

В. В. Руцкий, Л. В. Филев, С. И. Мальцев, Р. М. Тихилов

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ ЭЛЕКТРЕТОВ (ЭСПЭ) НА РОСТ ФИБРОБЛАСТОВ И ЭНХОНДРАЛЬНЫЙ ОСТЕОГЕНЕЗ

Кафедра военной травматологии и ортопедии (нач. — проф. В. С. Дедушкин)
Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Ленинград

Биоэлектрические процессы во многом определяют энергетику и метаболизм соединительной ткани [1]. Известно положительное влияние электростатических полей на формирование костного регенерата и его минерализацию при электростимуляции остеорепаляции [5, 7, 9]. Однако применяемые способы и устройства для их реализации, в том числе и в физиотерапевтической практике, отличаются сложностью, небезопасны, трудоемки и требуют использования дорогостоящей аппаратуры [4].

Перспективным для этих целей является применение относительно недавно созданных носителей фиксированных электрических зарядов — электретов, способных генерировать электрическое поле в окружающем их пространстве [2]. Доказано, что соединительная ткань обладает не только собственными электретными свойствами, но и под воздействием электростатического поля электретов изменяется течение репаративных процессов [3]. Преимущества электретов, по сравнению с известными источниками элек-

тростатического поля, заключаются в простоте, автономности и безопасности их использования. Изготовленные в виде гибких фторопластовых пленок, металлических (оксид тантала) или керамических фиксаторов, биоинертные электреты могут имплантироваться в живые ткани сочетая механическую (остеосинтез, шов, интерпозит и т. д.) функцию и воздействие электростатического поля.

Успешное эмпирическое использование электретов при лечении более 360 больных и неясность механизма действия их электростатического поля определили цель настоящего исследования — изучение влияния электростатического поля электретов (ЭСПЭ) на рост фибробластов и энхондральный остеогенез в интересах оптимизации многофакторного воздействия ЭСПЭ на репаративную регенерацию.

Задачи исследования включали:

1. Определение оптимальных параметров воздействия ЭСПЭ на рост и дифференцировку фибробластов в культуре тканей.

2. Изучение особенностей процессов оссификации в реберном хряще под воздействием ЭСПЭ в эксперименте.

3. Определение оптимальных параметров ЭСПЭ для воздействия на репаративную регенерацию костной ткани.

Методика исследования. Оценку ЭСПЭ на развитие фибробластов проводили в чистой культуре клеток по следующей методике. У практически здоровых людей без системных заболеваний во время ортопедических операций эксплантировали участок губчатой кости (тело позвонка, гребень подвздошной кости, вертел бедренной кости) размером $1,0 \times 0,5 \times 0,3$ см, помещали в питательную

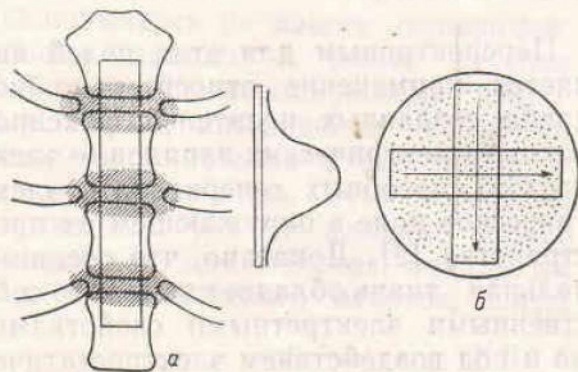


Рис. 1. Схема расположения электрета при оценке энхондрального остеогенеза (а), методика подсчета клеток-фибробластов в культуре тканей (б)

среду (10 мл 80 % среды 199+20 % сыворотки крови АВ (IV) здоровых людей). Культивирование проводили во флаконах Карреля с площадью дна 28 см^2 при температуре 37° . Смену среды и удаление неприлипших клеток проводили каждые 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28-е сутки.

В опытной серии ко дну флакона прикрепляли электреты и культура клеток подвергалась воздействию постоянного электрического поля с разностью потенциалов (U) $24 \div 120 \text{ В}$ в разные периоды (Т) от начала культивирования (+4 нед) и с различной экспозицией (t, 1÷5 сут). В контрольной серии пленки были незаряженными.

На 7, 14, 21, 28-е сутки культивирования клеток определяли количество колоний фибробластов, общее количество фибробластов в колониях и их размеры (в косом свете под микроскопом, ув. 280*) без окрашивания клеток и нарушения стерильности (рис. 1, б).

Для уточнения влияния различных параметров электрических полей на плотность костной и хрящевой ткани суставов в процессе остеорепарации выполнено 80 экспериментов на кроликах породы шиншила.

