

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПОГРУЖНЫХ МЕТАЛЛОКОНСТРУКЦИЙ С БИОАКТИВНЫМ ПОКРЫТИЕМ ИЗ ПРИРОДНОГО НАНОСТРУКТУРНОГО КАЛЬЦИЙ ФОСФАТНОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ ЧРЕСКОСТНОГО ОСТЕОСИНТЕЗА

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF EFFECTIVENESS OF APPLYING SUBMERSIBLE RODS WITH HYDROXYAPATITE COATING FOR TRANSOSSEOUS OSTEOSYNTHESIS OF PELVIC BONES

*V. Arkhipenko
K. Sergeev
A. Grin
A. Markov
M. Rabchenyuk
V. Ignatov
S. Tverdohlebov*

Annotation

The goal was to determine the effectiveness of using submersible elements coated with calcium phosphate complex at transosseous osteosynthesis model unstable pelvis damage in experimental animals. Surgical treatment subjected to 12 mongrel dogs who underwent model vertically unstable pelvic lesions followed by osteosynthesis with external fixation. Animals are divided into two groups. In the first group as the internal elements used needles with a dusting of natural nanostructured calcium phosphate complex made based gadroksiapatita, the second is usually used needles. For the comparative assessment of the application of the various spokes applied clinical and morphological, radiological, histological and molecular genetic methods. During the experiment determined that using the spokes coated natural nanostructured calcium phosphate complex made based gadroksiapatita not revealed inflammatory response in soft tissue, there were no episodes of device instability. Histological examination revealed that the processes of reparative regeneration and the formation of mature bone tissue occur earlier in the case of needles coated.

Keywords: unstable injury of pelvic bones, hydroxyapatite coating, experiment.

Архипенко Виталий Игоревич

*Врач травматолог–ортопед,
ГБУЗ ТОКБ №2*

Сергеев Константин Сергеевич

*Д.м.н., профессор, зав. каф., Тюменский
государственный мед. университет*

Гринь Алексей Алексеевич

*К.м.н., доцент, Тюменский
государственный мед. университет*

Марков Александр Анатольевич

*К.м.н., доцент, Тюменский
государственный мед. университет*

Рабченко Максим Анатольевич

*К.м.н., врач, травматолог–ортопед,
ГБУЗ ТОКБ №2*

Игнатов Виктор Павлович

*К.ф–м.н., зав. лаб. Института Физики
Высоких Технологий, ФГАОУ ВО*

Твердохлебов Сергей Иванович

*К.ф–м.н., доцент, ФГАОУ ВО "Нац. иссл.
Томский политехнический университет"*

Аннотация

Целью работы явилось изучения эффективности использования имплантатов из титанового сплава (ВТ6) с покрытием содержащим природный кальций–фосфатный комплекс (аналог гидроксиапатита), при чрескостном остеосинтезе модели нестабильного повреждения костей таза у экспериментальных животных. Хирургическому лечению подвергнуты 12 беспородных собак, которым выполнялась модель вертикально–нестабильного повреждения таза с последующим остеосинтезом аппаратом наружной фиксации. Животные разделены на две группы. В первой группе в качестве внутренних элементов использовались спицы с напылением из природного наноструктурного кальций–фосфатного комплекса (ПНКФК), во второй применялись обычные спицы. Для сравнительной оценки применения различных спиц применены клинко–морфологический, рентгенологический, гистологический и молекулярно–генетический методы исследования. В процессе эксперимента определено, что при использовании спиц с покрытием из ПНКФК не выявлено воспалительной реакции в мягких тканях, не наблюдалось эпизодов нестабильности аппарата. При гистологическом исследовании выявлено, то что процессы репаративной регенерации и образование зрелой костной ткани происходят раньше в случаях использования спиц с покрытием.

Ключевые слова:

Природное наноструктурное кальций–фосфатное покрытие, биоактивное покрытие, эксперимент.

