

**ОСИПЕНКО  
Артур  
Васильевич**

*Профессор кафедры патологической  
физиологии УГМА, академик МАНЭБ,  
профессор, доктор медицинских наук*

## **РОЛЬ КИСЛОРОДЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ В ДИСТРАКЦИОННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ**

Изучение механизмов регенерации органов и тканей является актуальной проблемой современной биологии и медицины. Благодаря применению в клинике и эксперименте метода удлинения конечности в настоящее время формируется концепция дистракционного гистогенеза [5, 9, 10, 11].

Накоплен большой фактический материал о различных механизмах регенерации тканей, в частности костной и мышечной, при дистракционном остеосинтезе [5]. Установлено, что в механизмах регенерации тканей при удлинении принимает участие система крови, ее лимфоцитарно-макрофагальное звено [10, 16]. Тем не менее многие механизмы дистракционного гистогенеза остаются недостаточно изученными. Это непосредственно касается энергетического обмена регенерирующих тканей при удлинении.

О существенной роли биоэнергетики как в онтогенезе скелетной мышечной ткани, так и при ряде состояний, связанных либо с повышенной физической нагрузкой, либо с патологией, свидетельствуют многочисленные публикации [17–20]. Такое внимание является отражением актуальности проблемы энергообеспечения различных процессов, как одной из важнейших областей медицины. Что касается процесса репаративного гистогенеза, то наиболее широко освещенным можно назвать биоэнергетику посттравматического и дистракционного регенерата, где показан вклад как анаэробного, так и аэробного окислительного метаболизма [14]. Однако ранее выполненные исследования были проведены на различных экспериментальных моделях и на разных животных, что существенно затрудня-

ет их интерпретацию. Дистракционный остеосинтез по Г.А. Илизарову, при котором растяжению подвергаются кость, мышцы, сосуды и нервы, является идеальной моделью для изучения возможностей регенерации тканей у млекопитающих и человека.

В связи с этим целью настоящей работы являлось исследование кислородзависимых реакций в мышечной, костной тканях и лимфоцитах крови в динамике удлинения конечности.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кислородзависимые реакции (тканевое дыхание, оксигенацию и локальный кровоток) исследовали различными приемами полярографии. Тканевое дыхание определяли с помощью закрытого платинового электрода Кларка в растворе Хенкса при 37°C. При этом анализировали скорость дыхания на эндогенных субстратах и скорости дыхания в присутствии экзогенного сукцината натрия, динитрофенола, амитала и малоната натрия. Показатель скорости дыхания выражали в наноатомах кислорода, поглощенного за 1 мин 1 мг белка или 1 млн клеток. Оксигенацию тканей дистракционного регенерата определяли по напряжению кислорода и при проведении кислородной пробы (Березовский В.А., 1975; Коваленко Е.А. и соавт., 1975). Скорость локального кровотока оценивали методом водородного клиренса.

Регенерацию тканей моделировали на собаках, которым после остеотомии и наложения чрескостного дистракционного аппарата Г.А. Илизарова удлиняли конечность. Для исследования использовали фрагменты мышечной, костной тканей и лимфоциты крови в динамике дистракционного гистогенеза на протяжении одного года эксперимента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Мышечная ткань.** Проведенное исследование показало стимуляцию гликолиза, цикла Кребса, тканевого дыхания и КФК-реакции в регенерирующей мышце при удлинении конечности.

Исследования анаэробного метаболизма удлиняемой скелетной мышечной ткани выявили его стимуляцию. Рост общей активности

ЛДГ, параллельно с увеличением доли М-субъединиц и соответственным накоплением молочной и пировиноградной кислот, характерен с начальных этапов эксперимента у всех животных, достигает своего максимума, в основном, к концу удлинения.

Исследование метаболической адаптации при дистракционном миогенезе было бы неполным без анализа состояния КФК-реакции. В нашем эксперименте вклад креатинфосфата в энергообеспечение регенерирующей мышцы можно оценить как достаточно высокий. Период активации этого энзима самый продолжительный: с начала удлинения и до середины периода фиксации. Следует отметить, что угнетение общей активности КФК в начальный этап дистракции, которое мы наблюдали при исследовании энзимов ЦТК, отсутствует.

### ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Для выяснения уровня оксигенации удлиняемой мышцы в нашем эксперименте проведен анализ динамики некоторых полярографических показателей тканевого дыхания. Эти исследования полностью подтвердили предположения о высоком вкладе аэробного окисления в биоэнергетику удлиняемой скелетной мышцы.

Динамика показателей тканевого дыхания дает основание считать, что в регенерирующей мышце при дистракционном остеосинтезе наблюдается высокая интенсивность митохондриального окисления. Активация скорости эндогенного дыхания обнаружена у всех экспериментальных животных на протяжении всего этапа дистракции и вплоть до 60-и суток фиксации. Это дает основание считать, что в удлиняемой мышце происходит усиление интенсивности аэробных процессов и увеличение в миофибриллах количества окисляющихся субстратов. Достаточно высокий уровень  $V_{\text{ткд}}$  в два месяца фиксации (145%; 150%;  $P < 0,05$ ) связан с тем, что в этот период в миоцитах развиваются процессы пролиферации и дифференцировки клеток.

Сравнение показателей стимулирующего действия янтарной кислоты на  $V_{\text{ткд}}$  препаратов, показывает, что этот показатель увеличивается к концу дистракции (137%). Увеличение  $СД_{\text{ткд}}$  на протяжении опыта может быть связано как с увеличением проницаемости мембран, так и

с дефицитом эндогенного сукцината. Учитывая важную роль сукцината, обладающего большими энергетическими и пластическими потенциальными в адаптивных изменениях энергетического обмена, следует отметить, что рост окисления сукцината является необходимым при репаративном миогенезе.

Для оценки кислородтранспортных реакций использовали полярографические методики: определение скорости локального кровотока (метод водородного клиренса) и напряжения  $O_2$  в мышечной ткани. При МДО установлена высокая скорость локального кровотока уже на 10-е сутки удлинения по отношению к мышечной ткани неоперированной конечности, где этот показатель оставался стабильным на протяжении всего эксперимента.

При исследовании динамики напряжения кислорода в разные сроки удлинения найдено значительное увеличение этого показателя до 158% с постепенным его снижением. Также обнаружено снижение величины максимального напряжения кислорода и показателя его прироста. Эти результаты указывают на изменения в состоянии микроциркуляторного русла. Рост показателей  $t_1$  и  $t_2$  на фоне их несущественных изменений в неоперированной конечности показывает затруднение доставки кислорода к тканям, рост времени его доставки. Однако уровень его утилизации не изменился (исходя из динамики показателей  $t_3$ ,  $t_4$ ), исключение составляют 20-е сутки дистракции, когда использование кислорода выросло в два раза. При рассмотрении результатов исследования  $V_{\text{лок.кр}}$  и напряжения кислорода в дистракционном миогенезе выявили общую тенденцию нормализации этих показателей, за исключением времени доставки  $O_2$ . Некоторые ограничения во времени доставки кислорода в ткань, вероятно, компенсированы скоростью локального кровотока, что позволяет сохранить уровень его утилизации.

Таким образом, проведенное исследование показало стимуляцию гликолиза, цикла Кребса, тканевого дыхания и рефосфорилирования креатинфосфата в регенерирующей скелетной мышце при дистракционном остеосинтезе. Фазность исследованных параметров зависела от стадии эксперимента: активация при дистракции и тенденция нормализации при фиксации. Для таких показателей, как КФК, МДГ, ПВК в период 2—4 месяца фиксации обнаружен второй пик, который может быть связан с окончательным созреванием миофибрилл и становлением функциональной активности ткани. Сте-

пень выраженности обнаруженных изменений прямо связана с темпом, величиной и методом растяжения мышцы.