Под внутривенным наркозом 1 % раствором тиопентал-натрия обнажали грудину, удаляли переднюю корковую пластинку, при этом с обеих сторон обнажали три реберно-грудинных сочленения и всю грудину. На раневую поверхность накладывали электреты на основе фторопластовой пленки Ф-4 с различными зарядами: (—) $64 \pm 3 \text{ В}$ (II серия); (—) $130 \div 150 \text{ В}$ (III серия); (+) $140 \div 180 \text{ В}$ (IV серия); контролем служили кролики с аналогичной травмой, которым накладывали незаряженные пленки. Животных наблюдали 2, 3, 4, и 5 нед с последующим выведением из опытов передозировкой тиопентал-натрия. После вычленения реберно-грудинные препараты подвергались денситометрии и морфометрии. При оценке минерализации подсчитывали плотность отдельно хрящевых участков и прилежащих к суставам участков костной ткани в сравнении с данными контроля (рис. 1, а).

Результаты исследований обрабатывали методами вариационной статистики с определением t-критерия Стьюдента. В многофакторных исследованиях аналитических моделей экстремальные значения переменных определяли симплексным методом на ППК ЭВМ «Искра-1030.11».

Результаты исследований. Влияние ЭСПЭ на рост и дифференцировку фибробластов.

Динамика увеличения количества фибробластов в контрольной группе описывалась уравнением $y = 0,517 \cdot x^{9,296}$ с коэффициентом корреляции 0,995 (рис. 2, а).

По срокам наблюдения количество клеток в поле зрения окуляра составило $0,6 \pm 0,09$ в 1-ю неделю, 866 ± 62 — во 2-ю и 13940 ± 412 в 3-ю неделю.

К 4-й неделе все поле зрения было покрыто монослоем клеток, который не поддавался количественному учету.

В опытной группе анализ моделей функции $Q=F(U, t, T)$ выявил нелинейную зависимость исследуемых показателей, максимальное количество фибробластов достигалось при разности потенциалов 92 В, продолжительности воздействия 4—5 суток, начиная с 5-го дня. При этих оптимальных параметрах количество фибробластов достигало $1,54 \cdot 10^4$, что составило 110,1% по сравнению с контролем (рис. 2, б, в, г).

Нелинейная зависимость исследуемых показателей описывалась уравнением:

$$Y = 12666 + 1060U + 334t - 7134T - 1565U^2 + 200,4t^2 - 6812T^2 + 372,5Ut - 292,5UT - 3,5Tt.$$

Анализ влияния различных уровней напряжения электрического поля на количество клеток (при этом брались оптимальные значения начала и периода воздействия) показал, что начиная с уровня 9 В и до 120 В опытные данные превышали контроль. Наибольшее количество фибробластов было получено при разности потенциалов 81—96 В (рис. 2, б).

Время воздействия электрического поля не оказывало существенного влияния на количество фибробластов в выбранном диапазоне (1—5 дней), хотя оптимум наблюдался в сроки 4—5 дней (рис. 2 в).

В сроки с 1-го по 11-й день применения электретоов количество фибробластов значительно превышало контрольный уровень (оптимум воздействия приходился на 3—6-е сутки). Воздействие электрического поля в более поздние сроки приводило к угнетению развития фибробластов (рис. 2, г).

Качественная оценка динамики роста фибробластов в культуре тканей показала, что на 2—3-й неделе в опыте формировалась радиальная ориентация клеток вдоль силовых линий электрических полей. При оценке фибробластов, расположенных над центром электрета (максимум заряда), оказалось, что размеры клеток уменьшались, а их плотность на единицу площади возрастала. По мнению некоторых авторов, меньшие размеры фибробластов свидетельствуют об их больших регенераторных возможно-

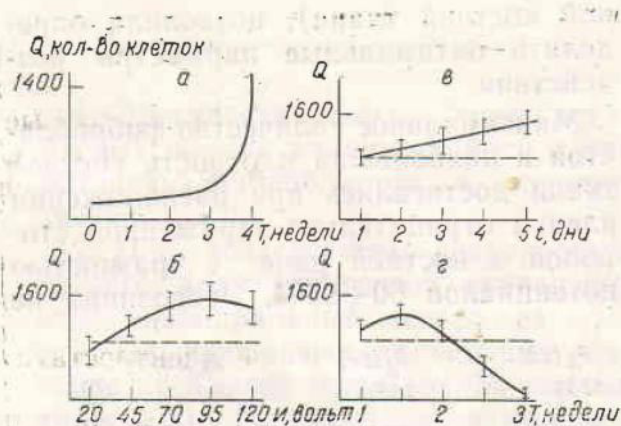


Рис. 2. Диаграммы количества фибробластов в культуре клеток в контроле (а), в опыте при изменении потенциала электрического поля (б), при воздействии с различной экспозицией (в) и разные сроки (г)

стях [6]. В контрольной группе наблюдалось хаотическое расположение клеток.

