

Репаративная регенерация костной ткани в условиях аллопластики и гипергравитации

ВАК РФ 03.00.25, Гистология, цитология, клеточная биология

Содержание диссертации, кандидата биологических наук, Наумова, Ирина Николаевна

ВВЕДЕНИЕ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о развитии и строении костной ткани и ее морфофункциональных особенностях.

1.2. Костно-пластические материалы и их влияние на характер репаративных процессов в костной ткани

1.3. Повышенная гравитация как метод физического воздействия на репаративные процессы в костной ткани

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Характеристика и объем изученного материала

2.2. Методика моделирования гипергравитации в эксперименте

2.3. Методы исследования репаративных процессов

2.3.1. Гистологические

2.3.2. Морфометрические

2.3.3. Гистоавторадиографический анализ.

2.3.4. Статистический метод

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕПАРАТИВНЫХ

ПРОЦЕССОВ В КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ БИОПЛАСТИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

3.1. Репаративная регенерация костной ткани губчатой формации под кровяным сгустком.

3.2. Репаративная регенерация костной ткани губчатой формации у животных после применения аллопластики

3.3. Репаративный остеогенез в условиях гипергравитации.

3.4. Репаративная регенерация костной ткани губчатой формации в условиях аллопластики и гипергравитации

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ БРЕФООСТЕОМАТРИКСА И ГИПЕРГРАВИТАЦИИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ

СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

4.1. Структурная характеристика клеточной культуры после применения брефоостеоматрикса

4.2. Структурная характеристика культуры клеток после воздействия гипергравитации.

ОБСУЖДЕНИЕ

ВЫВОДЫ

Введение Диссертация по биологии, на тему "Репаративная регенерация костной ткани в условиях аллопластики и гипергравитации"

Способность восстанавливать целостность организма после ранения или утраты ткани является фундаментальным свойством живых существ. Она может быть обнаружена во всех разветвлениях филогенетического дерева - от простейших до высших млекопитающих - и в ходе всего онтогенеза - от раннего дробящегося эмбриона до самых старших представителей в популяции.

Репаративная регенерация костной ткани продолжает оставаться в центре внимания исследователей и практических врачей и по сей день. Несмотря на многообразие способов лечения повреждений опорно-двигательной системы, количество посттравматических осложнений, связанных с нарушением репаративного остеогенеза продолжает расти (Краснов А.Ф., Давыдкин Н.Ф., 1991; Аврунин А.С. с соавт. 1995; Котельников Г.П. с соавт., 1997).

Решение данных вопросов возможно за счет комплекса лечебных мероприятий, основу которых представляют реконструктивные операции (Илизаров Г.А., 1986; Краснов А.Ф., Котельников Г.П., 1990).

Для стимуляции репаративной регенерации костной ткани широко используют разнообразные пластические материалы биологического (Плотников Н.А., 1987, 1993; Демичев Н.П. с соавт. 1984; Нечипоренко В.П. с соавт., 1992) и неорганического происхождения (Katthagen B.D., 1986; Smiler D. et al., 1987). Одной из основ для получения костнопластического материала является незрелая костная ткань плодов -брефокость. Она представляет собой маломинерализованную грубопучковую костную ткань с большим содержанием в ней биологически активных веществ (Бех Н.Д., 1966;

Паникаровский В.В., Григорян А.С., Татинцян В.Г., 1986). Вопросы получения и применения в клинике деминерализованных костных трансплантатов из незрелой костной ткани занимают в ЦНИЛ СамГМУ с 1985 года (Волова Л.Т., 1985-2004).

Исследования сотрудников Самарского государственного медицинского университета убедительно свидетельствуют о положительном влиянии повышенной гравитации с вектором действия центробежных сил кранио-каудального направления на репаративный остеогенез нижних конечностей. Экспериментальные данные показывают, что под влиянием повышенной гравитацией более активно идет формирование костного регенерата и его перестройка (Яшков А.В., Котельников Г.П., Махова А.Н., 1998).

