

© Ю. М. Ирьянов, А. В. Попков и Н. И. Антонов, 2014
УДК 616.718.5-001.5-003.9:636.7

Ю. М. Ирьянов, А. В. Попков и Н. И. Антонов

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО КОСТЕОБРАЗОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ ЧРЕСКОСТНОГО ОСТЕОСИНТЕЗА И ИНТРАМЕДУЛЛЯРНОГО ВВЕДЕНИЯ СПИЦ С ПОКРЫТИЕМ ИЗ ГИДРОКСИАПАТИТА

Лаборатория морфологии (зав. — проф. Ю. М. Ирьянов), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, г. Курган

В эксперименте на собаках ($n=16$) моделировали открытый оскольчатый перелом большеберцовой кости и осуществляли интрамедуллярное введение спиц с покрытием из гидроксиапатита и остеосинтез аппаратом Илизарова. При помощи световой микроскопии гистологических срезов, сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского электронно-зондового микроанализа исследовали регенераты костей через 14–360 сут после операции. Установлено, что вокруг спиц образуется зона активного репаративного костеобразования и ангиогенеза, формируется костный футляр со свойствами кондуктора и индуктора остеогенеза. Консолидация перелома осуществляется в ранние сроки по первичному типу без образования хрящевой и соединительной ткани в костной спайке.

Ключевые слова: *кость, заживление перелома, чрескостный остеосинтез, интрамедуллярные спицы, гидроксиапатитное покрытие*

Проблема совершенствования медицинской помощи больным с повреждениями опорно-двигательного аппарата с каждым годом приобретает всё большее значение в связи с ростом числа пострадавших, увеличением инвалидности и смертности от травм. Реальные сроки остеосинтеза продолжают оставаться значительными. С целью оптимизации условий для формирования регенерата кости, сокращения сроков лечения и профилактики осложнений используется метод направленной стимуляции процесса регенерации костной ткани путем применения интрамедуллярных спиц с кальций-фосфатным покрытием [1, 7, 9, 10]. Ранее проведенное исследование свидетельствует о более активных процессах костеобразования, минерализации и органотипической перестройки в регенератах костей, формирующихся при удлинении конечности в условиях интрамедуллярного введения спиц с кальций-фосфатным покрытием [8]. Вместе с тем, процесс репаративного остеогенеза с использованием тех или иных имплантатов, введенных в регенерат кости, еще недостаточно изучен, отсутствуют также характеристики эффективности и механизма их действия. Цель настоящей работы — изучение морфологических особенностей процесса образования кости при консолидации переломов длинных трубчатых костей в условиях чрескостного остеосинтеза и интрамедуллярного введения спиц

с биоактивным кальций-фосфатным покрытием из гидроксиапатита.

Материал и методы. В экспериментах использованы 16 беспородных собак обоего пола в возрасте от 1 года до 5 лет с массой тела $20,0 \pm 2,9$ кг. Уход, оперативные вмешательства и эвтаназию животных осуществляли в соответствии с требованиями приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. У животных под общим наркозом осуществляли интрамедуллярное армирование правой большеберцовой кости двумя спицами (*рис. 1*) из титанового сплава с биоактивным покрытием из гидроксиапатита толщиной 20–40 мкм и пористостью 2–8%, полученным методом анодного оксидирования в дуговом режиме [1]. Покрытие представляло собой многоуровневую систему, состоящую из макро- и микропор от 50–100 нм до 1–2 мкм в диаметре. Остеосинтез выполняли с помощью аппарата Илизарова и моделировали открытый оскольчатый перелом костей голени в средней трети диафиза. Демонтаж аппарата Илизарова проводили через 28 или 35 сут фиксации. В динамике эксперимента осуществляли рентгенографию. Животные были разделены на 4 группы: 14, 21; 28, 35; 42, 90; 180, 360 сут после операции, по 4 животных в каждой группе и по 2 — на каждую временную точку. На всем протяжении эксперимента осуществляли клиническое наблюдение за животными. Рентгенографию осуществляли с помощью рентгеновского аппарата Premium Vet (Sedecal, Испания) в прямой и боковой проекциях сразу после операции и в процессе эксперимента. Для сравнения исследовали также большеберцовые кости 3 интактных взрослых собак. После эвтаназии животных участки диафизов оперированных костей распиливали вдоль, фиксировали в 2% растворе параформальдегида и глутаральдегида и заливали в целлоидин (после декальцинации) и аралдит (без декальцина-

