

## ПАРАКРИННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ДИСТРАКЦИОННОГО ОСТЕОГЕНЕЗА (пилотное исследование)

М.В. Стогов, А.А. Еманов, Е.А. Киреева

ФГБУ «РНИЦ «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, ул. М. Ульяновой, д. 6, г. Курган, Россия, 640014

### Реферат

**Цель** – оценить влияние белкового экстракта, выделенного из удлиняемых скелетных мышц, на процесс формирования distractionного регенерата у собак при удлинении костей голени методом Илизарова.

**Материал и методы.** Изучены особенности формирования distractionного регенерата у собак трех групп при удлинении костей голени по Илизарову. В первой группе ( $n = 10$ ) distraction осуществляли в режиме 1 мм за 4 приема в течение 28 суток. Во второй ( $n = 4$ ) и третьей ( $n = 4$ ) группах distraction осуществляли в режиме 1,5 мм за 6 приемов в сутки в течение 20 суток. Во всех группах величина удлинения в среднем составила  $14,64 \pm 0,67\%$  от общей длины сегмента. На 10-е сутки distraction собакам второй группы в переднюю большеберцовую и икроножную мышцы удлиняемого сегмента вводили экстракт тестируемых саркоплазматических белков, полученных из передней большеберцовой мышцы собаки на 14-е сутки distraction. Животным третьей группы по той же схеме вводили физиологический раствор.

**Результаты.** Рентгенологические признаки формирования анатомически состоятельного регенерата в первой группе определялись в среднем на  $33 \pm 1$  сутки фиксации, во второй – на  $24 \pm 2$ , в третьей – на  $39 \pm 3$  сутки. Различия средних показателей фиксации собак второй группы с животными первой и третьей групп достоверны при уровне значимости  $p = 0,04$ . У собак второй группы после введения препарата был более выражен рост содержания  $\gamma$ -глобулинов и  $\alpha_2$ -глобулиновой фракции белков сыворотки крови.

**Выводы.** Скелетные мышцы сегмента конечности, удлиняемого с применением метода Илизарова, продуцируют определенные факторы, влияющие на процесс distractionного остеогенеза.

**Ключевые слова:** удлинение голени по методу Илизарова, скелетные мышцы, паракринная регуляция, остеогенез.

### Введение

Значительную роль в поддержании активного остеогенеза при удлинении костей конечностей по методу Илизарова играют механические факторы, такие как темп и дробность distraction [2, 6, 7]. Однако работы последних лет демонстрируют, что гуморальные механизмы имеют не менее важное значение для регуляции distractionного остеогенеза [4, 5, 8–10]. К настоящему времени имеются работы, в которых отмечено, что гуморальная регуляция костной репарации может осуществляться паракринным путём, за счет вовлечения в этот процесс скелетных мышц, окружающих кость [1, 3]. Поэтому можно полагать, что удлиняемые скелетные мышцы могут являться источниками регуляторных факторов, влияющих на течение distractionного остеогенеза.

Нами проведено пилотное исследование, **целью** которого являлась оценка возможности влияния белкового экстракта, выделенно-

го из скелетных мышц удлиняемого сегмента, на процесс формирования distractionного регенерата.

### Материал и методы

Исследование выполнено на 18 взрослых беспородных собаках, которым на правую голень накладывали аппарат Илизарова, состоящий из четырех опор, соединенных попарно. Затем осуществляли открытую поперечную остеотомию малоберцовой кости в области средней трети диафиза с использованием долота. Далее на том же уровне проводили закрытую флексионную остеоклазию большеберцовой кости. Через 5 суток после наложения аппарата у всех собак начинали distraction костей голени. В последующем все животные были разделены на три группы.

В первой группе ( $n = 10$ ) distraction осуществляли в режиме 1 мм за 4 приема (классический режим) в течение 28 суток, во второй

☞ Стогов М.В., Еманов А.А., Киреева Е.А. Паракринные регуляторы distractionного остеогенеза (пилотное исследование). *Травматология и ортопедия России*. 2016; 22(2):64-69.

