

УДК 616.718.4-001.5-089.2:615.465

Регенерация костной ткани при остеосинтезе имплантатами из сплавов на основе магния в эксперименте

М. Л. Головаха, В. Н. Черный, Е. В. Яцун, С. И. Тертышный, К. Л. Дикий

Запорожский государственный медицинский университет. Украина

Peculiarities in the regeneration of a fracture of the femoral bone after osteosynthesis with rods, made of Mg-10 magnesium alloy, were studied in 12 pubescent rabbits. In control animals, a modelled fracture of the femur was followed by osteosynthesis with intramedullary fixing devices, made of stainless steel. When the animals were taken out of the experiment, the femur was sawn through the fracture area together with the graft. It was found out that the healing of femoral fractures in animals in conditions of using grafts, made of a modified magnesium alloy, did not differ from the processes of reparation, observed in controls. The consolidation of the fracture took place within the same terms and without any pathological disturbances.

Проведено дослідження особливостей регенерації перелому стегнової кістки після остеосинтезу стрижнями з модифікованого сплаву магнію Mg-10 на 12 статевозрілих кролях. Контрольним тваринам після моделювання перелому стегнової кістки проводили остеосинтез внутрішньокістковими фіксаторами з іржостійкої сталі. Після виведення тварин з експерименту стегнову кістку розпилювали через зону перелому разом з імплантатом. Встановлено, що загоєння переломів стегнової кістки у тварин за умов застосування імплантатів з модифікованого сплаву магнію не відрізнялося від процесів репарації, яку спостерігали в контрольних тварин. Консолідація перелому відбулася в однакові терміни і без будь-яких патологічних відхилень.

Ключевые слова: перелом, остеогенез, магний, имплантаты

Введение

На протяжении многих лет нержавеющая сталь, кобальт-хром и титановые сплавы являются основными материалами, которые используют для изготовления различных имплантатов в травматологии [5, 6]. Известно, что стандартные хирургические сплавы, например: нержавеющая сталь, сплавы кобальта и хрома, подвержены коррозии, продукты которой вызывают локальный воспалительный процесс [1, 7, 10]. Кроме того, проблемой остается повторная операция по удалению металлоконструкции, использованной для остеосинтеза отломков кости. В связи с этим продолжается поиск материалов для изготовления имплантатов для остеосинтеза отломков кости, которые будут метаболизироваться в организме и не потребуют операции для их удаления.

Полимеры были первыми материалами для имплантации, которые начали использовать как биоразлагаемые и биоабсорбируемые. Сегодня применяют полигликолевую (PGA) и полимолочную

(PLA) кислоты как в чистом виде, так и в комбинации с керамикой (композитные материалы). Тем не менее, механические свойства данных материалов не позволяют применять их для остеосинтеза.

Не одно десятилетие внимание исследователей привлекают сплавы на основе магния как биоразлагаемые и биоабсорбируемые материалы [12]. Магний и продукты его коррозии имеют высокую биологическую совместимость. Попытки применения магниевых конструкций в хирургии отмечены в начале XX века. J. Lambotte первым объявил об использовании пластины из чистого магния вместе с позолоченными стальными гвоздями, но коррозия имплантата в организме произошла слишком быстро [13]. Проблемой остаются недостаточные жесткость и прочность существующих сплавов на основе магния, а также очень быстрая биологическая коррозия. Улучшение коррозионных и механических свойств может быть достигнуто путем легирования сплава, но вещества для них должны быть тщательно подобраны, чтобы сохранить

биосовместимость и коррозионную устойчивость [3, 4, 10].

Мы провели исследования, в результате которых предложен новый материал, получаемый путем легирования серебром промышленного сплава магния МЛ–10 [8]. В эксперименте отмечено, что полученный материал имеет существенно меньшую скорость рассасывания в организме (6 мес.).