Сведения об авторах:

Ирьянов Юрий Михайлович (e-mail: iryanov@mail.ru), Попков Арнольд Васильевич, Антонов Николай Иванович, лаборатория морфологии, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, 640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, д. 6

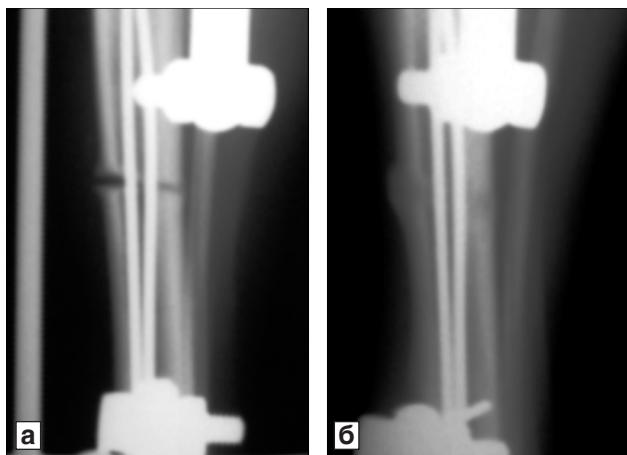


Рис. 1. Рентгенограммы большеберцовой кости собаки после моделирования перелома и интрамедуллярного остеосинтеза.

а — перелом в средней трети диафиза, сразу после операции;
б — новообразованный кортикальный слой в месте перелома через 35 сут после операции

ции). Гистотопографические срезы изготавливали на микротоме (Reichert, Германия) и окрашивали гематоксилином—эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону. Исследования и микрофотосъемку гистологических препаратов проводили с использованием стереомикроскопа Stemi 2000-C и цифровой камеры AxioCam ERc 5s в комплекте с программным обеспечением Zen blue (Carl Zeiss MicroImaging, Германия). Аралдитовые блоки полировали и исследовали при помощи рентгеновского электронно-зондового микроанализатора INCA-200 Energy (Oxford instruments, Англия). Получали изображение зоны перелома в характеристическом рентгеновском излучении кальция. В регенерате определяли содержание и их отношение — индекс компактности регенерата костной ткани и неминерализованных структур, а также концентрацию кальция и фосфора, вычисляли отношение последних двух показателей, характеризующее степень зрелости костной ткани. Затем аралдитовые блоки обрабатывали в 2% растворе этиолята натрия для удаления заливочной среды и изучали в сканирующем электронном микроскопе

JSM-840 (Jeol, Япония). Результаты количественных исследований обрабатывали с применением стандартных методов вариационной статистики. Значимость различий между показателями оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. После операции у всех животных определяется поперечный перелом в средней трети диафиза большеберцовой кости (см. рис. 1, а). Ширина диастаза между фрагментами составляет 0,5–1,0 мм. С 8–10-х суток после операции в непосредственной близости к линии перелома появляются признаки периостальной реакции в виде облаковидных теней. Формирование нового кортикального слоя кости в месте перелома рентгенологически определяется через 35 сут после операции (см. рис. 1, б).

Через 14, 21 сут после операции вокруг интрамедуллярных спиц на протяжении всей их длины формируется костный футляр (рис. 2, а), который сохраняется до конца эксперимента. Он состоит из циркулярно ориентированных костных трабекул, образующихся за счет аппозиционного костеобразования на поверхности спиц и примыкающих к ним трабекул, формирующихся вокруг сосудов. В межтрабекулярном пространстве располагаются участки грануляционной ткани с многочисленными сосудами, особенностью которых является локализация в их просвете эндовазальных эндотелиальных выростов, имеющих характерный черепицеобразный микрорельеф поверхности, образованный плоскими маргинальными участками соседних эндотелиоцитов. Эндотелиальные выросты канализируются и формируют сосудистые почки, дифференцирующиеся в капилляры, растущие терминалы которых выявляются в про-