✉ Стогов Максим Валерьевич. Ул. М. Ульяновой, д. 6, г. Курган, Россия, 640014; e-mail: stogo\_off@list.ru

1 Рукопись поступила: 11.05.2016; принята в печать: 24.05.2016

( $n = 4$ ) и третьей ( $n = 4$ ) группах – с темпом 1,5 мм за 6 приемов в сутки в течение 20 суток. Во всех группах средняя величина удлинения составила  $14,64 \pm 0,67\%$  от общей длины сегмента. Аппаратную фиксацию прекращали при формировании анатомически состоятельного регенерата на основании рентгенографического исследования и клинической пробы. Собак выводили из опыта в конце фиксации аппаратом.

На 10-е сутки distraction собак второй группы в переднюю большеберцовую и икроножную мышцы удлиняемого сегмента (на уровне регенерата) вводили экстракт саркоплазматических белков в объеме 1,5 мл из расчета 1 мг лиофилизата на кг массы тела (концентрация белка в водимом растворе составляла  $30 \pm 2$  г/л). Животным третьей группы по аналогичной схеме вводили физиологический раствор.

Белковый экстракт представлял собой лиофилизат саркоплазматических белков, полученных из передней большеберцовой мышцы собаки на 14-е сутки удлинения костей голени по Илизарову (режим удлинения 1 мм в сутки за 4 приема). Экстракт получали по оригинальной методике (патент РФ на изобретение № 2476234) путем последовательного осаждения мышечных белков в растворах KCl разной ионной силы. После получения лиофилизат стерилизовали, перед введением растворяли в физиологическом растворе.

На проведение экспериментального исследования получено разрешение комитета по этике при ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с Приказом Минздрава СССР (от 12.08.1977 г. № 755) и требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (1986).

Для оценки динамики формирования регенерата проводили контрольную рентгенографию удлиняемой конечности аппаратом АРД-2 в двух взаимоперпендикулярных плоскостях при напряжении 48–52 кв, экспозиции 8–10 мс и фокусном расстоянии 85 см. Исследование выполняли до операции, после операции, через 7, 10, 14, 20, 28 суток distraction, а также спустя 15, 21, 24, 28, 30, 35, 45 суток фиксации.

Дополнительные методы исследования включали: определение в сыворотке крови активности щелочной и тартратрезистентного изофермента кислой фосфатаз, концентрации С-реактивного белка (СРБ) и электрофорез

белков сыворотки. Активность ферментов и концентрацию СРБ определяли на биохимическом анализаторе «Hitachi/ВМ» (Япония), используя наборы реагентов фирмы «Vital Diagnostic» (Россия). Электрофоретическое разделение белковых фракций проводили на системе «Paragon» (Beckman, США) с использованием реактивов и пластин этой же фирмы.

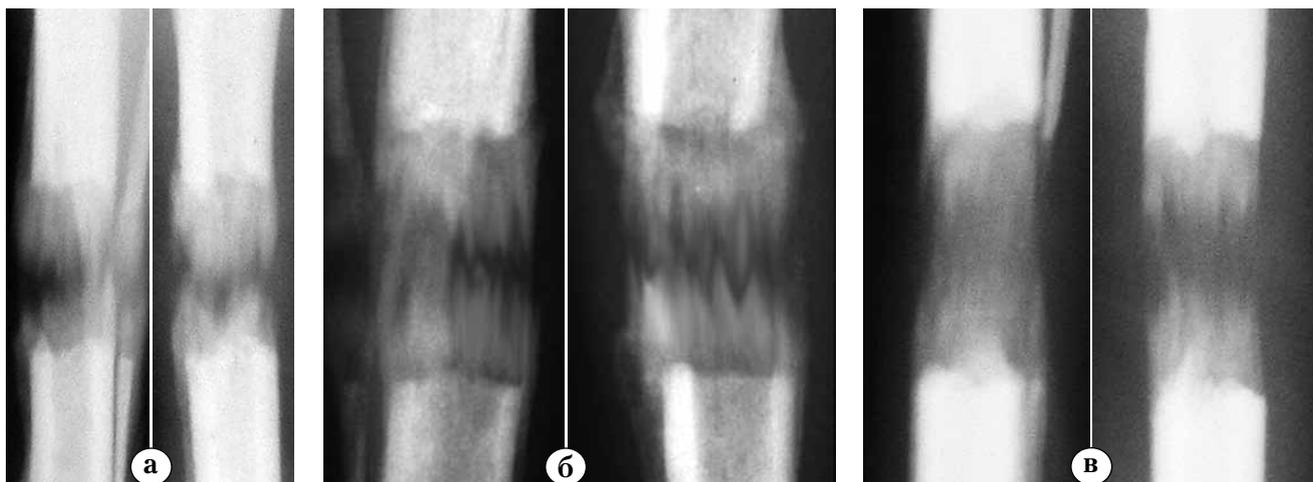
Достоверность различий между двумя выборками оценивали с помощью U-критерия Вилкоксона – Манна – Уитни для независимых выборок. Достоверность межгрупповых различий определяли с помощью непараметрического критерия Крускала – Уоллиса с последующим множественным сравнением с использованием критерия Данна.