Цель исследования: изучить влияние продуктов рассасывания сплава магния на процессы репаративного остеогенеза при моделировании перелома кости в условиях эксперимента.

Материал и методы

Исследование выполнено на 12 половозрелых кроликах. Хирургическое вмешательство осуществляли в условиях операционной районной ветеринарной лечебницы. Моделировали переломы верхней трети обеих бедренных костей. В основной группе проводили интрамедуллярный остеосинтез фиксаторами из сплава МЛ–10, легированного серебром. В контрольной группе животных остеосинтез выполнили стержнями из нержавеющей стали — 12Х18М10Т (рис. 1).

Животных выводили из эксперимента через 2 недели, 1, 4 и 6 мес. после операции. Выделяли бедренную кость и распиливали ее через зону перелома вместе с имплантатом. Для забора биологического материала проводили срез по зоне репарации.

Для патоморфологического исследования фрагменты костной ткани фиксировали в 15 % растворе нейтрального формалина. Декальцинацию проводили в 10 % растворе азотной кислоты, приготовленной на 5 % формалине с добавлением 5 г ацетата калия. Срезы, изготовленные из декальцинированной ткани, окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. В дальнейшем использовали бескислотную декальцинацию в 5 % растворе трилона Б при рН среды 7,4. Пролиферативную активность клеток костной ткани определяли с использованием моноклональных антител против ядерных антигенов Ki–67 Mo a-Hu Ki–67 Antigen, Clone М1В–1 («ДАКО», Дания). Исследования проводили косвенным иммунопероксидазным методом с предыдущей двухминутной микроволновой демаскировкой эпитопа в СВЧ печи «Samsung» при 720 W. Во втором слое использовали меченные пероксидазой антитела против Ki–67-антигена и гамма-глобулинов мыши стандартной системы визуализации LSAB фирмы «ДАКО» (Дания), а в качестве хромогена использовали DAB (диаминобензидин). Иммуногистохимическое выявление антигенов проводили в соответствии с протоколом, описанным в инструкциях фирмы-изготовителя соответствующих антител.



Рис. 1. Фото рентгенограммы кролика после остеосинтеза имплантатами из сплава МЛ–10

Результаты и их обсуждение

При изучении макроскопических препаратов установлено, что заживление переломов бедренной кости у животных в случае применения имплантатов из сплавов магния существенно не отличалось от процессов физиологической репарации, которая наблюдалась у контрольных животных. Консолидация перелома произошла в одинаковые сроки и без каких-либо патологических изменений. Однако при проведении патоморфологического исследования в опытной группе мы отметили ряд особенностей процессов регенерации у животных опытной группы по сравнению с контрольной.

Морфологическая картина через 2 недели после операции

При микроскопическом исследовании в ранние сроки (через 2 недели после перелома и остеосинтеза имплантатами из сплава магния) отмечена усиленная миграция клеток крови, активация резидентных макрофагов и фибробластов в зону повреждения. Формировался кровяной сгусток, который инициирует образование грануляционной ткани, способствует образованию мелких сосудов. В течение одной недели макрофаги участвуют в резорбции тканевого детрита в месте перелома. Ко 2-й неделе формируется волокнисто-тканевый компонент. В составе формирующейся грануляционной ткани преобладал волокнистый соединительнотканый компонент с незначительным количеством макрофагов, фибробластов и тонкостенными новообразованными сосудами (рис. 2). Отмечено ускорение образования грануляционной и фиброретикулярной ткани в зоне перелома, по сравнению с остеогенезом после остеосинтеза имплантатом из нержавеющей стали.

