

УДК 616-092.9:616.71-003.93

**ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ В ОЦЕНКЕ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗНЫХ МЕТОДОВ СТИМУЛЯЦИИ  
РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ****Барабаш Ю.А., Барабаш А.П., Богомолова Н.В., Кауц О.А.***ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии»  
Министерства здравоохранения РФ», Саратов, e-mail: Oandreevich2009@yandex.ru*

Проведен сравнительный анализ динамики показателей цитокинового профиля в эксперименте на лабораторных животных (кроликах) в разные сроки после чрезкостного остеосинтеза модельного перелома большеберцовой кости и использования стимуляционных воздействий на репаративный остеогенез. В качестве стимуляторов репаративного остеогенеза были применены туннелизация костных отломков, гидродинамическое воздействие на зону перелома и их комбинация. Наиболее быстро восстановление показателей цитокинового профиля до исходных значений происходило в группе со стимуляцией остеогенеза путем туннелизации концов отломков перелома большеберцовой кости. Обращает на себя внимание тот факт, что в данной группе животных нормализация содержания фактора некроза опухоли происходила на неделю раньше, чем в группе сравнения и других опытных группах, что свидетельствует о наибольшей эффективности данного метода стимуляции репаративного остеогенеза.

**Ключевые слова:** эксперимент, стимуляция, репаративный остеогенез, цитокины, перелом**DYNAMICS OF CYTOKINE PROFILE IN ASSESSING THE EFFECTIVENESS  
OF DIFFERENT METHODS OF STIMULATION OF REPARATIVE OSTEOGENESIS  
IN EXPERIMENT****Barabash Y.A., Barabash A.P., Bogomolova N.V., Kauts O.A.***Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics of Ministry of Public Health of the Russian Federation, Saratov, e-mail: Oandreevich2009@yandex.ru*

A comparative analysis of indicators of cytokine profile in the experiment on laboratory animals (rabbits) at different times after transosseous osteosynthesis model of fracture of the tibia and the use of stimulus effects on reparative osteogenesis. As reparative osteogenesis promoters were used tunnelization bone fragments hydrodynamic effect on the fracture zone and a combination thereof. The fastest recovery indicators cytokine profile to baseline values occurred in the group with stimulation of bone formation by tunneling all fragments fracture of the tibia. Attention is drawn to the fact that in this group of animals normalization of tumor necrosis factor occurred a week earlier than in the comparison group and other experimental groups, indicating that the most efficient method of stimulation of reparative osteogenesis.

**Keywords:** experiment, stimulation reparative osteogenesis, cytokines, fracture

Проблема оптимизации хирургического лечения переломов и ложных суставов костей конечностей является основной проблемой современной травматологии и ортопедии. Достижение сращения перелома, восстановления функции повреждённой конечности в максимально короткие сроки позволяет вернуть пациентов к активной трудовой деятельности, повысить качество их жизни. Однако, несмотря на постоянное совершенствование конструкций для остеосинтеза результаты лечения пациентов продолжают неудовлетворять хирургов. В связи с этим перспективы улучшения результатов лечения переломов и их последствий многим исследователям видится в воздействии на процесс репаративной регенерации. Большое разнообразие методик стимуляции репаративного процесса, свидетельствует о существенных различиях в принципах решения этой проблемы [6, 4, 3]. В последние годы в связи с бурным развитием клеточных и нанотехнологий активно исследуются методы воздействия на звенья репаратив-

ной костной регенерации с использованием стволовых мезенхимальных клеток и аутологичного костного мозга. Однако эти перспективные методы воздействия на остеогенез в настоящее время либо находятся в стадии изучения, либо малодоступны из-за технической сложности [5, 8, 9].

Механическая травма (ушибы, ранения тканей и т.д.) с современных позиций рассматривается как неинфекционный флогогенный фактор развития воспаления. Воспаление же направлено на восстановление повреждённых тканей и как любой типовой патологический процесс в основных своих чертах протекает стандартно, независимо от вызвавших его причин, где бы оно ни локализовалось [2]. В связи с этим оценка иммунологического статуса и его изменения под влиянием травмирующего агента, оперативного вмешательства и применяемых методов стимуляции регенерации позволит судить об эффективности методов стимуляции в процессе заживления костной раны.

Цель исследования. Оценка динамики изменений цитокинового профиля при использовании различных методов стимуляции репаративной регенерации костной ткани в эксперименте.

#### Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились 24 экспериментальных животных (кролика), в возрасте 6-7 месяцев, с массой тела 3,3-4,5 кг. Нами выбрана хорошо зарекомендовавшая себя модель с использованием чрескостного остеосинтеза аппаратом внешней фиксации на голени животного. Были изготовлены облегченные модели аппарата Илизарова. Эксперименты на животных проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР от 12.08.1977г. №755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» (по состоянию на 20.10.2006г.), а также Федеральным законом «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999г.

Техника оперативных вмешательств заключалась в следующем: в месте синостиозирования малоберцовой и большеберцовой костей (в средней трети голени) производили поперечный перелом кости, выполняли его остеосинтез облегченной моделью аппарата Илизарова, включающей четыре кольца из сплавов алюминия (вес в собранном виде составляет 190 г, то есть 5% от массы тела животного).

Затем производили один из трех видов стимулирующего воздействия на репаративный процесс, в зависимости от которых были определены группы эксперимента.

В 1-ю группу выделили животных, которыми производили стимуляцию только путём туннелизации проксимального и дистального отломков в двух плоскостях на расстоянии 5 мм от перелома. Во 2-й группе выполняли гидродинамическое воздействие на костномозговое содержимое путём вытеснения последнего под давлением жидкостью (3 мл) через иглу, введённую в проксимальный метадиафиз большеберцовой кости. В 3-й экспериментальной группе выполняли комбинированное воздействие (туннелизацию проксимального и дистального отломков и гидродинамическое воздействие на костномозговое содержимое). В 4-й группе (контрольной) дополнительных воздействий на зону перелома не осуществляли.

После операции выполняли контрольную рентгенографию голени, после чего кролика помещали в клетку. Животным позволялась полная нагрузка на конечности и движение без ограничений после операции.

Для оценки динамики изменений показателей цитокинового профиля при использовании различных методов стимуляции регенерации нами проведены исследования сыворотки крови кроликов до операции и через 1, 2, 3 недели после оперативного вмешательства.

Сыворотку крови кроликов получали путем пункции краевой вены уха и определяли показатели цитокинового профиля (интерлейкин-1, интерлейкин-6, интерлейкин-8, фактор некроза опухоли) методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием микропланшетного ридера Anthos 2020 (сертификат соответствия № РОСС RU.0001.11ИМ02 от 13.01.2010). Для определения показателей использовали следующие тест-системы:

Интерлейкин-1 β -сЕ 90563Rb 96 Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Interleukin 1 Beta (IL-1 β). Organism: *Oryctolagus cuniculus* (Rabbit), сертифицирован – ISO9001:2008, ISO13485:2003; USA (Uscn).

Интерлейкин-6 sE 90079-96 (IL-6). Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Interleukin-6. Organism: *Oryctolagus cuniculus* (Rabbit) – сертифицирован – ISO9001:2008, ISO13485:2003; USA (Uscn).

Интерлейкин-8 sE 90080Rb (IL-8). Organism: *Oryctolagus cuniculus* (Rabbit) – сертифицирован – ISO9001:2008, ISO13485:2003; USA (Uscn).

Фактор некроза опухоли альфа (TNF-α) sE901133 96 – Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α). Organism: *Oryctolagus cuniculus* (Rabbit) – сертифицирован – ISO9001:2008, ISO13485:2003; USA (Uscn).

#### Результаты исследования и их обсуждение

При оценке содержания интерлейкина-1 (IL-1) в сыворотке крови выявлены следующие закономерности: во 2-й и 3-й экспериментальных группах через 1 неделю после операции отмечается резкий подъём (в 2 раза по сравнению с дооперационными значениями) уровня IL-1 в сыворотке крови с последующим его снижением на 2 недели после операции. Во 2-й группе этот показатель возвращается к нормальному уровню через 3 недели, а в 3-й группе уровень IL-1 через 3 недели продолжает сохраняться на высоких цифрах от исходных значений. В 1-й экспериментальной группе содержание IL-1 планомерно нарастает в течение всего послеоперационного периода и достигает максимума через 3 недели, превышая при этом исходный уровень на 30%. В контрольной же (четвёртой) группе этот показатель снижен на протяжении всего послеоперационного периода (на 10-20%).

