с аутопластикой, рис. 1В).

При гистологическом исследовании срезов костной ткани дистального отдела эпиметафиза бедренной кости в условиях применения OsteoSet-T область операционного дефекта по окончании эксперимента у всех животных была заполнена остеοидной тканью различной степени дифференцировки, в которой

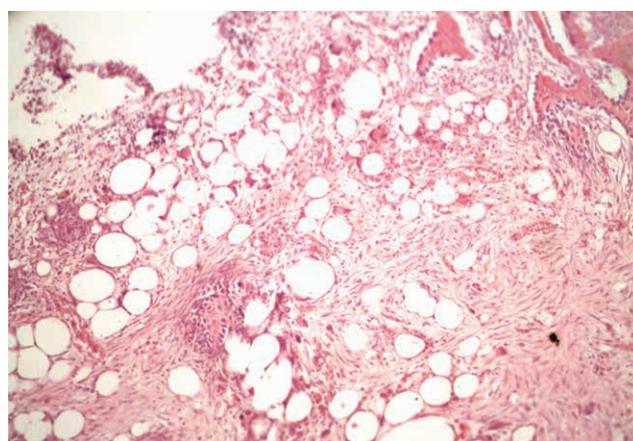


Рис. 1. Микрорентгенограммы коленного сустава кролика с экспериментальным туберкулезным оститом через 1 мес. после пластики OsteoSet-T (А, Б) либо костной аутопластики (В), $\times 6$:

А — стрелкой указана низкая плотность имплантата; Б — стрелкой указан облаковидный компонент; В — стрелкой указана периостальная реакция



А



Б

Рис. 2. Костная ткань кролика с экспериментальным туберкулезным оститом через 1 мес. после костной аутопластики (А) и OsteoSet-T (Б). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$: А — заполнение операционного дефекта в эпиметафизе бедренной кости аутокостью и остеοидной тканью; Б — заполнение операционного дефекта низкодифференцированной остеοидной тканью. Полости различного диаметра на месте гранул декальцинированного материала OsteoSet-T

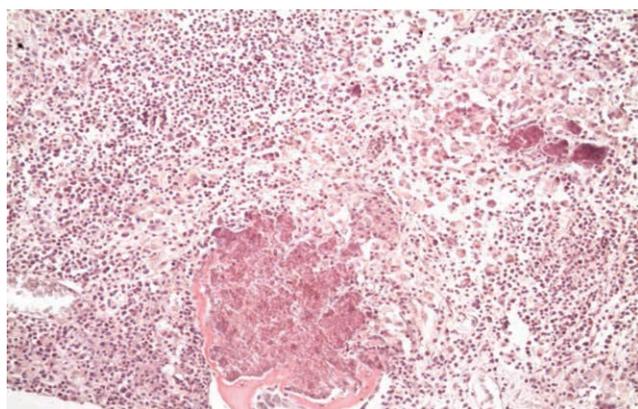
располагались полости округлой формы различного диаметра, вероятно, на месте гранул декальцинированного OsteoSet-T (рис. 2Б). При использовании аутокостного трансплантата область операционного дефекта была заполнена аутокостью и, как и в опытной группе, остеοидной тканью различной степени дифференцировки (рис. 2А).

Признаки активности специфического воспалительного процесса обнаружены у всех животных сравниваемых групп. В костной ткани, окружающей зону пластики, отмечены эпителиοидно-клеточные гранулемы и очаги казеозного некроза с участками ядерного детрита (рис. 3).

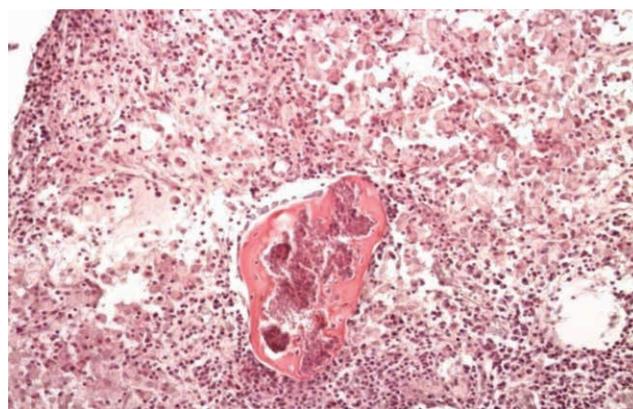
Оценка частоты встречаемости признаков альтерации в опытной и контрольной группах показала, что при использовании OsteoSet-T в 2 раза реже реги-

стрировался некроз костных балок (33,3 против 66,7% случаев при использовании аутокости), в 1,5 раза — их секвестрация (66,7 против 100%, $p < 0,05$), в 1,5 раза — дистрофические изменения в хрящевой ткани (66,7 против 100%, $p < 0,05$, рис. 4А).