Введение

Нестабильные повреждения таза относятся к одним из самых тяжелых повреждений опорно-двигательного аппарата [3, 13]. Общепризнанным методом патогенетической терапии при травме таза является остеосинтез аппаратом наружной фиксации (АНФ) [1,2,4,14]. Данный метод лечения малоинвазивен, позволяет выполнить репозицию смещения и надежную фиксацию, а так же создает оптимальные условия для сращения переломов [5]. Недостатком данного метода является связь внешней части погружных элементов аппарата (спицы, стержни) с внешней средой. В результате этого могут возникать осложнения в виде воспаления мягких тканей (в 5,7 – 30% случаев) вокруг этих элементов [1,2,3,14] и развитии их нестабильности [4, 6]. Воспалительная реакция зачастую развивается в результате отсутствия плотного контакта мягких тканей с поверхностью погружного элемента, слабой его интеграции в кости. В настоящее время, для профилактики подобных осложнений поверхность погружных элементов покрывают различными биоактивными материалами [7, 8, 9,10,14]. Целью работы являлось выявить эффективность использования погружных элементов с покрытием из природного наноструктурного кальций-фосфатного покрытия при чрескостном остеосинтезе модели нестабильного повреждения костей таза у экспериментальных животных.

Материал и методы

Экспериментальное исследование проведено на 12 беспородных собаках обоего пола, в возрасте от одного года до четырех лет, без патологии в области костей и сочленений таза. Всем животным моделировали идентичное вертикально-нестабильное повреждение таза, для получения которого выполняли остеотомию в области крестцово-подвздошного сочленения на толщину внутренней кортикальной пластинки заднего отдела крыла подвздошной кости, и остеотомию в области лонного сочленения на толщину кортикальной пластинки вертикальной ветви лонной кости с этой же стороны, после чего добивались вертикального смещения половины таза.

После репозиции половины таза выполняли остеосинтез аппаратом наружной фиксации, путем проведения 3 взаимоперекрещивающихся спиц через крылья подвздошных костей и тело VII поясничного позвонка [10]. Концы спиц фиксировали на полукольце аппарата Илизарова необходимого диаметра. После остеосинтеза проводили рентгенографию в прямой и боковой проекциях.

Для остеосинтеза таза в первой группе экспериментальных животных применяли спицы с ПНКФК покрытием, разработанным в лаборатории нанопокровов при Национальном исследовательском Томском политехни-

ческом университете электрохимическим способом. Во второй группе использовали обычные спицы без покрытия. Диаметр спиц в обеих группах составил 2 мм.

Выведение животных из опыта выполняли через 14, 30 и 60 суток (по 2 животных основной и контрольной группы в каждый срок).

При проведении исследований использовали экспериментально-клинический, рентгенографический, гистологический и молекулярно-генетический методы.

В процессе наблюдения за экспериментальными животными отмечали наличие воспалительной реакции в области погружных элементов аппарата и определяли его стабильность. Рентгенограммы таза выполняли в передне-задней и боковой проекциях перед операцией, после остеосинтеза и перед выведением животного из эксперимента. Для гистологического исследования производили забор фрагментов костной и мышечной тканей из области контакта их с имплантатами. Срезы изготавливали из блоков декальцинированной кости и мышечной ткани на санном микротоме. Для светооптических исследований материал фиксировали в 10,0% водном растворе нейтрального формалина, проводили декальцинацию костных объектов в 4,0% растворе ЭДТА (трилон В) в течение 10 суток, дофиксировали в 10,0% нейтральном формалине, после обезвоживания в спиртах заливали в парафин. Серийные срезы 6 мкм приготавливали на микротоме МПС – 2, окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван – Гизону. Подсчет клеточных элементов выполняли в десяти полях зрения, в 28 препаратах на каждый срок эксперимента. Гистологические препараты исследовали с использованием фотомикроскопа фирмы "Opton" (Германия).