Уровень интерлейкина-6 (IL-6) в сыворотке крови у животных 1 и 2 групп планомерно нарастал, достигая максимума на 2-й неделе послеоперационного периода (в среднем на 30% от дооперационного уровня), с последующим незначительным понижением ниже исходного уровня на 3-й неделе. В 4-й группе имелась аналогичная картина, но с пиком уровня IL-6 на 2-й неделе после операции. В 3-й группе на протяжении 2 недель после операции отмечается снижение уровня IL-6 с последующим значительным (55%) его повышением выше исходного уровня.

Во 2-й и 4-й (контрольной) группе на 1-й недели после операции наблюдалось небольшое снижение уровня интерлейкина-8 (IL-8) с его последующим повышением (10%) на 2-й недели, а затем значительным снижением (30-50%) ниже исходного уровня. В 1-й группе отмечалось повышение уровня IL-8 в сыворотке крови на 15-20% с последующим его возвращением к исходному уровню на 3-й недели после операции. В 3-й экспериментальной группе наблюдается тенденция к снижению уровня IL-8, который достигает минимальных значений на 3-й недели послеоперационного периода.

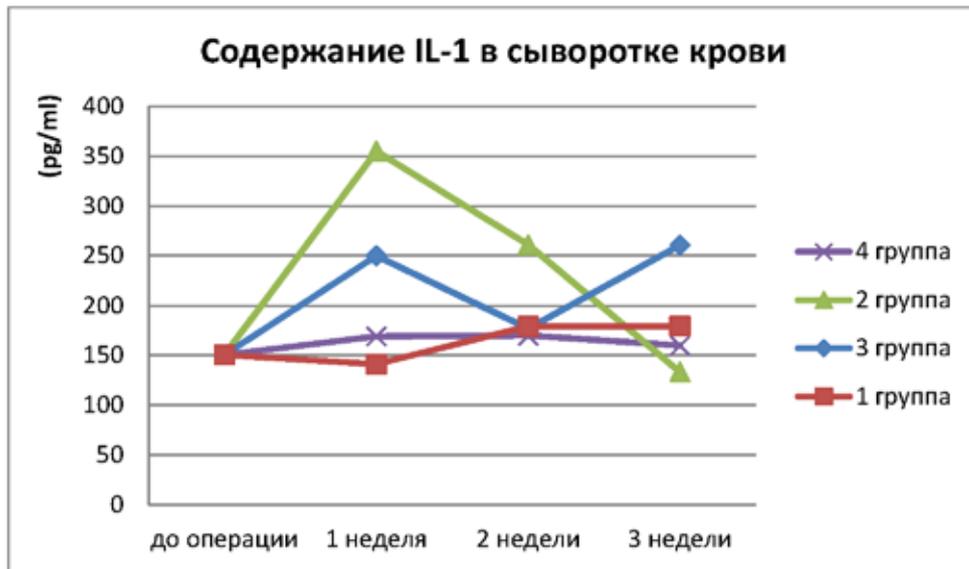


Рис. 1. Динамика содержания IL-1 в сыворотке крови на разных сроках лечения

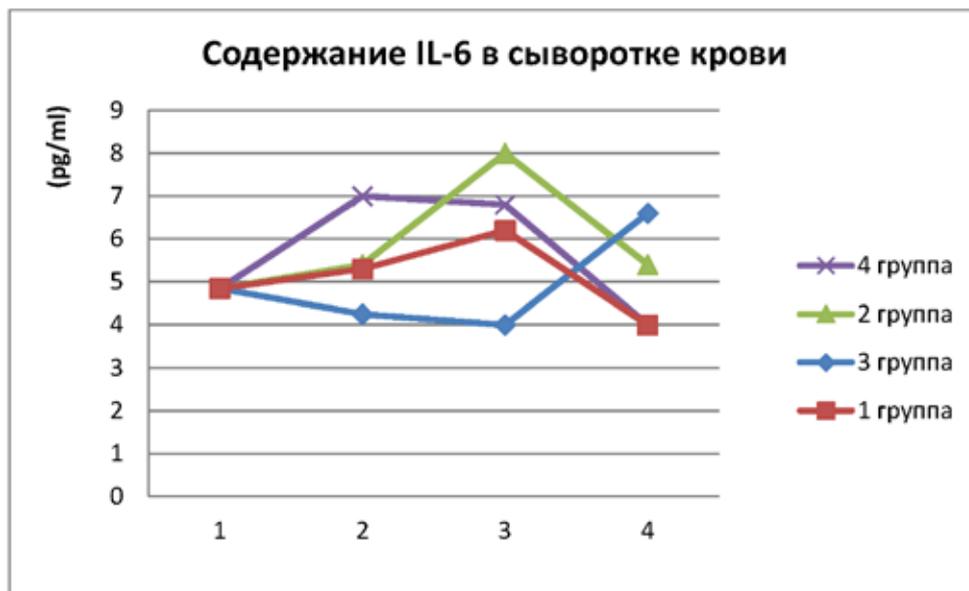


Рис. 2. Динамика содержания IL-6 в сыворотке крови на разных сроках лечения

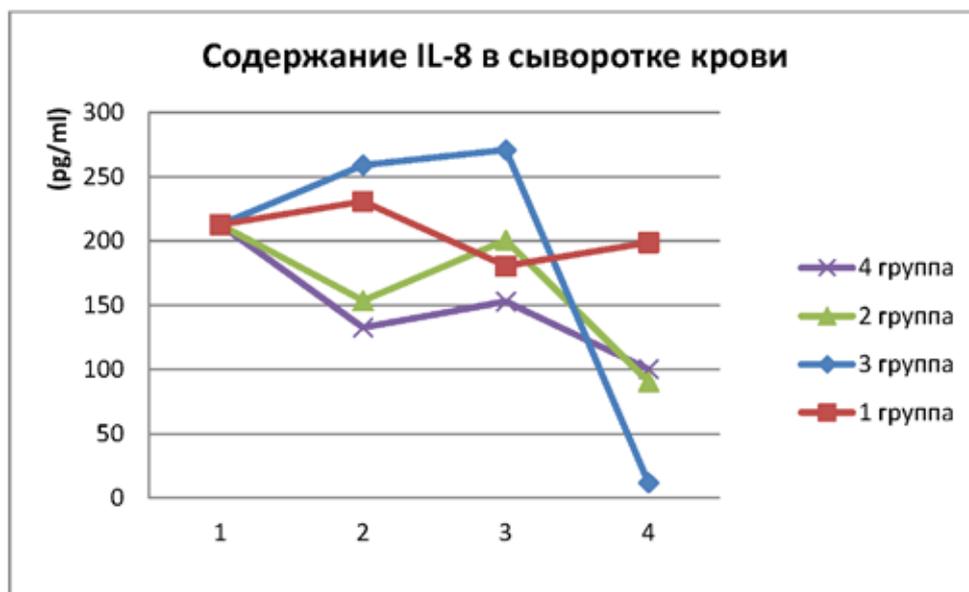


Рис. 3. Динамика содержания IL-8 в сыворотке крови на разных сроках лечения

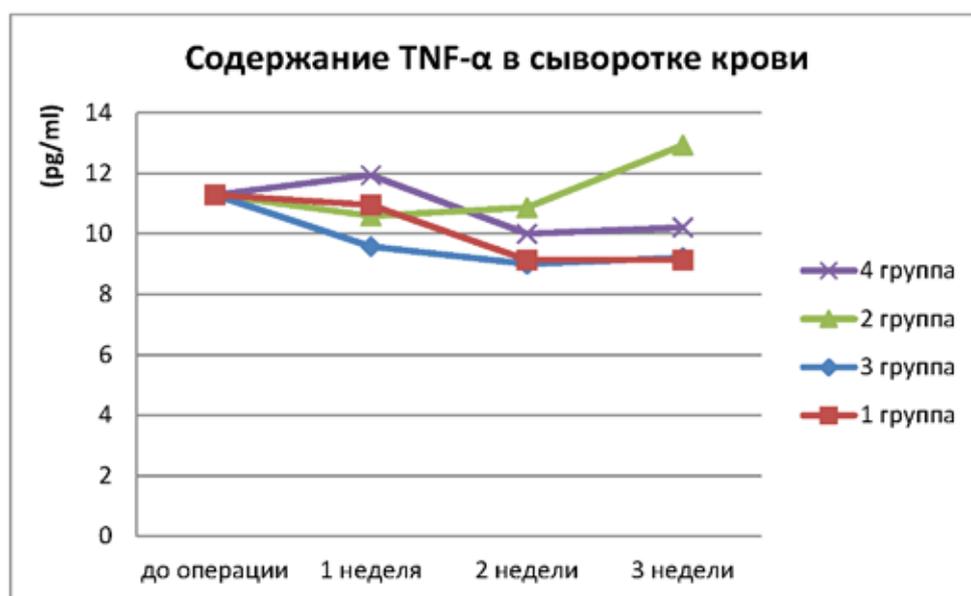


Рис. 4. Динамика содержания TNF-α в сыворотке крови на разных сроках лечения

