

С.І. Тертишний, К.Л. Дикий, М.Л. Головаха, В.Н. Чорний, Є.В. Яцун

Морфогенез репаративної регенерації кісткової тканини в умовах застосування магній-резорбуючих імплантів

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: остеосинтез, магній-резорбуючі імпланти, регенерація кісткової тканини.

В експерименті за даними морфологічного аналізу показано, що використання магнієвих імплантів поряд з їх швидкою біодеградацією, що підтверджується даними спектрометрії, для остеосинтезу забезпечує швидке утворення фіброваскулярної тканини, достатню проліферативну активність і диференціювання камбіальних клітин в остеобласти, не порушує процесів васкуляризації та ангиогенезу і призводить до повної репарації і відновлення кісткової структури в місці перелому.

Морфогенез репаративной регенерации костной ткани в условиях применения магний-резорбуемых имплантов

С.И. Тертишный, К.Л. Дикий, М.Л. Головаха, В.Н. Чорный, Е.В. Яцун

В эксперименте по данным морфологического анализа показано, что использование магневых имплантов наряду с их быстрой биодеградацией, что подтверждается данными спектрометрии, для остеосинтеза обеспечивает быстрое образование фиброваскулярной ткани, достаточную пролиферативную активность и дифференцировку камбиальных клеток в остеобласты, не нарушает процессов васкуляризации и ангиогенеза и приводит к полной репарации и восстановлению костной структуры в месте перелома.

Ключевые слова: остеосинтез, магний-резорбируемые импланты, регенерация костной ткани.

Патология. – 2012. – №1 (24). – С. 85–88

The morphogenesis of reparative regeneration of bone tissue in the use of magnesium-resorbable implants

S.I. Tertyshnyi, K.L. Dikiy, M.L. Golovakha, V.N. Chorniy, E.V. Yatsun

Morphological analysis showed that the use of magnesium implants for osteosynthesis along with their rapid biodegradation, which is confirmed by spectrometry, provides a rapid formation of fibrovascular tissue, sufficient proliferative activity and differentiation of cambial cells into osteoblasts. It also does not violate the processes of vascularization and angiogenesis and leads to complete repair.

Key words: osteosynthesis, magnesium-resorbable implants, regeneration of bone tissue.

Pathologia. 2012; №1 (24): 85–88

Нині здійснюють дослідження неорганічних матеріалів, що змогли б замінити імпланти, виготовлені з біоінертних металів, з часом піддаватись біодеструкції та стимулювати фізіологічні процеси регенерації кісткової тканини [1–4].

Мета роботи

За результатами патоморфологічного аналізу в експерименті оцінити результати використання магнієвих біорезорбуючих імплантів для остеосинтезу.

Матеріали і методи дослідження

Матеріал дослідження – 10 експериментальних тварин (кролі), яким наносили перелом стегнової кістки з наступним остеосинтезом із застосуванням стрижнів з магнієвих біорезорбуючих сплавів (6 тварин) і стрижнів, виготовлених з нержавіючої сталі (4). Контрольну групу склали 3 тварини.

Для патоморфологічного дослідження фрагменти кісткової тканини фіксували в 15% розчині нейтрального формаліну. Декальцинацію проводили в 10% розчині азотної кислоти, виготовленої на 5% формаліні з додаванням 5 г ацетату калію. Фарбування декальцинованої тканини проводили гематоксиліном і еозинном за стандартною методикою. Для імуногістохімічного

дослідження проводили безкислотну декальцинацію [5]. Імуногістохімічну оцінку проліферативної активності кісткових клітин у ході регенерації проводили з використанням маркера до Кі67. Для диференціювання Т- і В-лімфоцитів застосовували маркери CD 3 і CD20. Імуногістохімічне виявлення антигенів проводили відповідно до протоколів, детально описаних в інструкціях фірми-виробника антитіл.