Минерализация хрящевой ткани под воздействием ЭСПЭ.

Экспериментальные исследования на кроликах показали, что в зоне наибольших зарядов электретных пленок плотность хряща и прилежащих костных структур (субхондральная зона) практически не изменялись в IV серии экспериментов (положительный заряд). Тогда как во II и особенно в III сериях экспериментов достоверно ($p < 0,05$) увеличивались плотность в хрящевой и костной тканях на 12 ± 4 и 7 ± 2 % (в хряще) и на 12 ± 4 и 9 ± 3 % (в костной ткани) соответствующих серий исследований (рис. 3).

В суставах, расположенных выше максимума электрического поля, плотность хряща и костной ткани в III и IV сериях достоверно не отличалась от контроля, тогда как во II серии отмечалось существенное увеличение плотности хряща (на 6,9 %) при практически неизменной плотности костной ткани.

В каудально расположенных суставах грудины показатели в IV и контрольной серии существенно не отличались между собой. Во II и III сериях выявлено различное повышение плотности тканей в сравнении с контролем: во II серии (хрящ/костная ткань) на 2,2 и 4,3 %, в III серии — 12,2 и 10,5 %.

Исследования влияния ЭСПЭ на различные фазы репаративной регенерации костной ткани (начальные стадии моделировались культивированием фибробластов, более поздние оценивались по минерализации энхондраль-

ной костной ткани), позволили определить оптимальные параметры воздействия.

Максимальное количество фибробластов и наибольшая плотность костной ткани достигались при расположении пленки отрицательно заряженной стороной к костной ране с разностью потенциалов $60 \div 96$ В. Экспозиция не

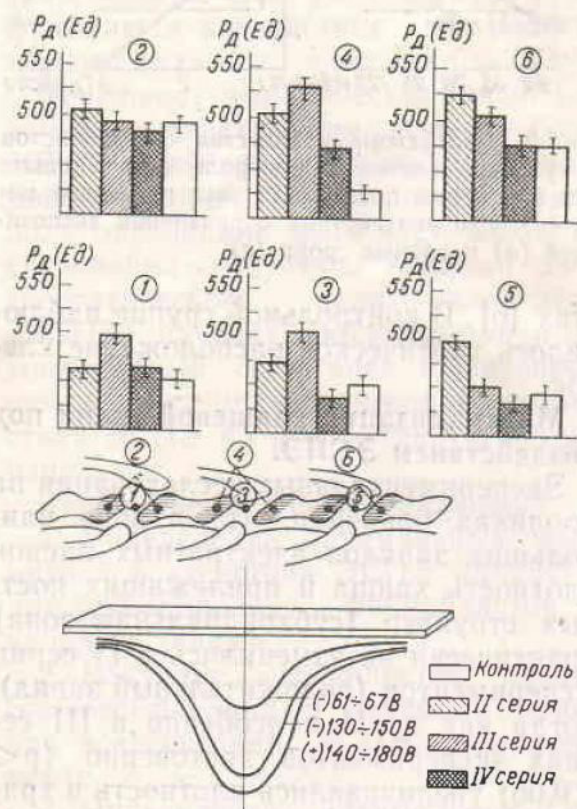


Рис. 3. Диаграмма минерализации (P_d) грудины и ребер при различных точках в контроле и опыте

оказывала существенного влияния на остеорепарацию, которая была выражена при максимальных сроках, не ограничивая таким образом время пребывания электретов в тканях. Наиболее целесообразно раннее начало воздействия ЭСПЭ (в первые 3—6 дней) с целью оптимизации начальных стадий остеорепарации с учетом того, что это не влияет отрицательно на процессы минерализации костной ткани.

Обсуждение. Семилетний опыт применения электретов при лечении повреждений опорно-двигательной системы (более 360 наблюдений) с обнадеживающими положительными результатами [2] является эмпирическим и скорее определяется технологическими возможностями их изготовления и использования. Исследования *in vitro* и *in vivo* существенно не изменили наши

представления о механизме действия электретов. Возникли новые вопросы, связанные с выявленными эффектами использования как изолированных от биообъекта электретов, так и полностью закороченных в электролитных средах.

На процессы развития фибробластов оказывают воздействие два ведущих фактора — механическая нагрузка и уровень обменных процессов [8]. Моделирование указанных процессов позволяло добиться образования различных видов тканей опорно-двигательной системы: от рубцовой до костной. В связи с этим представляет интерес реакция фибробластов в процессе их роста и развития на энергонесущие факторы, каким является электрическое поле электретов.