При оценке содержания фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) в сыворотке крови в 1-й и 4-й группах животных обращает на себя внимание его плавное повышение на 10-20% через 1 неделю после операции и последующее возвращение к исходному уровню уже ко 2 недели в 1-й группе и к 3-й недели в 4-й группе эксперимента. Во 2-й и 3-й группах этот показатель наоборот уже через 1 неделю после операции снижался ниже исходного уровня, сохраняясь на нём до 2-й недели, после чего у животных 2-й группы он возвращался к исходным значениям, а у животных 3-й группы продолжал оставаться пониженным.

Остро возникшее в ответ на альтерацию воспаление в большинстве своём заканчивается заживлением костной раны и длительность воспалительного процесса не превышает 4-6 недель, хотя в большинстве случаев он заканчивается через 2 недели. Общепринятыми медиаторами острого воспаления являются интерлейкин-1 и фактора некроза опухоли альфа. Медиаторами подострого и хронического воспаления служат интерлейкин-4 и интерлейкин-6. Выявленное нами повышение уровня IL-6 на сроке 3 недели в третьей экспериментальной группе свидетельствует, по всей видимости, о затяжном течении или хронизации процесса, замедленном костеобразовании.

Оценивая вышеизложенную динамику изменений показателей цитокинового профиля у лабораторных животных в четырёх группах эксперимента, можно констатировать, что наилучшие результаты их нормализации отмечены в группе, где в качестве стимуляционного воздействия использовался метод туннелизации проксимального и дистального фрагментов перелома. Это подтверждается и морфологическими исследованиями [7]. Большинство показателей (за исключением IL-1) в этой группе возвращалось к исходному уровню через

3 недели, а содержание TNF- $\alpha$  уже через 2 недели после оперативного вмешательства. Иммунологические показатели в четвёртой (контрольной) группе возвращались к нормальным значениям не раньше 3-й недели послеоперационного периода.