**Костная ткань.** Как известно, физиологическая и репаративная регенерация тканей сопровождается образованием соединительнотканых белков, основным из которых является коллаген. Его биосинтез происходит благодаря активной деятельности фибробластов. Интенсивное образование коллагена наблюдается при регенерации костной ткани [14, 21]. В формировании коллагена участвуют лизосомальные оксидазы, гидроксилированные радикалы пролина и лизина. Установлено, что активация гидроксилазных реакций, в том числе и процессинга коллагена связана с интенсивным потреблением кислорода. Можно предположить, что регенерация костной ткани при удлинении конечности должна сопровождаться усилением аэробных энергодающих реакций, а кислород при этом служит важным фактором регуляции восстановительных процессов.

В остеологии сложилось мнение, что в биоэнергетике костной ткани превалирует гликолиз. В основном оно базируется на биохимическом определении субстратов и ферментов гликолиза в кости и сыворотке крови [14]. По нашему мнению, гликолиз вряд ли в состоянии обеспечить энергией регенерирующую кость. Поэтому целесообразно уделить особое внимание окислительному метаболизму регенерирующей кости. Наиболее показательно в данном случае исследование комплекса кислородзависимых реакций в дистракционном регенерате, включающее определение тканевого дыхания с элементами ингибиторного анализа, локального кровотока по водородному клиренсу и оксигенации тканей по напряжению кислорода. Использование данного метода позволяет определять скорость локального кровотока и напряжение кислорода в одной и той же зоне регенерата одним электродом, что существенно повышает ценность исследования.

При регенерации кости показатели тканевого дыхания в значительной мере зависят от длительности удлинения и от особенностей клинического течения репаративного процесса. Наибольшая стимуляция тканевого дыхания наблюдается в начале образования дистракционного регенерата. На 10-е сутки удлинения в его ткани максимально возрастает скорость дыхания на эндогенных субстратах (148%,  $P=0,02$ ), что свидетельствует об усилении активности аэробных окислительных процессов и об увеличении в регенерате количества окис-

*Роль кислородзависимых механизмов  
в дистракционной регенерации тканей*

ляющихся субстратов. С увеличением продолжительности удлинения дистракционный регенерат приобретает зональность строения, центральную часть которого занимает зона роста. Она представлена волокнистой соединительной тканью с большим количеством фибробластов. В дальнейшем при благоприятном течении регенерации на 20-е сутки удлинения отмечается снижение скорости тканевого дыхания в этой зоне до 68% ( $P=0,05$ ). Такое ограничение, возможно, связано с некоторыми диффузионными ограничениями для кислорода в этой зоне, обусловленными увеличением плотности волокнистой ткани. На 30-е сутки удлинения показатель дыхания на эндогенных субстратах несколько возрастает, приближаясь к скорости дыхания интактной губчатой кости. В это время в зоне роста коллагенообразовании затихает, в ней превалирует костеобразование.

При нарушении регенерации кости скорость тканевого дыхания заметно выше, чем при благоприятном остеогенезе, и на 30-е сутки удлинения составляет 137% ( $P=0,05$ ). По морфологическим данным, в это время в зоне роста сохраняется активный фибриллогенез. Не исключено, что в основе нарушения регенерации костной ткани лежит превалирование фибриллогенеза над остеогенезом в результате нарушения синхронности этих процессов.

Таким образом, показатель величины скорости тканевого дыхания отражает интенсивность фибриллогенеза в тканях дистракционного регенерата.

Высокая активность аэробных окислительных процессов в кости подтверждается значительной стимуляцией скорости дыхания при добавлении сукцината натрия к ее препаратам (143%,  $P=0,05$ ).

Добавление 2,4-динитрофенола вызывает стимуляцию тканевого дыхания до 140% ( $P=0,01$ ), что свидетельствует о существовании в костной ткани прочного сопряжения окислительного фосфорилирования.