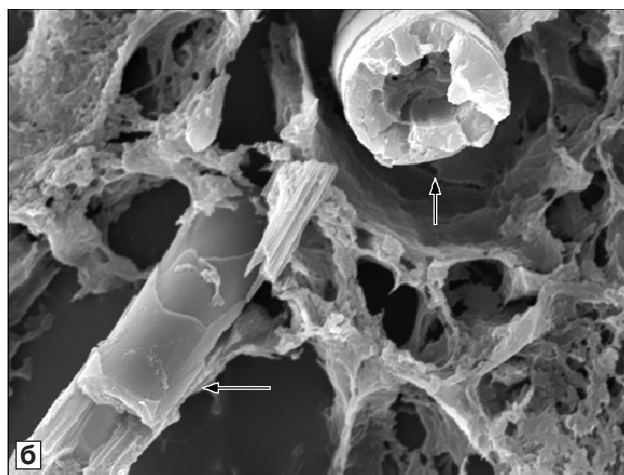
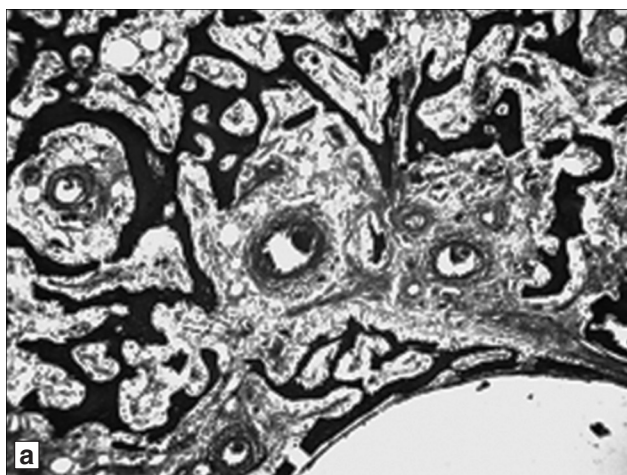


Рис. 2. Зона костеобразования и ангиогенеза вокруг интрамедуллярной спицы через 14 сут после операции.

а — костный футляр; б — эндовазальные эндотелиальные выросты (стрелки). а — целлоидиновый срез, окраска по Ван-Гизону; б — сканирующая электронная микроскопия. а — об. 5, ок. 10; б — ув. 2300

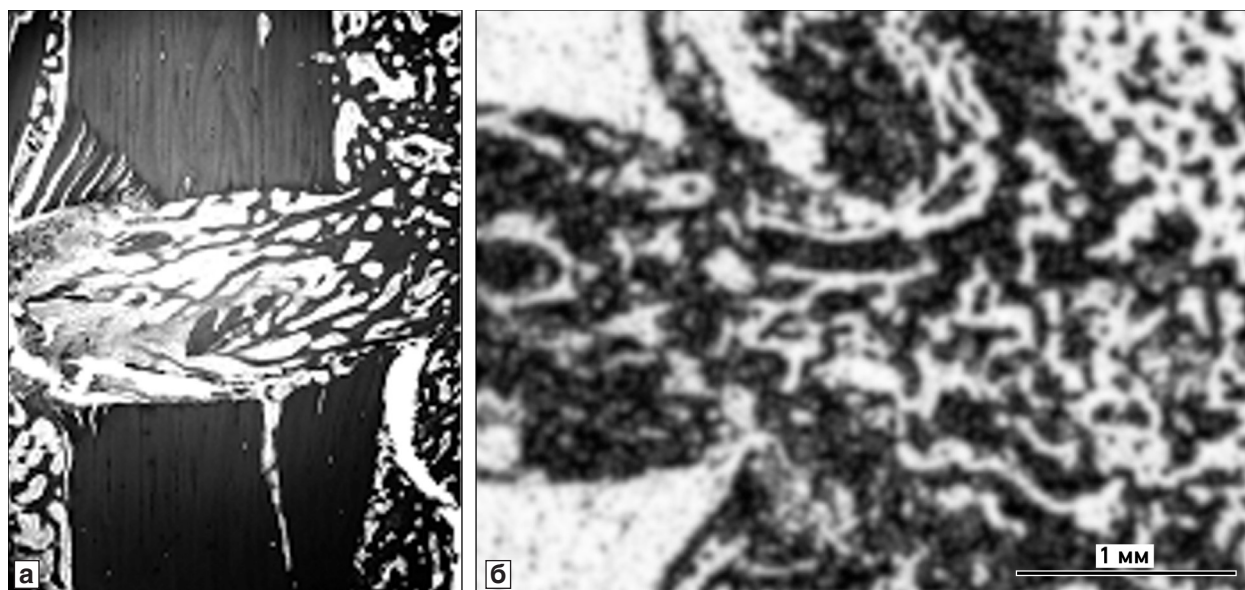


Рис. 3. Эндостально-интермедиарное сращение через 14 сут после операции.