В процессе созревания грануляционной ткани (до 2 недель с момента операции) отмечали выраженную пролиферацию компонентов соединительной ткани,

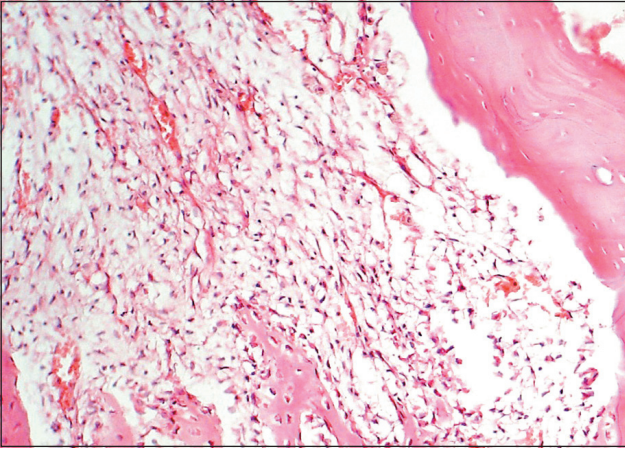


Рис. 2. Микрофото грануляционной ткани в зоне перелома через 2 недели после травмы. Имплантат из сплава МЛ-10. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

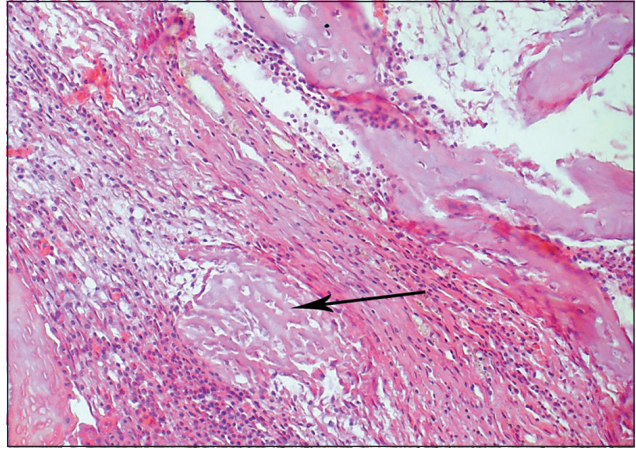


Рис. 5. Микрофото. Воспалительная инфильтрация около участка некроза (стрелка) костной ткани в зоне перелома, 2 недели, имплантат 12X18M10T. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

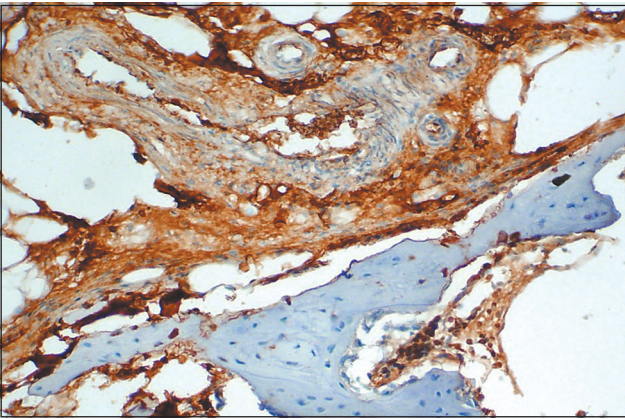


Рис. 3. Микрофото. Пrolиферация клеточных компонентов фиброретикулярной ткани в зоне перелома. В коричневый цвет окрашен пролиферирующий компонент соединительной ткани — фибробласты, 2 недели после травмы. Имплантат из сплава МЛ-10. Иммуногистохимия с Ki-67. Ув. 200

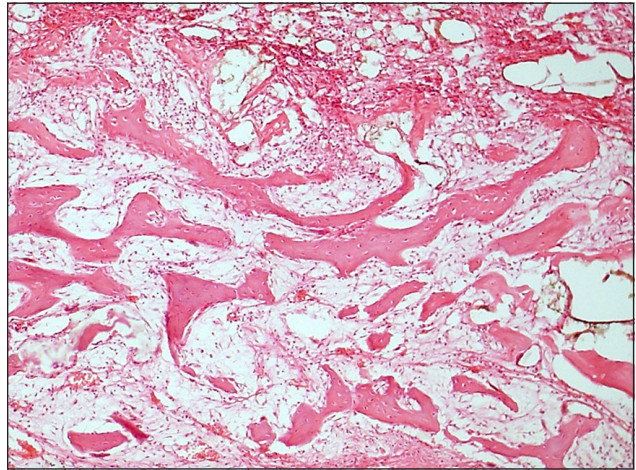


Рис. 6. Микрофото. Слабо обызвествленные островки костной ткани через 1 мес. после перелома. Имплантат из сплава МЛ-10. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