Морфометричні дослідження здійснювали з використанням комп'ютерної системи цифрового аналізу зображення KS 200 (Kontron Elektronik, Німеччина). Процеси резорбції магнієвого імпланту контролювали за допомогою спектрофотометра BAIRD EX 6500 за рівнем спектра енергетичної дисперсії хімічних елементів. При цьому в об'ємному блоці тканини розмірами 0,5×0,5×0,5 см визначали концентрацію магнію і суміжних елементів: вуглецю, кисню, азоту.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що загоєння переломів стегнової кістки у тварин в умовах застосування магнієвих імплантів для остеосинтезу мало відрізнялось від процесів фізіологічної репарації, що спостерігали у контрольних тварин. У порівнянні з контрольними спостереженнями

відзначено певні особливості. В ряді спостережень після експериментального перелому стегнової кістки в умовах інтрамедулярного остеосинтезу магнієвими сплавами незначно скорочувались строки репаративного остеогенезу. При патоморфологічному дослідженні в ранні терміни (1–3 доби) відзначено посилену міграцію клітин крові, активацію резидентних макрофагів і фібробластів у місці ушкодження. У зв'язку з цим, прискорювався час початку утворення грануляційної і фіброваскулярної тканини в зоні перелому у порівнянні з контрольними спостереженнями. У складі грануляційної тканини переважав волокнистий сполучнотканинний компонент з незначною кількістю макрофагів, фібробластів і тонкостінних новостворених судин.

У процесі дозрівання грануляційної тканини відзначено виражену проліферацію компонентів сполучної тканини, що документували на імуногістохімічних препаратах за наростанням експресії маркера клітинної проліферації – Ki67 (рис. 1). Серед фібробластів переважали зрілі веретеноподібні форми. Вже у період утворення грануляційної тканини можна було спостерігати проліферацію попередників остеогенних клітин в окісті й на внутрішній поверхні кістково-мозкового каналу. Зростала кількість і щільність розташування колагенових волокон. Вони мали характерну поздовжню орієнтацію і формувались з колагенових фібрил.

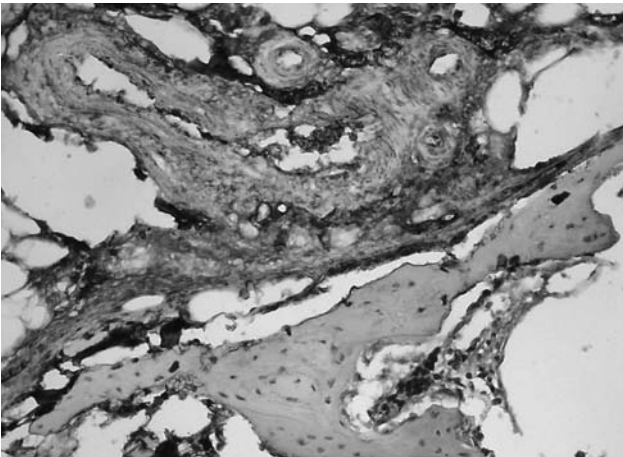


Рис. 1. Проліферація клітинних компонентів фіброваскулярної тканини в зоні перелому. 36×200 . ІГХ с Ki-67.

Ділянки фіброваскулярної тканини заповнювали порожнини між відломками кістки. Середня площа поперечного перетину таких порожнин становила на гістологічних препаратах $4391,0 \pm 1099,25$ мкм. З часом окремо розташовані кісткові трабекули з'єднувались між собою клітинно-волокнистими тяжами, в складі яких переважали молоді форми фібробластів. З біодеградацією магнієвого імпланту у тканині з'являлись багатоядерні макрофаги, що властиво для продуктивного гранульоматозного запалення. Виявлені зміни можна охарактеризувати як гранульоми з низьким рівнем обміну, що спостерігається при ушкодженні тканини інертними речовинами. Такі зміни не відзначені у контрольних тварин. У цих ділянках майже не спостерігали інфільтрацію поліморфноядерними лейкоцитами або розвитку імунного запалення.

У ряді спостережень при використанні металевих стрижнів для остеосинтезу відзначено розвиток запалення. У деяких ділянках на гістологічних препаратах визначали різну за виразністю запальну інфільтрацію. Переважала дифузна інфільтрація, що поширювалась по ходу колагенових волокон, а також інфільтрація, що оточувала кісткові балки й судини. Клітинний інфільтрат був досить поліморфним. Поряд з поліморфноядерними лейкоцитами траплялась велика кількість Т- і В-лімфоцитів, що реєстрували в імуногістохімічних препаратах з маркерами CD3 і CD20, а також макрофагів, гістіоцитів, поодиноких еозинофілів. Скупчення значної кількості лімфоцитів відзначалось серед новостворених судин, у ранні терміни у безпосередній близькості від дрібних крововиливів, що завжди супроводжували місце перелому, і в перифокальних зонах некротизованої кісткової тканини. Ділянки некрозу кісткової тканини виявляли в окремих спостереженнях у ранні терміни після перелому при використанні стрижнів з нержавіючої сталі, вони були досить обмеженими й у подальшому піддавались повній резорбції.