Параллельно под влиянием OsteoSet-T наблюдалась более выраженная стимуляция процессов остеогенеза по регистрации новообразованных костных балок, а также остеοидной ткани разной степени дифференцировки (в 100% случаев по обоим признакам против 66,7% при применении костного ауто трансплантата, $p < 0,05$, рис. 4Б). В костном мозге активация репарации при использовании OsteoSet-T отмечена по достоверно большей встречаемости его частичной гиперплазии (в 100% наблюдений при 33,3% у кроликов с костной аутопластикой, $p < 0,001$), большого



А



Б

Рис. 3. Костная ткань кролика с экспериментальным туберкулезным оститом через 1 мес. после костной аутопластики (А) и OsteoSet-T (Б). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 300$:

А — крупный некротический очаг в костной балке и костные секвестры; Б — небольшие некротические очаги в костной балке

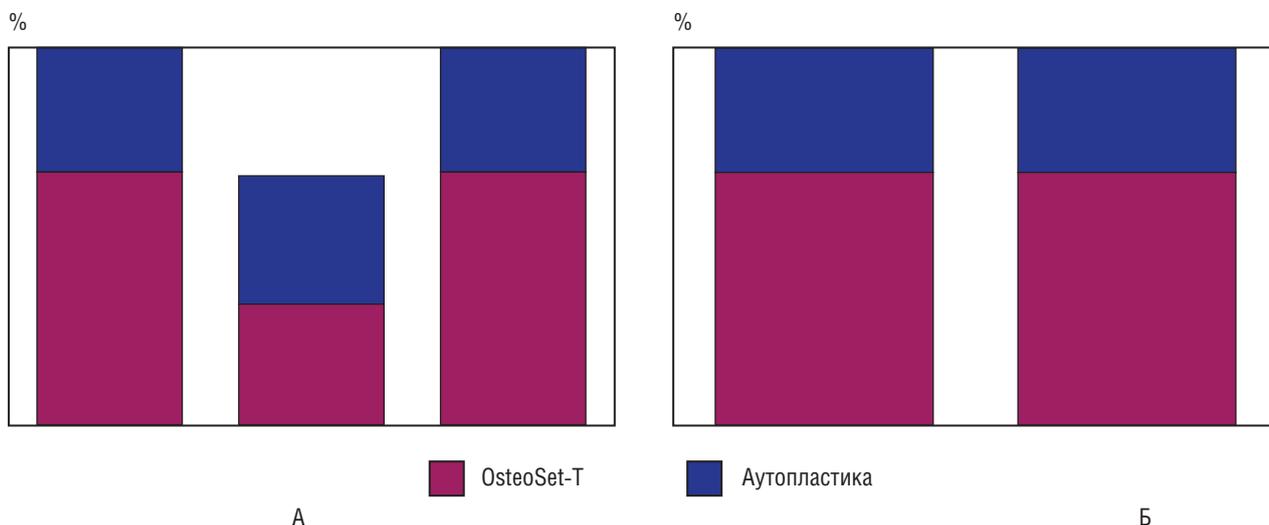


Рис. 4. Частота выявления признаков альтерации костных балок, дистрофии хряща (А), признаков остеогенеза в костной ткани (Б) кроликов с экспериментальным туберкулезным оститом через 1 мес. после пластики OsteoSet-T и костной аутопластики

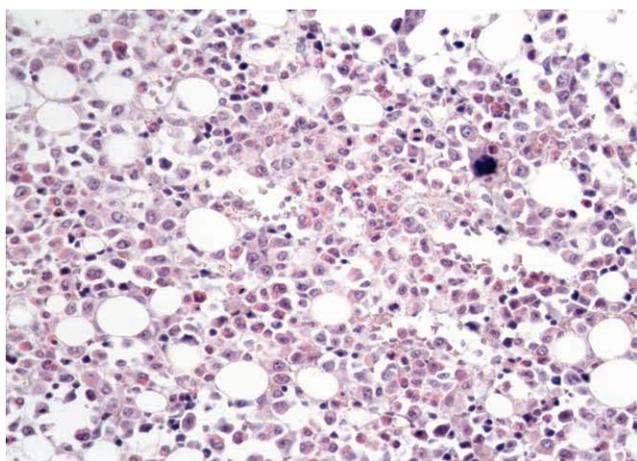


Рис. 5. Костный мозг кролика с экспериментальным туберкулезным оститом через 1 мес. после пластики с применением OsteoSet-T. Много крупных мегакариоцитов, явление эмperiополезиса. Окраска азури-эозина, $\times 600$

количества крупных мегакариоцитов (в 66,7 против 33,3% случаев при аутопластике), а также явлений эмperiополезиса — захвата мегакариоцитами лимфоцитов (в 66,7 против 0%, $p < 0,05$, рис. 5, 6).