Наряду с этим морфологические и радионуклидные исследования ряда авторов показали, что на протяжении всего периода удлинения кости зона роста оставалась слабее васкуляризованной по сравнению с костными отделами регенерата, т.е. в ней имелись признаки гипоксии. При сопоставлении этих данных обнаруживалось кажущееся противоречие между существованием активных окислительных процессов в зоне роста и морфологическими признаками гипоксии. Для разрешения этого противоречия нами исследована

скорость локального кровотока одновременно с определением ряда показателей оксигенации этой ткани. Оказалось, что в начальный период формирования дистракционного регенерата эти показатели были максимально высокими, по мере увеличения длительности дистракции скорость локального кровотока и напряжение кислорода снижались. Тем самым в организме обеспечивалась достаточно высокая активность кислородзависимых реакций, необходимая для синхронизации коллагенообразования с остеогенезом.

Следовательно, гипоксический характер регенерирующей костной ткани, на который указывали морфологические данные других авторов, по нашим результатам, не является истинным, поскольку он не соответствует высокой активности кислородзависимых реакций, существующих в зоне роста дистракционного регенерата.

**Лимфоциты.** Они оказывают существенное влияние на функциональную активность многих соматических клеток: эпителиальных, гладкомышечных, гепатоцитов, эндотелиальных, костных и других [1, 3]. В частности, лимфоциты регулируют функциональную активность клеток регенерирующей кости: моделируя синтез коллагена, вырабатывая интерлейкины [2, 9], воздействуя на стромальные клоногенные клетки — предшественники остеогенеза [15]. Следовательно, есть все основания считать, что они прямо и опосредованно влияют на регенерацию кости.

Одним из показателей функционального состояния лимфоцитов является их энергетический обмен. Последний интенсивно изменяется при действии на организм гипоксии, при регенерации костной ткани [12].

Поскольку лимфоциты участвуют в регулировании восстановительных процессов в тканях, то исследование их биоэнергетики в динамике дистракционного гистогенеза, являющегося интегральным показателем, отражающего выраженность регенераторных процессов, представлялось нам важным для понимания механизмов взаимосвязи этих тканей и полезным для клиники [11].

Так, в результате исследования ряда показателей клеточного дыхания лимфоцитов крови установлено, что при благоприятном течении дистракционного гистогенеза динамика клеточного дыхания этих клеток имеет фазовый характер с двумя подъемами. 1-й приходится на конец послеоперационного периода, 2-й — на 9-й

месяц после окончания удлинения. Напротив, при нарушении регенерации происходит снижение скорости дыхания в течение всего периода удлинения. При этом единственный подъем данного показателя развивается на 6-й месяц после окончания удлинения.

Проведенный ингибиторный анализ выявил, что при благоприятном течении регенераторных процессов в лимфоцитах происходит изменение соотношения активности различных ферментных систем. Так, в начале и в середине периода удлинения возрастает стимулирующее действие янтарной кислоты. В опытах с добавлением 2,4-ДНФ установлено, что в интактных лимфоцитах существует прочное сопряжение окислительного фосфорилирования. При благоприятной регенерации этот показатель изменяется незначительно. Напротив, при ее нарушении стимулирующее действие 2,4-ДНФ возрастает к середине удлинения и на 3-й месяц после его окончания, что указывает на более выраженные метаболические сдвиги в лимфоцитах.