У наступному терміні спостереження (через 1 місяць) відзначено посилену регенерацію, що відбувалась шляхом утворення кісткової тканини з мезенхімальних елементів, що вросли між відломками кістки. В остеогенній фібронетикулярній тканині з'являлись множинні кісткові балочки з малою кількістю вапна, кількість яких збільшувалась відповідно до термінів спостереження. У ділянках з щільнішим розташуванням колагенових волокон перебували і більші кісткові балки.

Джерелом остеогістогенезу рівною мірою служили остеогенні клітини окістя й клітини, що перебували в складі ендосту – тонкої сполучнотканинної пластинки, що покриває внутрішню поверхню каналу діафізу. Вивчення морфологічних змін у зоні перелому дозволяє визначити, що у формуванні кісткового регенерату, очевидно, брали участь і клітини, що супроводжували зростаючі судини. Згодом такі камбіальні клітини диференціювались в остеобласти, їх часто виявляли серед судин, що вросли в зону регенерації (рис. 2).

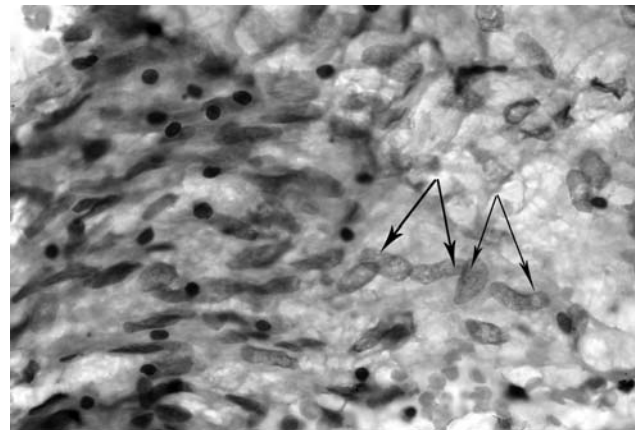


Рис. 2. Камбіальні клітини (показано стрілкою), що були джерелом остеогістогенезу. Збільш. $\times 1000$. Фарбування гематоксилином і еозином.

Клітини характеризувались значними розмірами з дифузно розташованою хроматиною мережею, часто розташовувались у вигляді ланцюжків, що йшли вздовж судин. У цьому терміні спостереження в області перелому спостерігали множинні нещодавно сформовані островці остеїдної тканини і кісткові трабекули з середньою площею поперечного перетину $11891,24 \pm 5365,81$ мкм. Значно зменшувались порожнини, заповнені фіброваскулярною тканиною. У кожному зі строків спостережень у різних полях зору можна було спостерігати різні стадії регенераторного процесу. Так, новоутворення колагенових волокон, що є продуктами синтетичної діяльності остеобластів, посилено відбувалось і було характерно для ранніх стадій репаративних змін, однак їх утворення визначалось і у значно пізніших стадіях. Тому поряд з наявністю зрілих кісткових трабекул, оточених активними остеобластами, повсюдно виявлялись молоді колагенові фібрили й волокна. З диференціюванням остеобласти поринали в кісткові пластинки і перетворювались в остецити, розташовані в кісткових лакунах.

Проліферативна активність клітин, що брали участь у формуванні кісткової тканини, що є основним механізмом як фізіологічної, так і репаративної кісткової

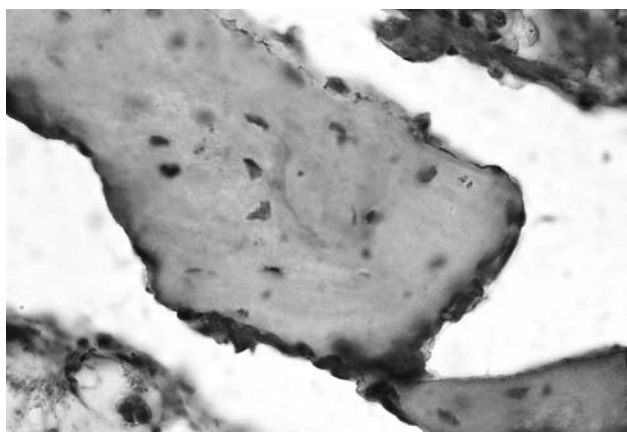


Рис. 3. Кісткова трабекула, оточена активними остеобластами. Збільш. x900. ПГХ з Кі67.