### Результаты

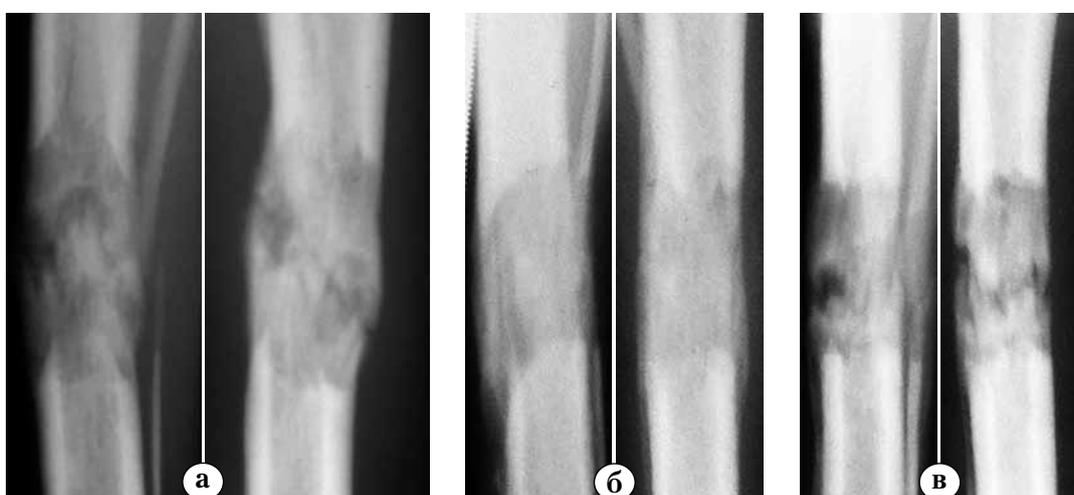
Результаты рентгенографического исследования показали, что к концу периода distraction у животных всех групп регенерат приобретал гиперпластическую форму и имел продольно-исчерченную структуру (рис. 1).

В первой и второй группах наблюдалось более активное течение остеогенеза в сравнении с третьей, о чем свидетельствовала высота срединной зоны просветления:  $2,4 \pm 1,3$  мм и  $5,2 \pm 0,9$  мм соответственно. Во второй группе на всем протяжении регенерат пересекали трабекулярные тени, образующие единичные костные «мостики», в первой они располагались лишь в центре регенерата. Во второй группе у основания костных отделов регенерата определялись дополнительные участки просветления величиной  $1,8 \pm 0,5$  мм, что свидетельствовало о начале формирования костномозговой полости. В первой группе животных в 50% случаев участки просветления определялись, в третьей группе эти признаки отсутствовали.

На 15-е сутки фиксации у животных второй группы регенерат утрачивал зональность (рис. 2). На месте срединной зоны просветления отмечалось формирование плотной гомогенной тени повышенной оптической плотности. Начиналось формирование единой кортикальной пластинки. В первой и третьей группах регенерат существенно не отличался. Он сохранял зональность, имел гомогенную структуру. «Зону роста» перекрывали гомогенные трабекулярные тени, особенно выраженные в центре регенерата. Периостальные наслоения на отломках компактизировались. В третьей группе у основания костных отделов регенерата определялись дополнительные участки просветления.