а — целлоидиновый срез, окраска по Ван-Гизону; б — карта электронно-зондового микроанализа, изображение в характеристическом рентгеновском излучении кальция. а — об. 25, ок. 10

свете «материнских» (предсуществующих) сосудов (см. рис. 2, б).

Вокруг спиц выявляется грубоволокнистый остеод, фиброзный каркас которого состоит из муфтообразных скоплений пучков коллагеновых волокон плоской, лентовидной формы, прочно фиксированных к шероховатой, наноструктурированной поверхности покрытия спиц.

В этот период отмечаются формирование первичного костного регенерата (рис. 3) и активный костеобразовательный процесс с вектором роста трабекул, направленным в сторону диастаза, выражающийся в массовой пролиферации остеогенных клеток периоста, эндоста и костного футляра и образовании значительных по объему периостальных и эндостальных костно-остеоидных разрастаний, перекрывающих диастаз.

Регенерат располагается по всему поперечнику кости. В промежуточной зоне многочисленные анастомозирующие трабекулы грубоволокнистой костной ткани врастают навстречу друг другу

с периостальной и эндостальной поверхностями и образуют напластования на концы отломков. Образуется первичное эндостально-периостальное и промежуточное сращение. Содержание кальция и фосфора в промежуточной зоне регенерата составляет 19 и 20% соответственно, а содержание костной ткани — 26% от показателей кортикального слоя диафиза интактных здоровых собак (таблица).

Через 28, 35 сут после операции концы отломков теряют четкие границы из-за массивных отложений в промежуточном пространстве зрелой пластинчатой костной ткани. Периостальные наслоения длиной 2,5–3 мм компактизируются и уплощенной веретеновидной «муфтой» объединяют концы отломков в зоне перелома. В области периоста у концов отломков формируются лентовидные разрастания, образованные мелкопетлистой сетью трабекул пластинчатой костной ткани, перекрывающих линию перелома. Регенерат в промежуточной зоне представлен губчатой и ком-

Относительное содержание кальция, фосфора и костной ткани в промежуточной зоне регенерата и кортикальном слое неповрежденного диафиза бедренной кости собаки ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Показатели	Срок эксперимента, сут				Кортикальный слой
	14, 21	28, 35	42, 90	180, 360	
Кальций	5,0±0,3*	11,0±0,6*	17,3±1,1*	23,3±1,3	25,8±1,1
Фосфор	2,95±0,18*	6,4±0,4*	9,1±0,6*	11,1±0,7	11,8±0,5
Костная ткань	5,7±1,5*	53,4±2,9*	80±5*	94±5	96±4
Ca/P	1,68±0,13*	1,72±0,14*	1,91±0,18	2,10±0,14	2,20±0,13
Индекс компактности	0,350±0,020*	1,15±0,07*	4,02±0,26*	16,0±0,7*	25,0±1,3

* Значимые изменения по сравнению с показателями в кортикальном слое неповрежденного диафиза у интактных животных.

пактной костной тканью, плотно спаянной с кортикальным слоем костных фрагментов, наблюдается фаза органогенеза и ремоделирования, о чем свидетельствует перестройка первичных трабекул в органотипические остеонные структуры, формирующие кортикальный слой (рис. 4). В костном футляре вокруг спиц также наблюдается постепенное преобразование балочных структур грубоволокнистой костной ткани в более минерализованные и зрелые пластинчатые. Содержание кальция и фосфора в промежуточной зоне регенерата в этот период увеличивается до 43–55%, а костной ткани — до 56–57% от показателей кортикального слоя диафиза у интактных здоровых собак (см. таблицу).

Через 42, 90 сут после операции концы отломков соединены в промежуточном пространстве узкопетливой сетью костных трабекул с остеонами различной степени зрелости и с явлениями компактизации по всей ширине кортикального слоя, определяется практически полное периодическое, промежуточное и эндостальное костное сращение. Заживление перелома происходит по типу первичного, за счет врастания в диастаз от концов отломков по ходу кровеносных сосудов остеогенных клеток, формирующих костные трабекулы и остеоны, располагающиеся поперек линии излома. Костный футляр вокруг спиц образован компактным и губчатым веществом пластинчатой костной ткани с формирующимися остеонами, которая распространяется не только в диастаз, но и заполняет костномозговую полость отломков, скрепляя их подобно штифту.

