

УДК 619:617.2:612.115:636.92

РУБЛЕНКО М.В., д-р вет. наук, академік НААН

АНДРІЄЦЬ В.Г., канд. вет. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ЛУГОВСЬКОЇ Е.В., д-р біол. наук, чл.-кор. НАН

ПЛАТОНОВА Т.М., д-р біол. наук

ЧЕРНИШЕНКО Т.М., канд. біол. наук

Інститут біохімії ім. Палладіна НАН України, м. Київ

КЛІНІКО-РЕНТГЕНОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ФІБРИНОВОГО ГЕЛЮ ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ В КРОЛІВ

У статті представлено клініко-рентгенологічне обґрунтування застосування аутологічного фібринового гелю для оптимізації перебігу репаративного остеогенезу в експерименті на кролях. Дослідженням встановлено, що фібриновий згусток, нанесений у зону перелому, на ранніх етапах післяопераційного періоду (сьома доба) проявляє помірну протизапальну дію, яку виявляли у вигляді зменшення інтенсивності еритеми, набряку та болючості м'яких тканин, що сприяє ранній активації репаративного остеогенезу. Доведено, що аутологічний фібриновий згусток, нанесений у зону перелому, локалізує регенеративні процеси в межах травмованих ділянок кісток та сприяє прискоренню кісткової репарації.

Ключові слова: репаративний остеогенез, фібриновий гель, кролі.

Постановка проблеми. Травми кісток у дрібних свійських тварин складають суттєву частину в структурі хірургічної патології [1–4]. Їх лікування потребує комплексного підходу, який, у першу чергу, передбачає забезпечення стабільної фіксації кісткових уламків, а у випадку утворення кісткових дефектів – їх заміщення. Останньому приділяють значну увагу, пропонуючи при цьому використовувати як ауто- чи аллотрансплантанти, так і синтетичні керамічні гідроксиапатити [5–7]. Ряд дослідників [8, 9] пропонують використовувати біологічні матеріали з остеоіндуктивними або остеокондуктивними властивостями для оптимізації репаративного процесу. З цією метою у практичній реконструктивній ортопедії та травматології почали експериментувати з різними композиціями аутологічного фібринового згустку та тромбоцитарної плазми [10, 11], що, однак, не має достатнього клініко-патогенетичного обґрунтування.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Травма будь-яких тканин супроводжується порушенням цілісності судин та кровотечею, зупинка якої забезпечується активацією системи гемостазу з подальшим утворенням тромбу. На початкових етапах це реалізується завдяки активації та агрегації тромбоцитів, а надалі – через активацію каскадних механізмів плазмово-коагуляційного гемостазу [12]. Новоутворений тромб забезпечує не лише місцевий гемостаз, але й виконує функцію тимчасової матриці для інтеграції клітинних елементів у процесі регенерації, яка починається за 3–4-й день після травми. У цей період у товщу фібринового згустка проростають нові капіляри, які забезпечують доставку в зону фібринової матриці лейкоцитів і фібробластів. При цьому макрофаги забезпечують зону пошкодження безперервною цитокиновою підтримкою, що необхідно для стимулювання процесів фіброплазії та подальшого ангиогенезу [13].

У процесі ангиогенезу судинна базальна мембрана і фібрин або інтерстиціальний матрикс деградують разом з ендотеліальними клітинами. У цих місцях нові ендотеліоцити починають мігрувати в матрицю і проліферувати, формуючи нові капілярні трубки [14], а фібробласти – у збагачений фібрином/фібронектином згусток ранової поверхні і синтезують екстрацелюлярний матрикс [15], який поступово заміщує тимчасову фібринову матрицю.

Система гемостазу, крім того, що забезпечує зону пошкодження тимчасовим фібриновим матриксом, опосередковує й функцію регуляції репаративних процесів. Зокрема, інфільтрація гранулоцитів та моноцитів у травмовані тканини регулюється хемоаттрактантами – фібринопептиди, які відщеплюються від фібриногену тромбіном [16], продукти деградації фібрину, утворені внаслідок деградації фібрину плазміном [17], фібронектин [18], ферментативно активний тромбін [19], тромбоцитарний фактор росту (PGF), трансформуючий фактор росту (TGF) [20].