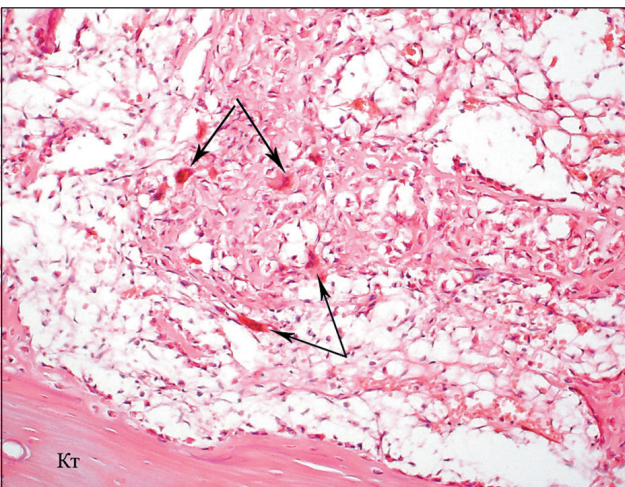


Рис. 4. Микрофото. Накопление гигантских многоядерных макрофагов в зоне резорбции магниевого имплантата через 2 недели. Кт — костная ткань. Гематоксилин и эозин. Ув. 200

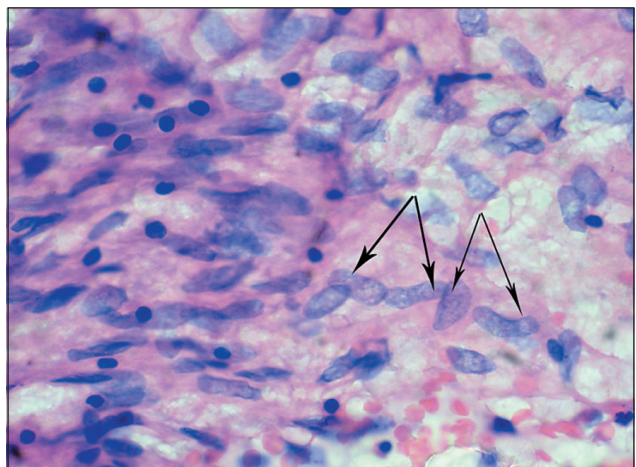


Рис. 7. Микрофото. Камбиальные клетки (показаны стрелкой), являющиеся источником остеогенеза через 2 мес., имплантат из сплава магния — МЛ-10. Гематоксилин и эозин. Ув. 1000

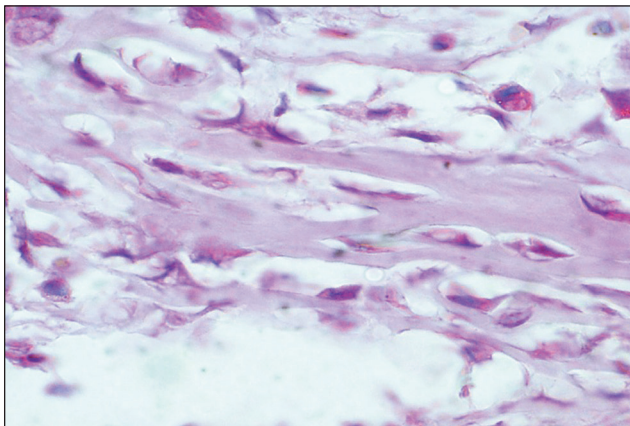


Рис. 8. Микрофото. Новообразованные продольные коллагеновые фибриллы с остеобластами, 4 мес., имплантат из сплава МЛ-10. Гематоксилин и эозин. Ув. 900