Интенсивный процесс образования кости и ремоделирование костной ткани отмечаются и в периодических участках регенерата, где располагаются многочисленные остеобласты и функционально активные остеокласты, наблюдается перестройка кортикального слоя концов отломков с расширением сосудистых каналов и обширным напластованием на концы фрагментов костных трабекул, окруженных несколькими слоями крупных остеобластов. В новообразованном кортикальном слое в зоне перелома формируются вторичные остеоны пластинчатой костной ткани, однако промежуточная зона регенерата по степени минерализации и органоспецифичности еще значительно отличается от кортикального слоя неповрежденного диафиза интактных животных (см. таблицу). Содержание кальция в промежуточной зоне регенерата в этот период составляет 66–67%, фосфора — 76–77%, костной ткани — 83–84% от показателей в кортикальном слое неповрежденного диафиза.

Через 180, 360 сут после операции эндостальная часть регенерата весьма незначительна и представлена паутиноподобной сетью тонких трабекул пластинчатой костной ткани, в расширенных межтрабекулярных пространствах которых располагаются сосуды с широким просветом и костный мозг. Костный футляр вокруг спиц резко истончается и фрагментируется, на его наружной поверхности располагаются многочисленные функционально активные гипертрофированные остеокласты и резорбционные лакуны. Содержание кальция, фосфора и костной ткани

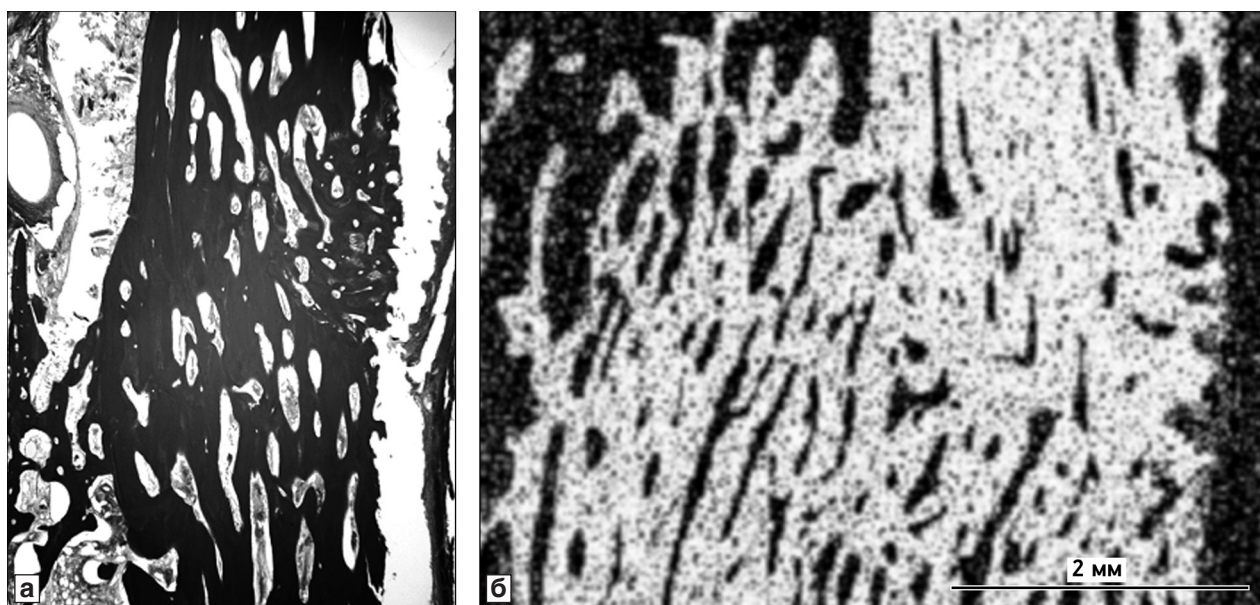


Рис. 4. Новообразованный кортикальный слой в месте перелома большеберцовой кости собаки через 35 сут после операции.

а — целлоидиновый срез, окраска по Ван-Гизону; б — карта электронно-зондового микроанализа, изображение в характеристическом рентгеновском излучении кальция. а — об. 2,5, ок. 10

в новообразованном кортикальном слое на этом этапе эксперимента приближается к показателям кортикального слоя диафиза у интактных животных (см. таблицу).