Молекулярно-генетическое изучение проводили в ООО "Центр молекулярно – генетической диагностики" (г.Тюмень). Экспрессию рецепторов сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGFR) определяли реактивами BioscienceVEFF-A(Австрия) в пг/мл сыворотки крови, взятой натощак. Экспрессию рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) выявляли по парафиновым срезам при помощи аллель – специфической ПЦР. Количественные параметры обрабатывались на ПК Pentium – IV 2,1 ГГц ОЗУ 2 ГБ в ОС Windows 7 с использованием пакета прикладных программ "PrimerofBiotatistics. Version 4.03 byStationA. Glants" и представлены в виде: $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического. Сравнение между группами в зависимости от распределения проводили критерием Стьюдента для независимых групп и непараметрическим критерием Манна-Уитни. Статистически значимыми считались отличия при $p \leq 0,05$. Количественные данные проверяли на нормальность распределения критерием Колмагорова-Смирнова.

При выполнении исследования были соблюдены требования приказа МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г. "О мерах по дальнейшему улучшению организационных форм работы с использованием экспериментальных животных", приложение к приказу № 775 от 12.08.1977 г. И Федерального закона от 01.12.1999 г. "О защите животных от жестокого обращения", а так же Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей [4].

Результаты

Макроскопически после 14 суток эксперимента у животных, которым выполняли чрескостный остеосинтез таза с использованием спиц без покрытия, в области устьев спиц наблюдали локальное расплавление мягких тканей с серозно-гнойным отделяемым, а также отмечали нестабильность аппарата в виде его подвижности относительно таза животного.

У животных, чрескостный остеосинтез которым выполнялся спицами с покрытием, кожа вокруг спиц во все сроки наблюдения не имела признаков воспаления, аппарат в костях таза был фиксирован стабильно, признаков расшатывания спиц не отмечалось.

Необходимо отметить, что при удалении спиц с покрытием приходилось применять большее физическое усилие, чем при удалении спиц у животных контрольной группы, у которых спицы удалялись свободно. При этом часть покрытия, в местах контакта с костями, отсутствовала.

Рентгенологически у животных из контрольной группы через 14 суток не определяется значимых изменений в области расположения спиц АНФ. У собак из основной группы в этот же период в области расположения спиц отмечали гиперостификацию подвздошной кости по наружному и внутреннему кортикальному слоям.

На рентгенограммах животных оперированных с использованием спиц без покрытия, выведенных на 30 и 60 сутки в боковой проекции четко определялись зоны склероза в области прохождения спиц, что косвенно подтверждает наличие воспаления и нестабильности аппарата. У животных, оперированных с использованием спиц с покрытием, зон склероза не отмечалось, кость в местах прохождения спиц была обычной структуры. Нарушение архитектоники костной ткани в данной группе не выявлялось.

При гистологическом исследовании процессы регенерации повреждений костей в основной и контрольной группах животных принципиально не отличалась, протекали стадийно, по закономерностям репаративного процесса в костной ткани.

В начальном периоде эксперимента у животных контрольной группы происходит формирование остеобластического пула и микроциркуляторной сети сосудов, вдоль которых образуются костные балки, характерные для ретикулофиброзной костной ткани. Трабекулы тканевых структур включают в состав клеточные элементы: остеобласты – $7,85 \pm 0,37\%$, остеоциты – $5,03 \pm 0,68\%$, остеокласты – $3,73 \pm 0,43\%$.

В основной группе выявлен идентичный клеточный состав, заметно отличающийся количественными характеристиками: остеобласты – $12,63 \pm 0,44\%$, остеоциты – $7,13 \pm 0,38\%$, остеокласты $4,88 \pm 0,63\%$.

Кроме того, отмечается выраженная микроциркуляторная сеть с пролиферирующим эндотелием сосудов. В отдельных участках выявляются мелкие очаги органического костного матрикса, пролиферация клеток-предшественников и остеобластов. Размеры пролиферирующих элементов с базофильным ядром по длиннику составляют $42,77 \pm 8,13 \text{ Pиx}$, в поперечнике – $21,77 \pm 8,13 \text{ Pиx}$. (табл.)