Таким чином, система гемостазу відіграє одну з ключових ролей у механізмах регенеративних процесів у тканинах організму. У випадку ж репаративного остеогенезу наявність фібрино-

вого згустка є не менш важливим фактором, оскільки організований фібрин між обломками кісток є основою для розвитку сполучнотканинної мозолі. Однак спонтанний кров'яний згусток, який формується відразу після перелому кістки, зазвичай, зривається під час репозиції кісткових уламків та безпосередньо під час виконання остеосинтезу. З метою відновлення цього згустка після остеосинтезу нами запропоновано його реставрацію використанням аутологічної плазми крові з подальшою її активацією екамуліном та нанесенням у зону перелому.

Мета дослідження – клініко-рентгенологічне обґрунтування застосування фібринового гелю для оптимізації репаративного остеогенезу у кролів.

Матеріали та методи. Дослідження виконувалися на базі кафедри хірургії та хвороб дрібних свійських тварин Білоцерківського НАУ. В експерименті використовувалися клінічно здорові кролі (n=7) з масою тіла 2,5 кг.

Перелом кістки відтворювали через остеотомію у ділянці діафіза правої променевої кістки. Оперативний доступ виконували на дорсо-латеральній поверхні передпліччя. Остеотомію проводили циркулярною фрезою зі швидкістю 150 об/хв, при цьому для попередження нагрівання кістки її постійно зволожували ізотонічним розчином NaCl. Після цього рану і уламки кісток підсушували, а в зону перелому в дослідній групі (n=4) вносили активовану аутологічну плазму на початкових етапах полімеризації фібрину, яка містила лінкоміцин в дозі 30 мг/мл. В контрольній групі (n=3) фібриновий гель не використовували. Рани шкіри і м'яких тканин зашивали вузловими швами через одну хвилину після нанесення фібринового гелю.

Анестезіологічне забезпечення включало: внутрішньом'язове введення ацепромазин-ксилазинової суміші (ксилазин – 2 мг/кг, ацепромазин – 0,5 мг/кг) та провідникову анестезію плечового нервового сплетіння 2 % розчином лідокаїну в дозі 6 мг/кг.

Активацію згортання плазми виконували додаванням до 100 μ кл цитратної плазми (9:1) 100 μ кл 0,025 М кальцію хлориду та 30 μ кл тромбіноподібного ферменту екамуліну з отрути змії ефі багатолускової.

У післяопераційний період за тваринами вели клінічні спостереження та проводили рентгенодіагностику на 3-, 18- та 35-ту добу.

Результати досліджень та їх обговорення. Клінічно на 3-тю добу після остеотомії у всіх тварин встановлені виражені ознаки запальної реакції операційних ран, зокрема набряк, почервоніння та болючість травмованих тканин. Тварини не опиралися на травмовані кінцівки.

Рентгенологічно констатували (рис. 1, 2) поперечні переломи з добре вираженою лінією фрактури. Лізису країв кісткових уламків не спостерігалось. Реакції з боку ендо- та периосту були відсутніми.



Рисунок 1.– Рентгенограма кісток передпліччя кроля дослідної групи на 3-тю добу



Рисунок 2.– Рентгенограма кісток передпліччя кроля контрольної групи на 3-тю добу

На сьому добу після травмування у дослідних кролів відмічалось зниження інтенсивності прояву запалення. Так, суттєво зменшувалися набряк та болючість м'яких тканин. При цьому була відсутня еритема. Тварини злегка опиралися на хвору кінцівку.

Поряд з цим, у контрольних кролів був добре вираженим набряк, болючість тканин та відмічалися ознаки еритеми. Тварини злегка опиралися на кінцівку.

На 18-ту добу в кролів дослідної групи відсутні ознаки запалення, а рентгенологічно спостерігали (рис. 3) помірну періостальну реакцію зони перелому, утворення сполучнотканинної мозолі (показано стрілкою) з добре вираженими процесами мінералізації (рентгенологічний остеосклероз). Тварини повністю опиралися на кінцівку.

Натомість у тварин контрольної групи (рис. 4) відмічали виражений набряк м'яких тканин (показано білою стрілкою) та помірну їх болючість під час пальпації. Рентгенологічно відмічали масивну, нерівномірну періостальну реакцію, яка локалізувалася поза зоною дефекту (показано чорними стрілками). Спостерігали слабко виражені тканинно-специфічні структури в ділянці дефекту з початковими етапами їх мінералізації.