Анализ состояния миелоидного роста кроветворения подтвердил стимулирующий эффект OsteoSet-T. В опытной группе животных отмечено появление молодых клеток миелоидного роста (сдвиг влево в 66,7% случаев против 33,3% в группе животных с костной аутопластикой). Фиброзные изменения костного мозга, замедляющие восстановление его структуры, при применении OsteoSet-T выявлялись реже — в 66,7% случаев при 100% у животных с аутопластикой.

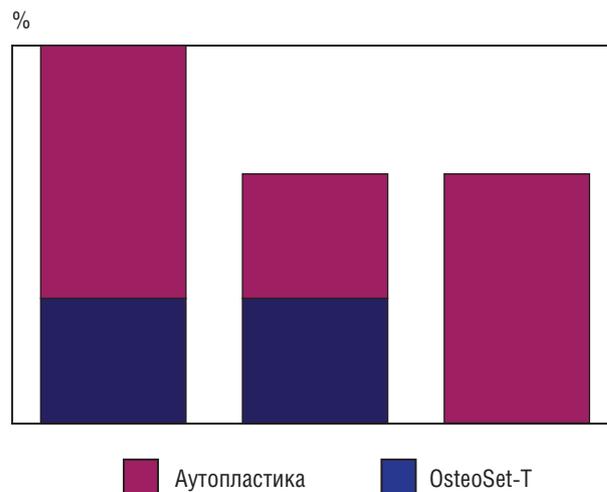


Рис. 6. Встречаемость признаков репарации костного мозга у кроликов с экспериментальным туберкулезным оститом через 1 мес. после пластики OsteoSet-T и аутопластики

Заключение

Таким образом, использование нового синтетического пластического материала OsteoSet-T по сравнению с применением аутокости в пластике костных дефектов у кроликов с экспериментальным туберкулезным оститом привело к снижению активности специфического воспаления и к стимуляции репаративного остеогенеза.

По рентгенологическим признакам и морфологическим данным применение OsteoSet-T уменьшило выраженность процессов альтерации, ускорило перестройку имплантата в собственную костную ткань,

усилило новообразование остеонной ткани различной степени дифференцировки и костных балок, активировало мегакариоцитарный и миелоидный ростки кроветворения костного мозга.

Полученные данные позволяют рекомендовать OsteoSet-T в качестве альтернативы аутокости с целью повышения эффективности хирургического лечения больных костно-суставным туберкулезом.

Список литературы

1. *Нечаева О.Б., Скачков В.В.* Эпидемическая ситуация по внелегочному туберкулезу в Российской Федерации // Туберкулез и болезни легких. — 2013. — № 8. — С. 3–9.
2. *Сердобинцев М.С., Советова Н.С.* Туберкулез костей и суставов конечностей // Руководство по легочному и внелегочному туберкулезу / под ред. чл.-корр. РАМН, проф. Ю.Н. Левашева, проф. Ю.М. Репина. — СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2006. — С. 246–262.
3. Хирургическое лечение костно-суставного туберкулеза / под ред. чл.-корр. РАМН, проф. Ю.Н. Левашева, проф. А.Ю. Мушкина. — СПб.: Стикс, 2008. — 226 с.
4. *Giannoudis P.V., Dinopoulos H., Tsiridis E.* Bone substitutes: an update // *Injury*. — 2005. — Vol. 36. — Suppl. 3. — P. 20–27.
5. *Берченко Г.Н.* Биокompозитный наноструктурированный препарат коллапан в инженеринге костной ткани // Искусственные материалы в травматологии и ортопедии: сб. работ V науч.-практич. семинара. — М., 2009. — С. 7–13.
6. *Топыркин В.Г., Филимонова А.А., Богов А.А.* Современное состояние вопроса костной пластики при лечении асептического некроза полулунной кости // *Гений ортопедии*. — 2012. — № 4, — С. 91–96.
7. *Рерих В.В., Аветисян А.Р.* Заместители костной ткани и тканевая инженерия // Инновационные аспекты научно-исследовательских разработок в области вертебрологии, травматологии и ортопедии, нейрохирургии, нейроонкологии: материалы Всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участием с элементами науч. школы для молодежи, посвященной 90-летию со дня рождения заслуж. деят. науки РСФСР проф. Я.Л. Цивьяна (Цивьяновские чтения). — Новосибирск, 2010. — С. 69–70.
8. *Столяров Е.А., Батаков Е.А., Алексеев Д.Г., Батаков В.Е.* Замещение остаточных костных полостей после некрэквестрэктомии при хроническом остеомиелите // *Гений ортопедии*. — 2009. — № 4. — С. 11–16.
9. *Марковиченко Р.В.* Замещение костных полостей препаратом Osteoset-T при лечении хронического остеомиелита (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2010. — 27 с.
10. *Hickmon S.G., Skinner R.A., Nelson C.L., Smeltzer M.S., Thomas J.R., Olsen K.O.* Efficacy of treatment of experimental osteomyelitis with calcium sulfate pellets containing tobramycin // *Proc. Orthop. Res. Soc.* — 1998. — Vol. 23. — P. 427.
11. *Turner T.M., Urban R.M., Gitelis S., Sumner D.R., Haggard W.O., Parr J.E.* Antibiotic delivery from calcium sulfate as a synthetic bone graft in a canine bone defect // *Proc. Orthop. Res. Soc.* — 1998. — Vol. 23. — P. 597.
12. Способ моделирования туберкулезного остита различной степени тяжести: пат. 2421823 Рос. Федерация № 2009140048/14; заявл. 29.10.09; опубл. 20.06.11. Бюл. №17.