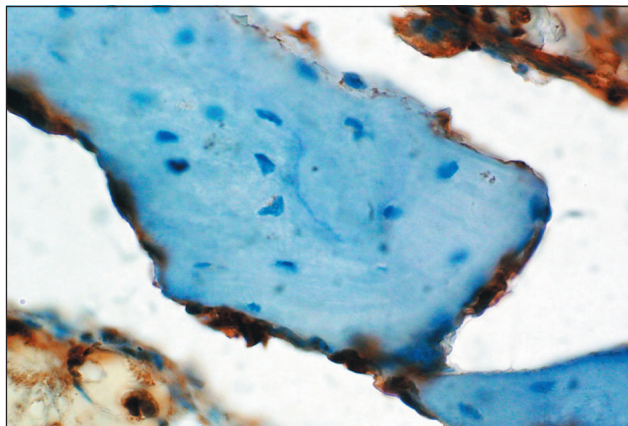


Рис. 10. Микрофото. Костная трабекула, окруженная активными остеобластами, 4 мес., имплантат из сплава МЛ-10. Иммуногистохимия с Ki-67. Ув. 900



Рис. 9. Микрофото. Костная трабекула, окруженная активными остеобластами (стрелки), 4 мес., имплантат из сплава МЛ-10. Гематоксилин и эозин. Ув. 900

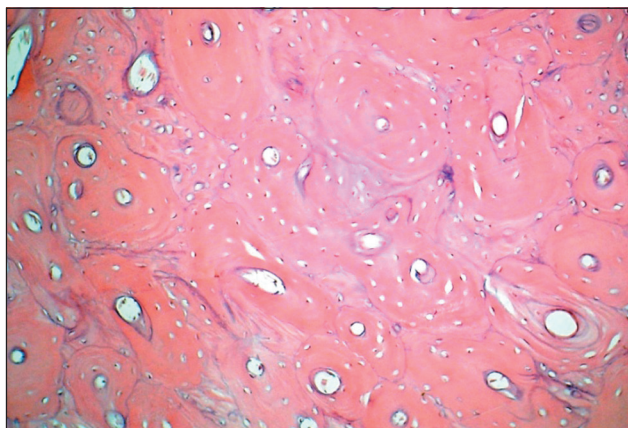


Рис. 12. Микрофото участка сформировавшейся костной ткани в области расположения магниевого имплантата. Гематоксилин и эозин. Ув. 200