На 35-ту добу репаративного остеогенезу у кролів дослідної групи (рис. 5, 7) відмічали повну консолідацію кісткових уламків, яка рентгенологічно виявлялася повністю сформованим кортикальним шаром кісток та ледь помітним потовщенням періосту (показано стрілкою). У тварин відмічали повне відновлення функції травмованої кінцівки.

У кролів контрольної групи (рис. 6, 8) на фоні відсутніх ознак запалення на рентгенограмах відмічали також повну консолідацію уламків кісток, відновлення цілісності кортикального шару кістки. Проте травмована кістка ще мала надмірну періостальну реакцію, яка виходила далеко за межі дефекту (показано стрілками). У тварин констатували повне відновлення функції кінцівки.



Рисунок 3. Рентгенограма кісток передпліччя кроля дослідної групи на 18-ту добу



Рисунок 4. Рентгенограма кісток передпліччя кроля контрольної групи на 18-ту добу



Рисунок 5. Рентгенограма кісток передпліччя кроля дослідної групи на 35-ту добу



Рисунок 6. Рентгенограма кінцівки кроля контрольної групи на 35-ту добу



Рисунок 7. Зовнішній вигляд кісткового регенерату кроля дослідної групи на 35-ту добу



Рисунок 8. Зовнішній вигляд кісткового регенерату кроля контрольної групи на 35-ту добу

Висновок. Застосування фібринового гелю у місцях перелому кісток, одержаного за активації згортання аутологічної плазми екамуліном, зменшує клінічний прояв запальної реакції, оптимізує перебіг репаративного остеогенезу, прискорюючи зміну його стадій, та зумовлює більш швидку консолідацію переломів трубчастих кісток з меншим об'ємом кісткового регенерату.

Перспективою подальших досліджень є клініко-експериментальне обґрунтування застосування фібринового гелю за фрактур трубчастих кісток у тварин інших видів з визначенням молекулярно-біологічних механізмів його впливу на репаративний остеогенез.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пустовіт Р.В. Моніторинг хірургічної патології серед дрібних домашніх тварин ДЛВМ у Київському районі м. Одеси за 2003–2005 роки / Р.В. Пустовіт, Ю.М. Данилейко, М.В. Рубленко // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква. – 2006. – Вип. 36. – С. 132–137.
2. Рубленко С.В. Моніторинг ветеринарної допомоги і структура хірургічної патології серед дрібних домашніх тварин в умовах міської клініки / С.В. Рубленко, О.В. Єрошенко // Вісник Сумського НАУ. – Суми, 2012. – Вип. 1 (30). – С. 150–154.
3. Телятніков А.В. Поширення переломів кісток у собак / А.В. Телятніков // Науковий вісник ветеринарної медицини: 36. наук. праць. – Біла Церква, 2013. – Вип. 11 (101). – 149 – 153.
4. Семеняк С.А. Структура переломів кісток у собак в умовах мегаполісу / С.А. Семеняк, С.В. Рубленко, Ю.М. Данилейко // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква. – 2014. – Вип. 13 (108). – С. 218–223.
5. Корж Н.А. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль оптимизации и стимуляции в реконструкции кости / Н.А. Корж, Л.А. Кладченко, С.В. Малышкина // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2008. – № 4. – С. 5–14.
6. Смурна О.В. Застосування екстракортикального остеосинтезу та гідроксилапатиту "керган" при переломах клубової кістки у собак: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.05 „Ветеринарна хірургія” / О.В. Смурна – Біла Церква, 2009. – 20 с.
7. Рубленко М.В. Динаміка біомаркерів репаративного остеогенезу за умов заміщення кісткових дефектів / М.В. Рубленко, С.А. Семеняк, Н.В. Ульянич // Науковий вісник ЛНУВВБТ ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2014. – Т.16, №3 (60), Ч. 1. – С. 287–294.
8. Гамрецький А.А. Активация репаративного остеогенезу при порушеннях довгих кісток: Клініко-експериментальне дослідження: автореф. дис. на здобуття наук. ступ. канд. мед. наук / А.А. Гамрецький. – Вінниця, 2004. – 19 с.
9. Рубленко М.В. Патогенетична роль оксиду азоту в умовах запальнорепаративного процесу при переломах трубчастих кісток у собак та його корекція Імуно-депо / М.В. Рубленко, В.С. Шаганенко // Біологія тварин. – 2011. – Т. 13, №1–2. – С. 340–346.
10. Role of Platelet-Rich Plasma in Acceleration of Bone Fracture Healing / N.A. Smyth, A.M. Haleem, C.D. Murawski, H.T. Do // *Ann Plast Surg.* – 2008. – Vol. 61. – P. 337–344.
11. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review / Balaram Naik, P Karunakar1, M Jayadev1, V Rahul Marshal // *Journal of Conservative Dentistry* Jul-Aug 2013. – Vol 16, Iss. 4. P. 284-293.
12. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз // Современные представления о системе гемостаза / Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н. и др. – К.: Наукова думка, 2005. – С. 13–84.
13. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold / Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, et al. // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – P. 1817–1823.
14. Staton C.A. The role of fibrinogen and related fragments in tumour angiogenesis and metastasis / C.A. Staton, N.J. Brown, C.E. Lewis // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2003. – Vol. 3. – P. 1105–1120.
15. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies / Zavan B., Brun P., Vindigni V. et al. // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26. – P. 7038–7045.