регенерації, наочно визначалась на імуногістохімічних препаратах, оброблених маркером до антигену Кі67, асоційованому з фазами клітинного циклу. В таких препаратах активні остеобласти на поверхні кісткових трабекул набували коричневого кольору (рис. 3). Використання магнієвих імплантів в зонах перелому не порушувало процесів васкуляризації та ангиогенезу як основного фактора диференціювання клітин-попередників в остеобласти. У всіх спостереженнях виявлялась розповсюджена мережа мікросудин, щільність яких збільшувалась відповідно до інтенсивності та строків репаративного процесу. Вже в ранній термін після перелому формування ретикулофіброзної тканини відбувалось з формуванням порожнин різних розмірів, на внутрішній поверхні яких з'являлась ендотеліальна вистилка. В окремих спостереженнях при використанні для остеосинтезу стрижнів з нержавіючої сталі відзначено порушення кровопостачання в остеонах компактної кістки, що призводило до загибелі клітин-попередників, що виходять з ендосту з наступною резорбцією таких ділянок і заміщенням їх волокнами сполучної тканини. При застосуванні магнієвих імплантів такі зміни не спостерігали. Тому у всіх спостереженнях із застосуванням магнієвих імплантів рівень кровопостачання сприяв підтримці достатнього енергетичного потенціалу для забезпечення процесів нормальної регенерації відповідно до термінів загоєння переломів. Отже, адекватне кровопостачання визначало поступовий і наростаючий процес регенераційних змін, що мало відрізнялись від нормального перебігу репаративного процесу.

Еволюція морфологічних змін у зоні перелому відбувається на фоні певних змін з боку самого магнієвого імплантату. За даними спектрального аналізу в ранній термін спостереження (до 2 тижнів), вміст магнію в імплантаті становив 95,25%, через 3 місяці – 61,45%. Поряд з цим, через 3 місяці значно зростає вміст суміжних елементів (вуглецю, кисню, азоту), що становлять основу органічного матриксу (рис. 4).

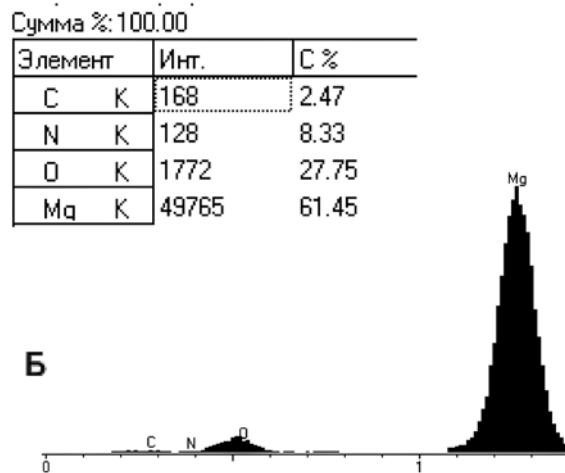
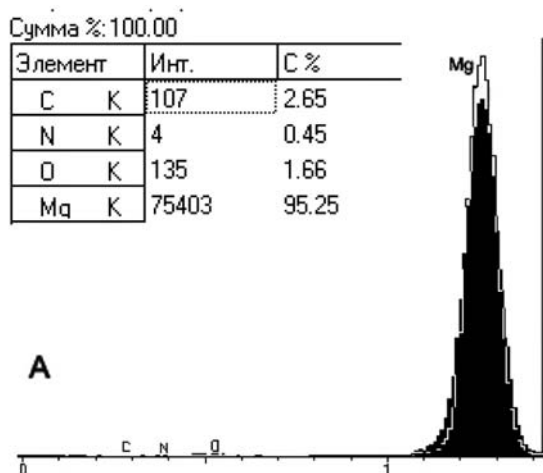


Рис. 4. Вміст магнію в імплантаті за даними спектрального аналізу через 2 тижні (А) і 3 місяці (Б) після остеосинтезу.