**Рис. 1.** Фрагменты рентгенограмм костей голени в конце периода дистракции: а – первая группа; б – вторая группа; в – третья группа

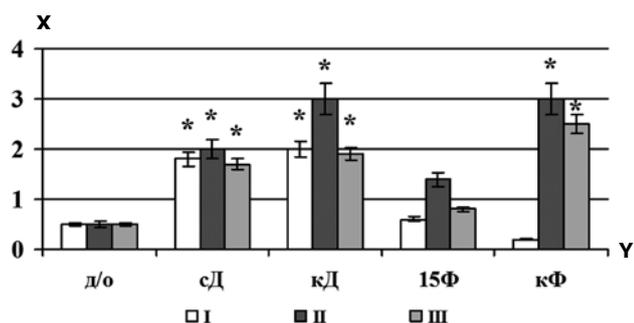


**Рис. 2.** Фрагменты рентгенограмм костей голени на 15-е сутки фиксации в аппарате: а – первая группа; б – вторая группа; в – третья группа

Рентгенологические признаки формирования анатомически состоятельного регенерата в первой группе определяли в среднем на  $33 \pm 1$  сутки фиксации, во второй – на  $24 \pm 2$ , в третьей – на  $39 \pm 3$  суток. Различия между средними показателями фиксации у собак второй группы и у животных первой и третьей групп были достоверны при уровне значимости  $p = 0,04$ . При этом общий срок эксперимента в первой группе в среднем составил  $66 \pm 4$  суток, во второй –  $49 \pm 4$ , в третьей –  $64 \pm 5$  суток.

Активность обеих фосфатаз в сыворотке крови собак второй группы на сроках эксперимента относительно показателей животных третьей группы достоверно не отличалась, а отличия от значений показателей у собак первой группы наблюдались только в середине дистракции, т.е. до введения экстракта.

Анализ изменения концентрации С-реактивного белка показал, что к середине дистракции его уровень был статистически значимо повышен у животных всех групп (рис. 3). К концу дистракции в 1-й и 3-й группах его уровень относительно предыдущего срока не изменился, тогда как у собак второй группы уровень СРБ продолжал увеличиваться. На 15-е сутки фиксации уровень СРБ был в пределах дооперационных значений у собак всех групп. Однако к концу фиксации у животных 2-й и 3-й групп отмечалось повторное резкое увеличение концентрации СРБ. Электрофоретический анализ белков сыворотки крови показал, что у собак второй группы после введения экстракта был более выражен рост содержания  $\gamma$ -глобулинов к концу дистракции и  $\alpha_2$ -глобулиновой фракции на 15-е сутки фиксации.



**Рис. 3.** Концентрация С-реактивного белка (мг/л, по оси ОУ) в сыворотке крови собак экспериментальных групп на этапах удлинения.

*Примечание:* I, II, III – номер группы.

По оси ОХ: до/о – до операции;

сД – середина distraction;

кД – конец distraction;

15Ф – 15-е сутки фиксации;

кФ – конец фиксации.

\* – достоверные отличия по сравнению

с дооперационными значениями при  $p < 0,05$

### Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение тестируемого мышечного экстракта в скелетные мышцы удлиняемого сегмента конечности влияло на процессы формирования distractionного регенерата. Однако механизмы реализации такого эффекта неоднозначны. В частности, повышение уровня СРБ,  $\alpha_2$ - и  $\gamma$ -глобулинов в сыворотке крови животных 2-й группы после введения препарата свидетельствовало о том, что наблюдаемый эффект носил опосредованный характер и был обусловлен развитием определенной иммунной реакции на введение белков. Однако не исключен и механизм прямой активации репаративных процессов компонентами экстракта. В пользу этого говорит то, что, несмотря на присутствие отдельных различий, динамика изменения концентрации белков острой фазы у животных 2-й и 3-й групп после введения белка и физиологического раствора была достаточно схожа.

### Заключение

Таким образом, результаты пилотного исследования показали, что скелетные мышцы сегмента конечности, удлиняемого методом Илизарова, продуцируют определенные факторы, влияющие на течение distractionного остеогенеза. Выявление действующего агента/агентов, а также оценка механизма действия этих регуляторов – задача следующего исследования.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Источник финансирования:** исследование проведено без спонсорской поддержки.