16. Richardson D.L. Chemotaxis for human monocytes by fibrinogen-derived peptides / D.L. Richardson, D.S. Pepper, A.B. Kay. – Br. J. Haematol. – 1976. – Vol. 32. – P. 507–513.
17. Gross T.J. CD11b/CD18 mediates the neutrophil chemotactic activity of fibrin degradation product D domain / T.J. Gross, K.J. Leavell, M.W. Peterson // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol. 77. – P. 894–900.
18. Cryptic chemotactic activity of fibronectin for human monocytes resides in the 120-kDa fibroblastic cell-binding fragment / R.A. Clark, N.E. Wikner, D.E. Doherty, D.A. Norris // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 12115–12123.
19. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action / R. Bar-Shavit, M. Benezra, A. Eldor, E. Hy-Am et al. // *Cell. Regul.* – 1990. – Vol. 1. – P. 453–463.
20. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production / Wahl S.M., Hunt D.A., Wakefield L.M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 5788–5792.

REFERENCES

1. Pustovit R.V. Monitoring hirurgichnoї patologii sered dribnih domashnih tvarin DLVM u Kiïvs'komu rajoni m. Odesi za 2003–2005 roki / R.V. Pustovit, Ju.M. Danilejko, M.V. Rublenko // *Visnik Bilocerkiv. derzh. agrar. un–tu.* – Bila Cerkva. – 2006. – Vip. 36. – S. 132–137.
2. Rublenko S.V. Monitoring veterinarnoi dopomogi i struktura hirurgichnoї patologii sered dribnih domashnih tvarin v umovah mis'koї kliniki / S.V. Rublenko, O.V. Croshenko // *Visnik Sums'kogo NAU.* – Sumi, 2012. – Vip. 1 (30). – S. 150–154.
3. Teljatnikov A.V. Poshirennya perelomiv kistok u sobak / A.V. Teljatnikov // *Naukovij visnik veterinarnoi medicini: Zb. nauk. prac'.* – Bila Cerkva, 2013. – Vip. 11 (101). – 149 – 153.
4. Semenjaj S.A. Struktura perelomiv kistok u sobak v umovah megapolisu / S.A. Semenjaj, S.V. Rublenko, Ju.M. Danilejko // *Visnik Bilocerkiv. derzh. agrar. un–tu.* – Bila Cerkva. – 2014. – Vip. 13 (108). – S. 218–223.
5. Korzh N.A. Implantacionnye materialy i osteogenez. Rol' optimizacii i stimuljacii v rekonstrukcii kosti / N.A. Korzh, L.A. Kladchenko, S.V. Malyskina // *Ortopedija, travmatologija i protezirovanie.* – 2008. – № 4. – S. 5–14.
6. Smurna O.V. Zastosuvannya ekstrakortikal'nogo osteosintezu ta gidroksilapatitu "kergap" pri perelomah klubovoї kistki u sobak: avtoref. dis. na zdobuttja nauk. stupenja kand. vet. nauk: spec. 16.00.05 „Veterinarna hirurgija” / O.V. Smurna – Bila Cerkva, 2009. – 20 s.
7. Rublenko M.V. Dinamika biomarkeriv reparativnogo osteogenezu za umov zamishhennja kistkovih defektiv / M.V. Rublenko, S.A. Semenjaj, N.V. Ul'janich // *Naukovij visnik LNUUVBT im. S.Z. Gzhic'kogo.* – L'viv, 2014. – T.16, №3 (60), Ch. 1. – S. 287–294.
8. Gamrec'kij A.A. Aktivacija reparativnogo osteogenezu pri porushennjah dovghih kistok: Kliniko-eksperimental'ne doslidzhennja: avtoref. dis. na zdobuttja nauk. stup. kand. med. nauk / A.A. Gamrec'kij. – Vinnicja, 2004. – 19 s.
9. Rublenko M.V. Patogenetichna rol' oksidu azotu v umovah zapal'noreparativnogo procesu pri perelomah trubchastih kistok u sobak ta jogo korekcija Imunom-depo / M.V. Rublenko, V.S. Shaganenko // *Biologija tvarin.* – 2011. – T. 13, №1–2. – S. 340–346.