Таким образом, при дистракционном гистогенезе и в лимфоцитах крови наблюдается активация аэробных окислительных процессов, протекающих в митохондриальных и микросомальных компартаментах. На основании раннего исследования клеточного дыхания лимфоцитов крови для клинической практики был предложен способ диагностики состояния регенераторных процессов [11].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, проведенное исследование показало, что кислород играет важнейшую роль в дистракционном гистогенезе, обеспечивая митохондриальное окисление как источник энергии и микросомальное — необходимое для биосинтеза. Такой вывод стал возможным благодаря экспериментам не только в условиях *in vitro*, но и *in situ*, в котором сохранены регуляторные связи тканевых систем внутри организма. Это позволяет считать наличие активных кислородзависимых реакций необходимым и обязательным условием существования дистракционного гистогенеза. Параллельное определение биоэнергетики регенерирующих тканей при удлинении конечности существенно повышает ценность исследования. Раннее обнаружение нарушений тканевого дыхания позволяет использовать этот показатель в клинике для оценки состояния регенераторных процессов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабасва А.Г., Зотиков Е.А.* Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений. М.: Наука, 1987.
2. *Горлина Н.К., Баличева Е.А., Кушниц Н.В.* Иммунорегуляция функций фибробластов // Тез. докл. 1 съезда иммунологов России. Новосибирск, 1992. — С. 32.
3. *Дыгай А.М., Клименко Н.А.* Воспаление и гемопоэз. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992.
4. *Иванов И.И., Коровкин Б.Ф., Пинаев Г.П.* Биохимия мышц. М.: Медицина, 1977.
5. *Илизаров Г.А.* Общебиологическое свойство тканей отвечать на возникающие в них дозированные напряжения, преимущественно напряжения растяжения, регенерацией и ростом (Эффект Илизарова): Открытие 335 от 24.10.70 // *Вопр. изоб.* 1989. — № 4. — С. 11-12.
6. *Кондрашова М.Н.* Фармакологическая коррекция гипоксических состояний. — М., 1989. — С. 51-66.
7. *Лиознер Л.Д.* Регенерация мышц // *Проблемы миогенеза.* Л.: Наука, 1981. — С. 209-219.
8. *Лукьянова Л.Д.* Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // *Бюл. эксп. биологии и медицины.* 1997. — № 9. — С. 244-254.
9. *Осипенко А.В., Макарова Э.Б.* Интерлейкины и костная ткань / *Вестник Уральского гос. мед. акад.* 1995. — В. 1. — С. 33-38.
10. *Осипенко А.В.* Новый подход к проблеме регенерации тканей: значение и механизмы участия системы крови. В кн.: *Вопросы экспериментальной физиологии.* М.-Екатеринбург, 1997. — С. 131-138.
11. *Осипенко А.В., Макарова Э.Б.* Способ оценки регенерации костной ткани при дистракционном остеосинтезе. Патент 2099711 // *Бюл. изоб.*, 1997. — № 35. — С. 554-555.
12. *Осипенко А.В., Черешнев В.А.* Иммунобиологические механизмы регенерации тканей. Екатеринбург: УрО РАН, 1997.
13. *Попков А.В., Кузнецова Л.С., Дьячкова Г.В., Мурадисинов С.О.* Биохимические и анатомические изменения в мышцах при удлинении нижних конечностей по Илизарову // *Ортопедия, травматология и протезирование.* — 1991. — № 4. — С. 31-35.
14. *Торбенко В.П., Касавина Б.С.* Функциональная биохимия костной ткани. М.: Медицина, 1977.

15. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. М.: Медицина, 1973.
16. Ястребов А.П., Осипенко А.В. Система крови и регенерация костной ткани. Свердловск: Изд-во Урал. ун-та, 1990.
17. Corbucci G.G., Sessego R., Velluti C., Salvi M. Biochemical and biomolecular aspects of oxidative stress due to acute and severe hypoxia in human muscle tissue // *Int. J. Tissue React.* 1995. N 17(3). P.125-127.
18. Greenhalf P.L., Ren Jian Ming, Soderlung K., Hultman E. Energy metabolism in single human muscle fibers during contraction without and with epinephrine infusion // *Amer. J. Physiol.* 1991. 260. N 5. Pt. 1. P. 713-718.
19. Pastoris O., Dossena M., Foppa P., Amaboldi R., Corini A., Villa R.F., Benzi G. Modifications by chronic intermittent hypoxia and drug treatment on skeletal muscle metabolism // *Neurochem. Res.* 1995. N 20(2). P.143-150.
20. Saks V.A., Ventura-Clapier R., Aliev M.K. Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. 1274(3). — P.81-88.
21. Vaughan I.M. The physiology of bone. Oxford: Clarendon Press, 1975.