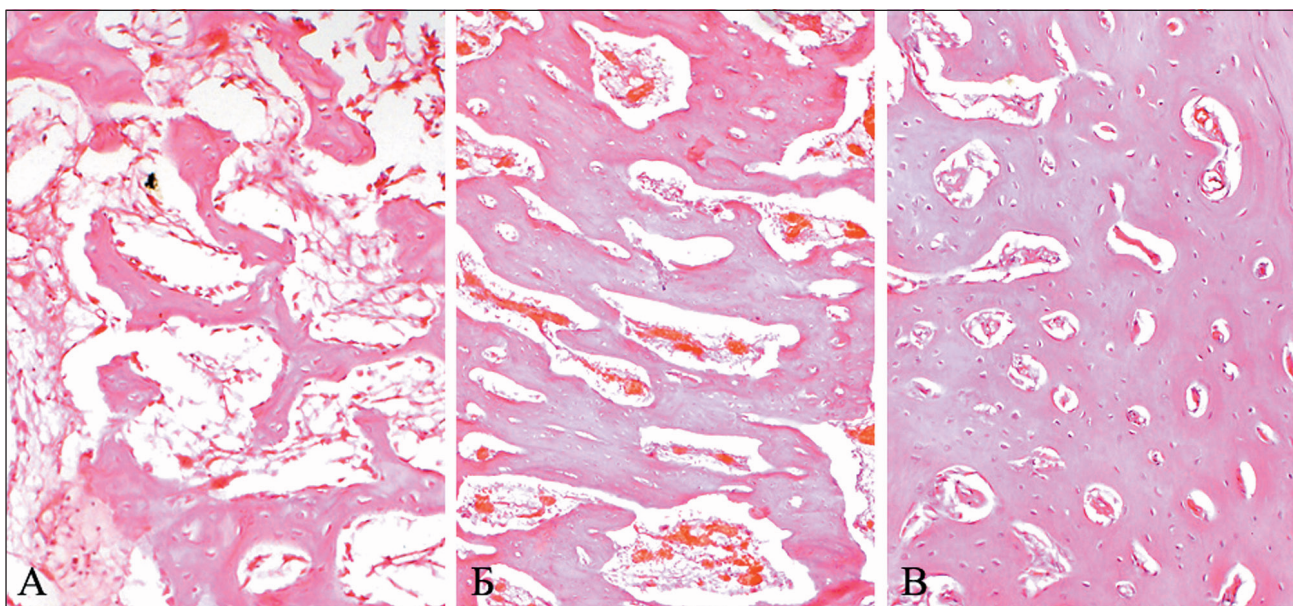


Рис. 11. Микрофото. Динамика репаративного процесса: а) 2 недели, б) 1 мес., в) 4 мес. после экспериментальной травмы с применением магниевых имплантатов. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

что документировано на иммуногистохимических препаратах по нарастанию экспрессии маркера клеточной пролиферации — Ki-67 (рис. 3). Иммуноокрашивание с маркером Ki67 в коричневый цвет характерно для клеток соединительной ткани, находящихся в G1 фазе клеточного цикла.

Среди фибробластов преобладали зрелые клетки веретеновидной формы. Наблюдали пролиферацию предшественников остеогенных клеток в надкостнице и на внутренней выстилке костномозгового канала. Коллагеновые волокна имели характерную продольную ориентацию.

Фиброретикулярная ткань соединила отломки кости. Средняя площадь поперечного сечения таких полостей составляла на гистологических препаратах $(4391,00 \pm 1099,25)$ мкм. С течением времени отдельно лежащие костные трабекулы соединялись между собой клеточно-волоконистыми тяжами, в составе которых преобладали молодые формы фибробластов. По мере биодеградации магниевого имплантата в ткани появлялись многоядерные макрофаги, что характерно для продуктивного гранулематозного воспаления (рис. 4). Появление многоядерных макрофагов — это реакция системы макрофагальных фагоцитов на инородное тело неорганической природы, которое не может быть переработано ферментами макрофагов.

Мы предполагаем, что выявленные изменения характеризуются как гранулемы с низким уровнем обмена, что присуще повреждению костной ткани инертными веществами. В этих участках практически не наблюдали инфильтрацию полиморфноядерными лейкоцитами, а также развитие иммунного или другого воспаления.

При использовании стержней из нержавеющей стали для остеосинтеза в некоторых участках гистологических препаратов была отмечена различная по выраженности воспалительная инфильтрация (рис. 5). Преобладала диффузная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами, распространявшаяся по ходу коллагеновых волокон, а также инфильтрация окружающая костные балки и сосуды. Клеточный инфильтрат был достаточно полиморфным. Наряду с полиморфноядерными лейкоцитами отмечали большое количество Т- и В-лимфоцитов, что регистрировалось в иммуногистохимических препаратах с маркерами CD3 и CD20.

При использовании стержней из нержавеющей стали отмечены скопления значительного количества лимфоцитов вокруг новообразованных сосудов в непосредственной близости от мелких кровоизлияний, которые всегда сопровождали место перелома, а также в перифокальных зонах некротизированной костной ткани. Участки некроза костной ткани, ко-

торые встречались в единичных наблюдениях в ранние сроки после перелома, были достаточно ограниченными и в дальнейшем подвергались полной резорбции. На рис. 5 представлен участок некроза, лежащий среди жизнеспособных тканей.