### Литература

1. Стогов М.В. Ауто- и паракринная функция скелетных мышц в норме и при патологии. *Тенный ортопедии*. 2011; (3):148-151.
2. Шрейнер А.А., Ерофеев С.А., Щудло М.М., Чиркова А.М., Карымов Н.Р. Теоретические аспекты distractionного остеосинтеза. Значение режима distraction. *Тенный ортопедии*. 1999; (2):13-17.
3. Goldspink G. Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003; 17(2):211-222.
4. Hankenson K.D., Dishowitz M., Gray C., Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*. 2011; 42(6):556-561.
5. Li G. New developments and insights learned from distraction osteogenesis. *Current Opinion in Orthopaedics*. 2004; 15:325-330.
6. Li G., Simpson A.H., Kenwright J., Triffitt J.T. Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *Orthop Res*. 1997; 15(5):765-772.
7. Li G., Simpson A.H., Kenwright J., Triffitt J.T. Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *J Orthop Res*. 1999; 17(3):362-367.
8. Theyse L.F., Oosterlaken-Dijksterhuis M.A., van Doorn J., Terlou M., Mol J.A., Voorhout G., Hazewinkel H.A. Expression of osteotropic growth factors and growth hormone receptor in a canine distraction osteogenesis model. *J Bone Miner Metab*. 2006; 24(4):266-273.
9. Weiss S., Baumgart R., Jochum M., Strasburger C.J., Bidlingmaier M. Systemic regulation of distraction osteogenesis: a cascade of biochemical factors. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(7):1280-1289.
10. Zhao Z.Y., Shao L., Zhao H.M., Zhong Z.H., Liu J.Y., Hao C.G. Osteogenic growth peptide accelerates bone healing during distraction osteogenesis in rabbit tibia. *J Int Med Res*. 2011; 39(2):456-463.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

*Стогов Максим Валерьевич* – д-р биол. наук ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБУ «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России

*Еманов Андрей Александрович* – канд. вет. наук старший научный сотрудник лаборатории реконструктивного эндопротезирования и артроскопии ФГБУ «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России

*Киреева Елена Анатольевна* – канд. биол. наук старший научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБУ «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России

## PARACRINE REGULATORS IN DISTRACTION OSTEOGENESIS (pilot study)

M.V. Stogov, A.A. Emanov, E.A. Kireeva

*Ilizarov Russian Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopedics»,  
ul. M. Ulyanova, 6, Kurgan, Russia, 640014*

### Abstract

**Purpose** – to evaluate effect of protein extracted from lengthened skeletal muscles on callus formation in dogs after tibia lengthening using Ilizarov method.

**Materials and methods.** The authors studied properties of distraction callus formation in three groups of dogs after tibia lengthening by Ilizarov method. In the first group (n = 10) distraction was achieved at a rate of 1 mm in four stages during 28 days. In the second (n = 4) and third (n = 4) groups distraction was done at a rate of 1.5 mm in 6 stages per day within 20 days. Mean lengthening value in all groups amounted to 14,64±0,67% of the overall segment length. At the 10th day of distraction the authors introduced to animals of the second group into anterior tibial and gastrocnemius muscles of the lengthened segment at callus level the extract of sarcoplasmic proteins in amount of 1.5 ml based on 1 mg of lyophilizate per 1 kg of body weight (protein concentration in injectate amounted to 30±2 gr/l). Animals in the third group received natural saline solution in the same manner.

Extract consisted of lyophilized sarcoplasmic proteins harvested from anterior tibial muscle of animal at 14th day of lengthening by Ilizarov method (rate of 1 mm per day in 4 stages). Extraction was performed according to patented method (Russian Federation patent for invention №2476234) by consecutive muscle proteins sedimentation in KCl solutions of varied ionic strength. The lyophilizate was sterilized after obtaining and dissolved in normal saline solution prior to introduction.

**Results.** Radiographic signs of anatomically solid callus in the first group were observed in the average at 33±1 day of fixation; in the second group – at 24±2 day; in the third group – at 39±3. Difference in mean values of fixation in animals of second group as compared to first and third groups was significant (p = 0,04). After extract introduction the animals of the second group demonstrated a greater growth of  $\gamma$ -globulins and  $\alpha_2$ -globulins fraction volumes.

**Conclusion.** Skeletal muscles of limb segment lengthened by Ilizarov method produce specific factors that impact the process of distraction osteogenesis.