Имеющиеся клинические и экспериментальные сведения позволяют высказать предположение о целесообразности использования гравитационного фактора при повреждении костной ткани. Однако до сих пор не изучено влияние на репаративную регенерацию костной ткани применения аллоимплантата в комплексе с гипергравитацией.

Цель работы

Морфологический анализ регенераторных процессов в костной ткани при использовании комбинации остеогенных факторов в виде деминерализованной аллокости и гипергравитации в эксперименте.

Для реализации поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать экспериментальную модель изучения остеогенеза для оценки влияния брeфоматрикса и гипергравитации и комбинации этих факторов на течение репаративных процессов в костной ткани белых беспородных крыс.
2. Разработать экспериментальную модель изучения влияния брeфоматрикса и гипергравитации на культуре клеток фибробластов.
3. С помощью морфометрических, гистоавторадиографических и биохимических методов дать сравнительную характеристику процессов репаративной регенерации костной ткани и состояния микроциркуляторного русла с применением аллоимплантации и гипергравитации и без применения этих факторов.
4. Дать оценку особенности репаративной регенерации костной ткани при сочетании комплекса данных физических и биопластических факторов.
5. Исследовать влияние каждого из факторов, аллоимплантата и гипергравитации на коллагеногенез по содержанию в культуральной жидкости оксипролина и фибронектина.

6. Изучить структурно-функциональное состояние механоцитов в монослое при применении брeфоматрикса и при действии гипергравитации и оценить полученный эффект с помощью комплекса морфологических и количественных методов анализа.

Научная новизна Впервые в эксперименте на животных установлены особенности действия сочетанных факторов: аллопластики и гипергравитации на характер регенераторных процессов костной ткани. Гистогенез при сочетании факторов отличается от влияния каждого фактора в отдельности образованием хрящевой ткани на первом этапе остеогенеза с конечным образованием пластинчатой костной ткани губчатой формации.

Исследование каждого фактора в отдельности показало общие закономерности изменения морфофункционального состояния механоцитов и специфические отличия, свойственные действию каждого из этих факторов. Впервые с помощью цитологических, гистологических, морфометрических и биохимических методов, использованных на культуре клеток и культуральной жидкости показано, что брeфоостеоматрикс является стимулятором коллагеногенеза. Выявлено влияние гипергравитации на морфофункциональное состояние механоцитов в использованном нами режиме. Установлено, что воздействие повышенной гравитации в используемом нами режиме вызывает гипертрофию фибробластов в культуре клеток.

Разработана модель для изучения воздействия брeфоматрикса и гипергравитации на культуре клеток.

Практическая значимость

Внедрение разработанных способов оптимизации остеогенеза в клиническую практику лечения повреждений опорно-двигательного аппарата позволит заместить костные дефекты в случаях, когда другие способы пластики костной ткани трудно выполнимы, и обеспечить полноценную репаративную регенерацию в месте имплантации ДКТ с замещением дефекта костной тканью.

Положения, выносимые на защиту

1. Брeфоматрикс и гипергравитация как отдельные факторы регуляции остеогенеза стимулируют регенеративные процессы в костной ткани *in vivo*.
2. Комплекс факторов в виде деминерализованной аплости и гипергравитации стимулирует хондрогенез с последующим образованием пластинчатой костной ткани.

3. Метод исследования культуры фибробластов позволяет установить непосредственное влияние на незрелые клеточные культуры механоцитов каждого из изучаемых факторов *in vitro*.

Апробация работы и публикация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 в центральной печати. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на конференции молодых исследователей (г. Самара, 2002), V

Общероссийском съезде анатомов, гистологов и эмбриологов (г. Казань, 2004).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 2 глав собственных исследований, обсуждения, выводов, указателя литературы, включающего 151 отечественных источников и 61 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 6 таблицами, 30 рисунками, в том числе 24 фотографиями морфологических микропрепаратов.