Морфологическая картина через 1 мес. после операции

В следующий срок наблюдения, 1 мес. после остеосинтеза имплантатами из сплава магния, отмечали регенерацию, которая происходила путем образования костной ткани из мезенхимальных элементов, врастающих между отломками кости. В остеогенной фиброретикулярной ткани появлялись множественные слабо обызвествленные костные трабекулы (рис. 6). В участках с плотным расположением коллагеновых волокон находили трабекулы, плотность которых была повышена по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Увеличение количества костных трабекул оценивали качественно на гистологических препаратах разных сроков исследования.

Источником остеогенеза могут служить остеогенные клетки надкостницы и клетки эндоста — тонкой соединительнотканной прослойки, которая покрывает внутреннюю поверхность канала диафиза.

Изучение морфологических изменений в зоне перелома позволяет предположить, что в формировании костного регенерата принимали участие и клетки, которые сопровождали растущие сосуды. В последствие такие камбиальные клетки дифференцировались в остеобласты, которые повсеместно встречались вблизи сосудов, врастающих в зону регенерации (рис. 7). Клетки характеризовались большими размерами, диффузным распределением хроматина, часто располагались в виде цепочек, идущих вдоль сосудов. Остеогенез осуществлялся за счет малодифференцированных камбиальных клеток, которые под влиянием окружения дифференцируются в остеобласты.

На этот срок процесс регенерации кости в зоне магниевого имплантата не отличался от физиологического.

Морфологическая картина через 4 мес. после операции

В срок 4 мес. после операции с применением имплантатов из модифицированного сплава МЛ-10 в области перелома наблюдали множественные вновь сформированные островки остеоида и костные трабекулы со средней площадью поперечного сечения $(11891,24 \pm 5365,81)$ мкм. Значительно уменьшались полости, заполненные фиброретикулярной тканью. В различных полях зрения отмечены разные стадии регенераторного процесса. Так,

формирование коллагеновых волокон (рис. 8), которые являются продуктами синтетической деятельности остеобластов, было характерно для ранних стадий репаративного остеогенеза, однако их образование отмечалось и позднее.

Поэтому наряду с наличием зрелых костных трабекул, окруженных активными остеобластами (рис. 9), повсеместно выявляли молодые коллагеновые волокна. По мере дифференцировки остеобласты превращались в остециты.

Пролиферативная активность клеток, участвующих в формировании костной ткани, которая является основным механизмом как физиологической, так и репаративной костной регенерации, наглядно определялась на иммуногистохимических препаратах, обработанных маркером к антигену Ki-67, ассоциированному с фазами клеточного цикла. В таких препаратах активные остеобласты на поверхности костных трабекул окрашивались в кирпичный цвет (рис. 10).

Использование магниевых имплантатов не нарушало в зонах перелома процессов ангиогенеза как основного фактора дифференцировки клеток-предшественников в остеобласты. Во всех наблюдениях выявляли распространенную сеть микрососудов, плотность которых увеличивалась в соответствии с интенсивностью и сроками репаративного процесса. Уже в ранние сроки после перелома формирование грануляционной ткани происходило с формированием полостей разных размеров, на внутренней поверхности которых появлялась эндотелиальная выстилка. При использовании имплантатов из нержавеющей стали для остеосинтеза было отмечено нарушение кровоснабжения в остеонах компактной кости, что приводило к гибели клеток-предшественников, исходящих из эндоста с последующей резорбцией таких участков и замещением их волокнами соединительной ткани. При применении магниевых имплантатов таких изменений не наблюдали.

Таким образом, адекватное кровоснабжение определяло постепенный и нарастающий процесс регенеративных изменений, которые мало отличались от нормального хода репаративного процесса. Эти изменения в сравнении наглядно видны на обзорных гистологических препаратах (рис. 11).