**Keywords:** tibia lengthening, Ilizarov method, skeletal muscles, paracrine regulation, osteogenesis.

**Competing interests:** the authors declare that they have no competing interests.

**Funding:** the authors have no support or funding to report.

### References

1. Stogov MV. [Auto- and paracrine function of skeletal muscles normally and for pathology]. *Geniy Ortopedii* [Genius of Orthopedics]. 2011; 3:48-151. [in Rus.]
2. Shreiner AA, Yerofeyev SA, Chtchoudlo MM, Chirkova AM, Karymov NR. [Theoretical aspects of distraction osteosynthesis. Importance of distraction mode]. *Geniy Ortopedii* [Genius of Orthopedics]. 1999; 2:13-17. [in Rus.]
3. Goldspink G. Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003; 7(2): 11-222.
4. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury.* 2011; 2(6):556-561.
5. Li G. New developments and insights learned from distraction osteogenesis. *Current Opinion in Orthopaedics.* 2004; 5:325-330.
6. Li G, Simpson AH, Kenwright J, Triffitt JT. Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *Orthop Res.* 1997; 5(5):765-772.
7. Li G, Simpson AH, Kenwright J, Triffitt JT. Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 1999; 17(3): 362-367.
8. Theyse LF, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, van Doorn J, Terlou M, Mol JA, Voorhout G, Hazewinkel HA. Expression of osteotropic growth factors and growth hormone receptor in a canine distraction osteogenesis model. *J Bone Miner Metab.* 2006; 24(4): 266-273.
9. Weiss S, Baumgart R, Jochum M, Strasburger CJ, Bidlingmaier M. Systemic regulation of distraction osteogenesis: a cascade of biochemical factors. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(7):1280-1289.
10. Zhao ZY, Shao L, Zhao HM, Zhong ZH, Liu JY, Hao CG. Osteogenic growth peptide accelerates bone healing during distraction osteogenesis in rabbit tibia. *J Int Med Res.* 2011; 39(2): 456-463.

 **Cite as:** Stogov MV, Emanov AA, Kireeva EA. [Paracrine regulators in distraction osteogenesis (pilot study)]. *Traumatologiya i ortopediya Rossii.* 2016; 22(2): 64-69. (in Russ.)

 *Stogov Maksim V.* Ul. M. Ulyanova, 6, Kurgan, Russia, 640014; e-mail: stogo\_off@list.ru

 Received: 11.05.2016; Accepted for publication: 24.05.2016

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

*Stogov Maksim V.* – leading researcher, laboratory of biochemistry, Ilizarov Russian Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopedics»

*Emanov Andrey A.* – senior researcher, laboratory of reconstructive joint replacement and arthroscopy, Ilizarov Russian Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopedics»

*Kireeva Elena A.* – senior researcher, laboratory of biochemistry, Ilizarov Russian Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopedics»



## Международная конференция «ТРАВМА 2016»

Применение современных технологий лечения в российской травматологии и ортопедии

**3–4 ноября 2016 г., г. Москва, МВЦ «Крокус Экспо»,  
ст. метро «Мякинино», павильон № 3, 4 этаж**

3–4 ноября 2016 г. в Москве в МВЦ «Крокус Экспо» пройдет международная конференция «ТРАВМА 2016», посвященная применению современных технологий лечения в российской травматологии и ортопедии. В рамках конференции пройдет выставка современных медицинских технологий, оборудования и лекарственных препаратов.

### Организаторы:

- Министерство здравоохранения России
- Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
- Кафедра травматологии, ортопедии и ВПХ РНИМУ им. Н.И. Пирогова
- Кафедра травматологии и ортопедии ИПК ФМБА России
- Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова
- Медицинский факультет университета г. Аахен, Германия
- Ассоциация травматологов-ортопедов России
- Ассоциация травматологов-ортопедов г. Москвы
- Российская ассоциация хирургов стопы и голеностопного сустава
- Европейское общество травматологии и неотложной хирургии (ESTES)
- Европейское общество хирургии стопы и голеностопного сустава (EFAS)
- Европейское общество хирургии плеча и локтевого сустава (SECEC/ESSSE)

### Основные вопросы научной программы:

- Эволюция современного остеосинтеза при изолированной и множественной травме
- Лечение заболеваний, травм стопы и их последствий  
(III Конгресс по хирургии стопы и голеностопного сустава)
- Лечение повреждений и заболеваний верхней конечности
- Осложнения и последствия травм опорно-двигательного аппарата
- Непрерывное обучение в травматологии, ортопедии: от студента к специалисту
- Обучающий курс «Тактика лечения больных с тяжелой сочетанной травмой»
- Специальный курс «Лечение заболеваний и травм локтевого и плечевого суставов»

Подробная информация и условия участия размещены на сайте [www. 2016.trauma.pro](http://www.2016.trauma.pro)

### Технический организатор

ООО «Ивентариум»

+7 (926) 965-25-05

Эл. почта: [mail@eventarium.pro](mailto:mail@eventarium.pro)