Bibliography

1. *Nechaeva O.B., Skachkov V.V.* Epidemicheskaya situatsiya po vnelegochnomu tuberkulezu v rossiiskoi Federatsii // *Tuberkulez i bolezni legkikh*. — 2013. — № 8. — С. 3–9.
2. *Serdobintsev M.S., Sovetova N.S.* Tuberkulez kostei i sustavov konechnosti // *Rukovodstvo po legochnomu i vnelegochnomu tuberkulezu* / pod red. chl.-korr. RAMN, prof. Yu.N. Levashева, prof. Yu.M. Repina. — SPb.: ELBI-SPb, 2006. — S. 246–262.
3. *Khirurgicheskoe lechenie kostno-sustavnogo tuberkuleza* / pod red. chl.-korr. RAMN, prof. Yu.N. Levashева, prof. A.Yu. Mushkina. — SPb.: Stiks, 2008. — 226 s.
4. *Giannoudis P.V., Dinopoulos H., Tsiridis E.* Bone substitutes: an update // *Injury*. — 2005. — Vol. 36. — Suppl. 3. — P. 20–27. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.029>.
5. *Berchenko G.N.* Biokompозitnyi nanostrukturirovannyi preparat kollapan v inzheneringe kostnoi tkani iskusstvennyye materialy v travmatologii i ortopedii // *Sb. rabot V nauch.-praktich. seminaru*. — M., 2009. — S. 7–13.
6. *Topyrkin V.G., Filimonova A.A., Bogov A.A.* Sovremennoe sostoyanie voprosa kostnoi plastiki pri lechenii aseptichestkogo nekroza polulunnoi kosti // *Genii ortopedii*. — 2012. — № 4, — S. 91–96.
7. *Rerikh V.V., Avetisyan A.R.* Zamestiteli kostnoi tkani i tkanevaya inzheneriya // *Innovatsionnye aspekty nauchno-issledovatel'skikh razrabotok v oblasti vertebrologii, travmatologii i ortopedii, neurokhirurgii, neuroonkologii: materialy Vseros. nauch.-praktich. konf.i s mezhdunar. uchastiem s elementami nauch. shkoly dlya molodezhi, posvyashchenoi 90-letiyu so dnya rozhdeniya zasluž. deyat. nauki RSFSR prof. Ya.L. Tsiv'yana (Tsiv'yanovskie chteniya)*. — Novosibirsk, 2010. — S. 69–70.
8. *Stolyarov E.A., Batakov E.A., Alekseev D.G., Batakov V.E.* Zameshchenie ostatochnykh kostnykh polostei posle nekrekvestrektomii pri khronicheskom osteomielite // *Genii ortopedii*. — 2009. — № 4. — S. 11–16.
9. *Markovichenko R.V.* Zameshchenie kostnykh polostei preparatom Osteoset-T pri lechenii khronicheskogo osteomielita (kliniko-eksperimental'noe issledovanie): avtoref. dis. ... kand. med. nauk. — SPb., 2010. — 27 s.
10. *Hickmon S.G., Skinner R.A., Nelson C.L., Smeltzer M.S., Thomas J.R., Olsen K.O.* Efficacy of treatment of experimental osteomyelitis with calcium sulfate pellets containing tobramycin // *Proc. Orthop. Res. Soc.* — 1998. — Vol. 23. — P. 427.
11. *Turner T.M., Urban R.M., Gitelis S., Sumner D.R., Haggard W.O., Parr J.E.* Antibiotic delivery from calcium sulfate as a synthetic bone graft in a canine bone defect. // *Proc. Orthop. Res. Soc.* — 1998. — Vol. 23. — P. 597.
12. Sposob modelirovaniya tuberkuleznogo ostita razlichnoi stepeni tyazhesti: pat. 2421823 Ros. Federatsii. № 2009140048/14; zayavl. 29.10.09; opubl. 20.06.11. Byul. № 17.