Исследование содержания костной ткани и основных минеральных компонентов в промежуточной зоне регенерата свидетельствует о том, что с увеличением срока эксперимента в новообразованной кости неуклонно возрастает содержание кальция и фосфора, что отражает постепенную, пролонгированную минерализацию регенерата на протяжении всего эксперимента (см. таблицу). Повышение с увеличением длительности эксперимента коэффициента Ca/P указывает на качественные изменения в составе минеральной фазы костной ткани регенерата, характеризующиеся постепенным уменьшением доли растворимого фосфата кальция и возрастанием доли гидроксиапатита и степени зрелости костной ткани, приближаясь по этим показателям к кортикальному слою диафиза у интактных животных. Постепенно увеличивается и индекс компактности костной ткани новообразованного участка кортикального слоя регенерата, что отражает возрастание степени его органоспецифичности. Вместе с тем, даже к концу эксперимента индекс компактности костной ткани в интермедиарной зоне регенерата составил лишь $64 \pm 4\%$ от показателя в кортикальном слое неповрежденного диафиза, что свидетельствует о незавершенности процессов ремоделирования.

Обсуждение полученных данных. Известно, что интрамедуллярный остеосинтез обеспечивает малотравматичную фиксацию переломов, позволяет более раннюю нагрузку на оперированную конечность и является одним из основных стандартных методов лечения диафизарных переломов костей бедра и голени в большинстве стран [11, 13]. Основным недостатком интрамедуллярного остеосинтеза считается опасность повреждения сосудистого русла в костномозговой полости, что ослабляет остеогенные и остеоиндуктивные потенции плюрипотентных клеток стромы костного мозга [12]. Экспериментальные исследования показали, что введение в костномозговую полость даже тонкого имплантата вызывает значительные нарушения кровоснабжения тканей в костномозговой полости и внутренней части кортикального слоя [15]. Вместе с тем, в настоящее время хорошо зарекомендовали себя в клинике и успешно применяются методики создания сквозных каналов в метафизах и диафизах длинных костей конечностей (туннелизация) или дырчатого дефекта (остеоперфорация) для активизации внутрикост-

ного кровообращения, гемопоза и репаративного остеогенеза [4–6]. Возможный механизм стимулирующего эффекта введения интрамедуллярных спиц связан с пролонгированным формированием в костномозговой полости локальных очагов грануляционной ткани, характерной особенностью которой, как нами показано ранее [2, 3], является экспрессия миграционного фенотипа эндотелиоцитов и как следствие — активизация ангиогенеза, о чем свидетельствует интенсивное формирование многочисленных эндотелиальных выростов, образующих капиллярные почки и эндовазальные разрастания, локализующиеся в просвете сосудов (эндовазальный ангиогенез). Создание таких очагов обеспечивает эндокринными и паракринными путями воздействия увеличение популяции остеопродуцирующих клеток в зоне перелома, стимулирует регенерационный ангиогенез и способствует тем самым активизации процесса остеорепарации. Дополнительное покрытие поверхности титановых имплантатов наноструктурированным высокопористым слоем гидроксиапатита обеспечивает высокую биосовместимость с тканевыми структурами регенерата, увеличивает скорость остеointеграции, уменьшает выход ионов металла и предотвращает образование волокнистой соединительной ткани и хряща в регенерате [1, 14, 15]. Вокруг спиц образуется зона активного аппозиционного костеобразования и ангиогенеза, формируется костный футляр со свойствами кондуктора и индуктора остеогенеза, обеспечивающий направленный рост костной ткани, пролонгированную стимуляцию ангиогенеза и репаративного костеобразования. Консолидация перелома осуществляется в ранние сроки по первичному типу без образования хрящевой и соединительной ткани в костной спайке.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о положительном влиянии интрамедуллярных спиц с покрытием из гидроксиапатита на течение и интенсивность репаративного костеобразования при заживлении перелома. Полученные данные позволяют рекомендовать данный сравнительно малоинвазивный способ оптимизации остеорепарации для применения в комплексе с другими методами консервативного и оперативного лечения перелома кости, особенно при вяло текущих репаративных процессах у детей, пациентов пожилого и старческого возраста, а также у ослабленных больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян В.В., Твердохлебов С.Н., Большасов Е.Н. и др. Остеоиндуктивные покрытия на основе фосфатов кальция и перспективы их применения при лечении политравм. Политравма, 2011, № 3, с. 5–13.