Заключение Диссертация по теме "Гистология, цитология, клеточная биология", Наумова, Ирина Николаевна

выводы

1. После воздействия курса гипергравитации кранио-каудального направления (15 сеансов) у подопытных животных наблюдается формирование ретикулофиброзного регенерата в области дефекта большеберцовой кости. Общая площадь сосудистого русла на участке незрелой костной ткани возрастает за счет увеличения среднего диаметра и количества сосудов микроциркуляторного русла в 3 раза по сравнению с контролем.

2. В эксперименте с применением брeфоостеоматрикса происходит полное заполнение области дефекта большеберцовой кости первичной костной тканью реципиента, которая к 15-17 суткам с момента операции имеет полиморфную картину: большие поля ретикулофиброзной ткани чередуются с участками рыхлой волокнистой соединительной ткани и очагами хрящевой ткани. Формирование новых костных балок особенно активно происходит в области дна дефекта. Общая площадь сосудистого русла в этой зоне незначимо отличается от контроля.

3. При сочетанном применении остеогенных факторов (брeфопластика и гипергравитация) в области дефекта большеберцовой кости образуется костная ткань, имеющая однородную сетчатую структуру. Межтрабекулярное пространство заполняется ретикулярной тканью с большим количеством сосудов микроциркуляторного русла. Особенностью провизорной костной ткани в этом эксперименте является наличие большого количества крупных

хрящевых клеток, замурованных в межклеточном веществе новообразованных костных балок. Такая гистологическая картина наблюдается при непрямом эмбриоостеогенезе и напоминает по своей структуре волокнистый хрящ.

В различных условиях эксперимента, независимо от характера применяемого фактора (два курса гипергравитации по 15 сеансов; сочетание гипергравитации с брeфопластикой; заполнение дефекта только аллогенным брeфоостеоматриксом) на 45-46 сутки после операции наблюдается активный процесс перестройки первичной кости в зрелую пластинчатую костную ткань регенерата. Аллогенный брeфоостеоматрикс, добавленный в культуру крысиных фибробластов (*in vitro*), вызывает стимуляцию морфофункциональной активности фибробластов, пролиферации и синтеза коллагена, о чем свидетельствует значимое повышение уровня белковосвязанного оксипролина в ростовой среде в 10 раз (до 21,49 мкг/мл) по сравнению с контрольной культурой. Воздействие гипергравитации на культуру фибробластов оказывает прямое стимулирующее влияние на клетки соединительной ткани, вызывая активную пролиферацию молодых фибробластов, их гипертрофию и усиление коллагеногенеза. Комплекс морфологических методов исследования и биохимический анализ позволил *in vivo* на ранних этапах регенерации костной ткани выявить особенности гистогенеза, зависящие от характера применяемых остеогенных факторов (гипергравитация, брeфопластика или их сочетание). В поздние сроки во всех сериях эксперимента наблюдается формирование зрелой пластинчатой костной ткани губчатой формации в зоне дефекта.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Экспериментальную модель формирования дефекта в большеберцовой кости крыс можно использовать для изучения процессов, протекающих в поврежденной костной ткани при имплантации различных костно-пластических материалов и воздействии физических факторов.

Эффективным направлением с позиции биоэтики является исследование *in vitro* различных биоматериалов и физических факторов на культуре клеток фибробластов.

Используемая методология исследования биоматериалов и физических факторов на культуре клеток фибробластов с помощью комплекса морфологических, морфометрических и биохимических методов позволяет одновременно оценивать их цитотоксический эффект и влияние на морфофункциональное состояние монослоя и коллагенсинтетическую функцию фибробластов. Результаты исследования позволяют рекомендовать использование брeфоматрикса и гипергравитации для регуляции остеогенеза в поврежденных участках костной ткани различной этиологии.