Така відносно швидко біодеградація магнієвого імплантату може сприятливо відобразитись на перебігу репаративного процесу. Збільшення концентрації магнію в навколишній тканині може сприяти переходу його в клітини. Як вважають автори [6], це може пригнічувати розвиток запальних реакцій і збільшувати метаболічну активність клітин. У дослідженнях з вивчення хімічного складу кісткового регенерату в експерименті також виявляли збільшення вмісту магнію, що бере участь у якості коферментів лужної фосфатази у процесах обвапнування органічного матриксу [7–9]. Отже, процес біодеградації магнієвого імплантату з підвищенням концентрації магнію в навколишній тканині набуває важливого значення в репаративному процесі.

У пізніх термінах спостережень (6 місяців) ділянка кістки в області імплантату за будовою практично не відрізняється від кісткової тканини нормальної будови. Кісткова мозоля, що утворюється в процесі загоєння перелому, незначно відрізнялась від кісткової тканини в контрольних спостереженнях дещо безладним розташуванням кісткових поперечин. При вивченні гістологічних препаратів у пізніх строках спостережень можна відзначити різні за величиною і формою остеони з різною кількістю остеоцитів. Межі остеонів були досить чіткі. В одиничних концентричних кісткових пластинах остеона за більш блідим фарбуванням виявлено незначне зниження щільності колагенових волокон. Крім того, знижена щільність волокон між остеонами, що поступово відновлювалась за ступенем обвапнування.

Висновки

Використання магнієвих імплантів достатньою мірою забезпечує активізацію процесів репарації та віднов-

лення кісткової структури в місці перелому в термінах, порівняних з використанням металевих стрижнів для остеосинтезу. Поряд з цим, досить швидко відбувається біодеградація самого магнієвого імплантату, що дозволяє уникнути повторних операцій, пов'язаних з видаленням фіксаторів.

Список літератури

1. In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation / E. Zhang, L. Xu, G. Yu [et al.] // J Biomed Mater Res A. – 2009. – V. 90, №3. – P. 882–893.
2. Magnesium alloys as implant materials – principles of property design for Mg-RE alloys / N. Hort, Y. Huang, D. Fechner [et al.] // Acta Biomater. – 2010. – V. 6, №5. – P. 1714–1725.
3. Bone-implant interface strength and sseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control / C.Castellani, R.A. Lindtner, P. Hausbrandt [et al.] // Acta Biomater. – 2011. – V. 7, №1. – P. 432–440.
4. Biocompatibility of magnesium-zinc alloy in biodegradable orthopedic implants / D. Chen, Y. He, H. Tao [et al.] // Int J Mol Med. – 2011. – V. 28, №3. – P. 343–348.
5. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова – М: Медицина, 1996. – 544 с.
6. Метаболические болезни костей / пер. О. Хабиб // Consilium-medicum. 2000. – Т. 2, № 6. – Режим доступа: http://www.consilium-medicum.com/media/consilium/00_06/236.shtml
7. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / Ф.Т. Бингам, М. Коста, Э. Эйхенбергер и др. – М.: Мир, 1993. – 368 с.
8. Погорелов М.В. Мінеральний обмін травмованої кістки в нормі та при порушенні водно-солевого балансу / М.В. Погорелов // Морфологія. – 2009. – Т. III, №3. – С. 90–94.
9. Скальный А.В. Биоэлементы в медицине / А.В.Скальный, И.А. Рудаков – М.: ИД «ОНИКС 21 век»: Мир, 2004 – 272 с.

Відомості про авторів:

Тертишний С.І., д. мед. н., професор каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права ЗДМУ.

Дикий К.Л., провідний інженер з електронної мікроскопії.

Головаха М.Л., к. мед. н., доцент, зав. каф. травматології і ортопедії ЗДМУ.

Чорний В.Н., к. мед. н., асистент каф. травматології і ортопедії ЗДМУ.

Яцун Є.В., асистент каф. травматології і ортопедії ЗДМУ.

Адреса для листування:

Тертишний Сергій Ігорович. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права ЗДМУ.

Тел.: (0612) 99 52 04.

E-mail: tertishniy@i.ua

Надійшла в редакцію 20.02.2012 р.