В поздних сроках наблюдений (6 мес.) участок кости в области имплантата из сплава магния по своему строению не отличался от костной ткани нормального строения. Образовавшаяся костная мозоль незначительно отличалась от костной ткани несколько беспорядочным расположением костных прекардин (рис. 12).

Выводы

Имплантаты из сплава магния (МЛ-10), модифицированного серебром, не угнетали процессы ангиогенеза в эксперименте в отличие от изготовленных из нержавеющей стали фиксаторов.

При остеосинтезе переломов имплантатами из сплавов магния в эксперименте не нарушалась пролиферативная активность клеток, участвующих в формировании костной ткани.

В результате экспериментального морфологического исследования установлено, что использование для остеосинтеза переломов сплава магния (МЛ-10), модифицированного серебром, не нарушало процессы репаративной регенерации костной ткани.

Список литературы

1. Алабут А. В. Экспериментально-клиническое обоснование применения конструкций из никелида титана в травматологии и ортопедии: дис. ... канд. мед. наук / А. В. Алабут. — Ростов-на-Дону, 2003. — 240 с.
2. Староха А. В. Функциональные результаты лечения больных абсцессом перегородки носа с использованием эластичных проницаемых имплантатов / А. В. Староха, А. В. Давыдов, А. С. Просекин // Бюллетень Сибирской медицины. — 2005. — Прил. 1. — 46 с.
3. Крайнов Е. А. Морфофункциональная характеристика костеобразования при использовании имплантатов с биокерамическими покрытиями: дис. ... канд. мед. наук / Е. А. Крайнов. — Волгоград, 2009. — 283 с.
4. Копысова В. А. Экспериментальное исследование остеосинтеза фиксаторами из пористого никелида титана / В. А. Копысова, В. А. Городилов, В. В. Кишкарёв // Актуальные вопросы имплантологии и остеосинтеза. — 2000. — С. 27–29.
5. Биорезорбируемые полимеры в ортопедии и травматологии / В. А. Радченко, Н. В. Делух, С. В. Малышкина, Л. М. Бенгус // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2006. — № 3. — С. 116–124.
6. Краснояров Г. А. Хирургическое лечение патологии опорно-двигательного аппарата у детей и подростков на основе использования биосовместимых и физиологически активных композиционных материалов: дис. ... доктора мед. наук / Г. А. Краснояров. — Москва, 2004. — 185 с.
7. Погорелов М. В. Мінеральний обмін травмованої кістки в нормі та при порушенні водно-сольового балансу / М. В. Погорелов // Морфологія. — 2009. — Т. III, № 3. — С. 90–94.
8. Биорезорбтивные свойства сплавов магния / А. И. Чемирис, Э. И. Цивирко, В. Н. Черный и др. // Травма. — 2011. — № 3. — С. 144–147.
9. Bioabsorbable fixation devices in trauma and bone surgery: current clinical standing. / E. Waris, Y. T. Kontinen, N. Ashammakhi et al. // Expert Review of Medical Devices. — 2004. — Vol. 1, № 2. — P. 229–240.
10. Daniels A. U. Mechanical properties of biodegradable polymers and composites proposed for internal fixation of bone / A. U. Daniels, M. K. Chang, P. A. Kirk // J. Appl. Biomater. — 2004. — Vol. 1, № 1. — P. 57–78.
11. Magnesium alloys as implant materials-principles of property design for Mg-RE alloys / N. Hort, Y. Huang, D. Fechner et al. // Acta Biomater. — 2010. — Vol. 6 (5). — P. 1714–1725.
12. 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. Material Res. — 2009. — Vol. 90 (3). — P. 882–893.
13. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review / M. P. Staiger, A. M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias // Biomaterials. — 2006. — Vol. 27 (9). — P. 1728–1734.