10. Role of Platelet-Rich Plasma in Acceleration of Bone Fracture Healing / N.A. Smyth, A.M. Haleem, C.D. Murawski, H.T. Do // *Ann Plast Surg.* – 2008. – Vol. 61. – P. 337–344.
11. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review / Balaram Naik, P Karunakar1, M Jayadev1, V Rahul Marshal // *Journal of Conservative Dentistry Jul-Aug 2013.* – Vol 16, Iss. 4. R. 284-293.
12. Sosudisto-trombocitarnyj gemostaz // *Sovremennye predstavlenija o sisteme gemostaza / Volkov G.L., Platonova T.N., Savchuk A.N. i dr.* – K.: Naukova dumka, 2005. – S. 13–84.
13. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold / Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, et al. // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – R. 1817–1823.
14. Staton C.A. The role of fibrinogen and related fragments in tumour angiogenesis and metastasis / C.A. Staton, N.J. Brown, C.E. Lewis // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2003. – Vol. 3. – P. 1105–1120.
15. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies / Zavan B., Brun P., Vindigni V. et al. // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26. – P. 7038–7045.
16. Richardson D.L. Chemotaxis for human monocytes by fibrinogen-derived peptides / D.L. Richardson, D.S. Pepper, A.B. Kay. – Br. J. Haematol. – 1976. – Vol. 32. – P. 507–513.
17. Gross T.J. CD11b/CD18 mediates the neutrophil chemotactic activity of fibrin degradation product D domain / T.J. Gross, K.J. Leavell, M.W. Peterson // *Thromb. Haemost.* – 1997. – Vol. 77. – P. 894–900.
18. Cryptic chemotactic activity of fibronectin for human monocytes resides in the 120-kDa fibroblastic cell-binding fragment / R.A. Clark, N.E. Wikner, D.E. Doherty, D.A. Norris // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 12115–12123.
19. Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action / R. Bar-Shavit, M. Benezra, A. Eldor, E. Hy-Am et al. // *Cell. Regul.* – 1990. – Vol. 1. – P. 453–463.
20. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production / Wahl S.M., Hunt D.A., Wakefield L.M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 5788–5792.

Клинико-рентгенологическая характеристика экспериментального применения фибринового геля для оптимизации репаративного остеогенеза у кроликов

М.В. Рубленко, В.Г. Андриец, Е.В. Луговской, Т.Н. Платонова, Т.М. Чернышенко

В статье представлено клинико-рентгенологическое обоснование применения аутологичного фибринового геля для оптимизации течения репаративного остеогенеза в эксперименте на кроликах. Исследованием установлено, что фибриновый сгусток, нанесенный в зону перелома, на ранних этапах послеоперационного периода (седьмые сутки), проявляет умеренное противовоспалительное действие, которое выявляли в виде уменьшения интенсивности эритемы, отека и болезненности мягких тканей, что способствует ранней активации репаративного остеогенеза. Доказано, что аутологичный фибриновый сгусток, нанесенный в зону перелома, локализует регенеративные процессы в пределах травмированных участков костей и способствует ускорению костной репарации.

Ключевые слова: репаративный остеогенез, фибриновый гель, кролики.