Постоянное электрическое поле оказывает воздействие на различные стадии процесса остеорепарации. В целях выбора оптимального режима многофакторного воздействия дифференцированно на костную и хрящевую ткани в процессе их репаративной регенерации необходимо решить следующие вопросы. На каких стадиях репаративной регенерации возможно наибольшее влияние ЭСПЭ, как влияет продолжительность воздействия ЭСПЭ на репарацию и какие величины ЭСПЭ наиболее оптимальные. В какой степени ЭСПЭ оказывает воздействие на пролиферацию клеток и их минерализацию.

Положительное воздействие на репарацию оказывает ЭСПЭ при расположении пленки отрицательно заряженной стороной к кости. Наряду с этим, имеет значение градиент напряжения, оптимум был получен при 50 % от максимального заряда ($60 \div 64$ В), при этом существенно увеличивалось количество фибробластов и размеры колоний. Это воздействие особенно сильно прослеживалось в период наиболее активного размножения фибробластов, начиная с 4—5-го дня, и постепенно угасало в более поздние сроки. С увеличением времени воздействия имелась слабая тенденция к увеличению количества фибробластов.

Наряду с улучшением репарации, наблюдалось существенное увеличение минерализации костно-хрящевого регенерата при воздействии отрицательных зарядов ЭСПЭ (наибольшее влияние получено при $(-)$ 64 ± 5 В). При-

чем наблюдался эффект не только в зоне максимума градиента электрического поля, но и в прилежащих тканях. В то же время ЭСПЭ с положительным знаком существенно не влияло на плотность хрящевой и костной ткани.

Таким образом, возможно целенаправленное раздельное воздействие ЭСПЭ на процессы пролиферации и минерализации костной и хрящевой ткани путем моделировки этих зарядов на конструкциях с электретным покрытием.

Выводы

1. Электростатическое поле электретных пленок влияет на рост и ориентацию фибробластов в культуре тканей.

2. Под воздействием электростатического поля электретов активизируется энхондральный остеогенез.

3. Целесообразно дальнейшее изучение проблемы использования имплантируемых электретов для оптимизации остеорепаративных процессов в травматологии и ортопедии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Остеосинтез: Руководство для врачей/Под ред. С. С. Ткаченко.— Л.: Медицина, 1987.— С. 244—258.
2. Руцкий В. В., Хомутов В. П., Моргунов М. С. Особенности остеорепарации при накостном остеосинтезе с использованием электретов//Ортопед. травматол.— 1988.— № 12.— С. 1—5.
3. Ткаченко С. С., Руцкий В. В. Статические электрические потенциалы кости и роль вектора поляризации при электростимуляции остеорепарации//Ортопед. травматол.— 1981.— № 10.— С. 1—5.
4. Ткаченко С. С., Руцкий В. В. 10-летний опыт применения электростимуляции остео-

- репарации в травматологии и ортопедии. Вести. хир.— 1983.— № 6.— С. 77—81.
5. Ткаченко С. С., Руцкий В. В., Хомутов В. П. Накостный электромеханический остеосинтез//Хирургия.— 1984.— № 1.— С. 123—127.
 6. Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники.— М.: Медицина, 1973.
 7. Хомутов В. П. Накостный электромеханический остеосинтез: Автореф. дис. . . канд. мед. наук.— Л., 1986
 8. Bassett C. A. L.//Y. Bone Joint Surg.— 1962.— Vol. 44.— A.— P. 1217—1244.
 9. Kleczynski S.//Int. Orthop.— 1988.— Vol. 12.— P. 83—87.

Поступила 20.06.89

INFLUENCE OF THE ELECTROSTATIC FIELD OF ELECTRETES (ESFE) ON THE GROWTH OF FIBROBLASTS AND ENCHONDRAL OSTEOGENESIS IN MULTIFACTOR MODELING

V. V. Rutsky, L. V. Filev, S. I. Maltsev, R. M. Tikhilëv

The authors have studied the influence of the electrostatic field of electretes (ESFE) on the growth of fibroblasts and enchondral osteogenesis in their experiments on the culture of fibroblast cells and on the costosternal joints of 80 rabbits. The analysis of the results of multifactor influences has shown that ESFE influences the growth and the orientation of the fibroblasts in the cell culture; the maximum number of the cells (110,1 % as com-

pared with the control figures) was obtained, beginning with the 5th day, with the potential difference making 92 B and the exposition lasting 4—5 days. The ESFE influences the activation of enchondral osteogenesis, and the optimal parameters have been reached on the contact of the film with the tissues with its negatively charged surface with the potential difference making 60—90 B without limiting the electrete stay period.