2. Ирьянов Ю.М. и Дюрягина О.В. Влияние локального очага грануляционной ткани, сформированного в костномозговой полости, на репаративное костеобразование. Бюл. экспер. биол., 2014, т. 157, № 1, с. 121–125.
3. Ирьянов Ю.М. и Ирьянова Т.Ю. Морфологическая характеристика грануляционной ткани, формирующейся в костном мозге при чрескостном остеосинтезе. Морфол. ведомости, 2010, № 3, с. 48–51.
4. Крочек И.В., Привалов В.А., Крочек Г.В. и др. Оценка результатов лазерной остеоперфорации при лечении хронического остеомиелита. Лазерная мед., 2005, т. 9, № 3, с. 32–34.
5. Ларионов А.А., Речкин М.Ю. и Асонова С.Н. Влияние остеотомии длинной трубчатой кости на остеорепарацию и регионарное кровообращение (экспериментальное исследование). Гений ортопедии, 1999, № 2, с. 80–85.
6. Михайленков Р.В. Стимуляция гемопоэза при острой лучевой травме у животных. Успехи соврем. естествознания, 2007, № 5, с. 51–54.
7. Попков Д.А. Применение интрамедуллярного армирования при удлинении конечности. Вестн. травматол. ортопед. им. Н.Н. Приорова, 2005, № 2, с. 65–69.
8. Шевцов В.И., Ирьянов Ю.М., Петровская Н.В. и Ирьянова Т.Ю. Влияние кальций-фосфатного покрытия спиц на процессы минерализации и активность остеогенеза при чрескостном дистракционном остеосинтезе. Морфол. ведомости, 2008, № 3–4, с. 231–234.
9. Coles C.P. and Gross M. Closed tibial shaft fractures: management and treatment complications. A review of the prospective literature. Can. J. Surg., 2000, v. 43, p. 256–262.
10. Griffith L.E., Cook D.J. and Frulke J.P. Intramedullary Reaming of Long Bones. In: Practice of Intramedullary Locked Nails. New Development Techniques and Applications. Berlin - Heidelberg - New York, Springer Verlag, 2006, p. 43–57.
11. John V.Z., Alagappan M., Devadoss S. and Devadoss A. A completely shattered tibia. J. Bone Joint Surg. Br., 2005, v. 87, № 11, p. 1556–1559.
12. Joseph B. and Rebello G. The choice of intramedullary devices for the femur and the tibia in osteogenesis imperfecta. J. Pediatr. Orthop., 2005, v. 14, № 5, p. 311–319.
13. Lin C.M. and Yen S.K. Biomimetic growth of apatite on electrolytic TiO₂ coatings in simulated body fluid. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., 2006, v. 26, p. 54–64.
14. Liu X., Chu P.K. and Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys and related materials for biomedical applications. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., v. 47, p. 49–121.
15. Schemitsch E.H., Kowalski M.J. and Swiontkowski M.F. Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. J. Orthop. Trauma, 1994, v. 8, p. 373–382.

Поступила в редакцию 12.11.2013
Получена после доработки 12.03.2014

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF REPARATIVE OSTEOGENESIS UNDER THE CONDITIONS OF TRANSOSSEOUS OSTEOSYNTHESIS AND INTRAMEDULLARY INTRODUCTION OF HYDROXYAPATITE-COATED WIRES

Yu.M. Iryanov, A.V. Popkov and N.I. Antonov

In the experiments performed on 16 dogs, an open comminuted tibial fracture was modeled, then wires with hydroxyapatite coating were inserted intramedullary, and osteosynthesis was performed using the Ilizarov fixator. Bone regenerates were studied 14–360 days after the surgery using the methods of light microscopy, scanning electron microscopy, and X-ray electron probe microanalysis. It was found that a zone of active reparative osteo- and angiogenesis was formed around the wires, as well as a bone sheath with the properties of osteogenesis conductor and inductor. Fracture consolidation occurred early according to the primary type without cartilaginous and connective tissue formation in bone adhesion.

Key words: *bone, fracture healing, transosseous osteosynthesis, intramedullary wires, hydroxyapatite coating*

Laboratory of Morphology, G.A. Ilizarov Russian Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopedics, Kurgan