Туннелизация кости при компрометированном хондро- и остеогенезе, широко распространённая в ортопедии, получает подтверждение в нашем экспериментальном исследовании. Малотравматичный способ сверления спицевых отверстий следует рассматривать как дополнительный очаг ангио- и остеогенеза [1].

#### Список литературы

1. Барабаш А.П., Каплунов А.Г., Барабаш Ю.А., Норкин И.А. Ложные суставы длинных костей (технологии лечения, исходы). Научное издание. Саратов: Изд-во Саратовского ГМУ, 2010. 130 с.
2. Берсудский С.О. Избранные лекции по патофизиологии. Саратов: Изд-во СГМУ, 2004. 304 с.
3. Деев Р.В. Пути развития клеточных технологий в костной хирургии / Р.В. Деев, А.А. Исаев // Травматология и ортопедия России. 2008. № 1 (47). – С. 65-74.
4. Клиническое использование продольной остеотомии отломков кости при лечении псевдоартрозов длинных костей / Ю.А. Барабаш, В.Д. Балаян, О.А. Кауц, Н.В. Тишков // Травма (Донецк). 2009. Т. 10. № 2. С. 134-138.
5. Климовицкий В.Г. Современные аспекты проблемы применения мезенхимальных стволовых клеток в травматологии и ортопедии / В.Г. Климовицкий, В.Н. Пастернак, В.М. Оксимец // Ортопедия, травматология и протезирование. 2008. № 1. С. 105-110.
6. Склянчук Е.Д. Стимуляция остеогенеза в комплексном лечении посттравматических нарушений костной регенерации: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2009. 35 с.
7. Барабаш Ю.А. Оценка стимуляции заживления перелома при хирургическом и гидродинамическом воздействии на концы отломков и костномозговое содержимое / Ю.А. Барабаш, Н.В. Богомолова, О.А. Кауц, А.П. Барабаш и др. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 9. – С.58-61.
8. Liu W. Mesenchymal stem cells and tissue engineering / W. Liu, L. Cui, Y. Cao // Method. Enzymol. 2006. Vol. 420. P. 339-361.
9. Pountos I. Growing bone and cartilage. The role of mesenchymal stem cells // J. Bone Jt. Surg. 2006. Vol. 88-B, N 4. P. 421-426.