Таблица.

Долевой состав и размеры основных клеточных элементов при регенерации костей таза у экспериментальных животных основной и контрольной групп.

Группа	Клеточное содержание регенерата			Размеры остебластических элементов (Pиx)	
	Остеобласты n=250	Остеоциты n=250	Остеокласты n=250	По длиннику	По поперечнику
Контрольная	$12,63 \pm 0,44$	$5,03 \pm 0,68$	$3,77 \pm 0,43$	$36,01 \pm 4,18$	$18,29 \pm 1,92$
Основная	$7,85 \pm 0,37$	$7,13 \pm 0,38$	$4,88 \pm 0,63$	$42,77 \pm 8,13$	$21,77 \pm 8,13$
Вероятность ошибки	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,145$	$p > 0,464$	$p = 0,675$

n - число измерений

В более поздних сроках опытов у животных основной группы происходили выраженные процессы остеогенеза, т.е. опережение по количественному составу остеобластов и остеоцитов и относительного снижения активности элементов остеокластического дифферона. Кроме того, элементы остеобластического дифферона отличались большими размерами по длиннику и поперечнику соответственно на 18,8% и 16,2% по сравнению с таковыми в контрольной группе.

Другой отличительной особенностью является то, что у животных в контрольной группе выявлялись участки гиалиновой хрящевой ткани со слабо выраженными очагами энхондрального окостенения (рис. 1), в то время, как в основной группе наблюдалась активная пролиферация клеток остеобластического дифферона и остеокластов (рис. 2), при этом в регенераторном процессе формирования хряща не наблюдалось.

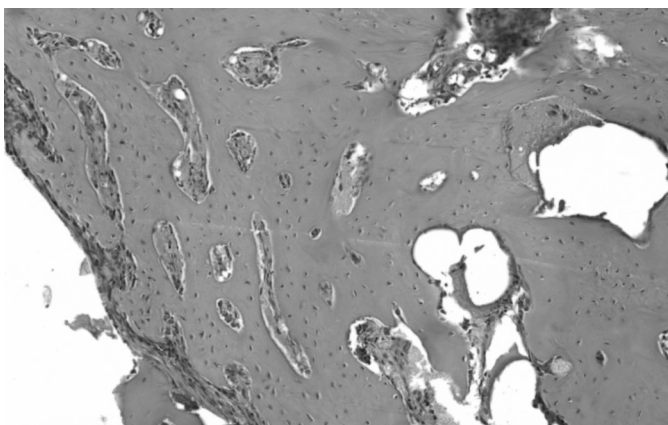


Рисунок 1.

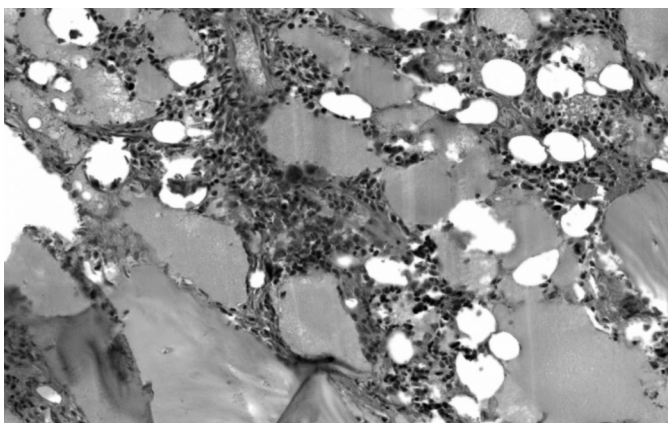


Рисунок 2.

Формирование новообразованных сосудов осуществлялось вследствие активной пролиферации эндотелиоцитов резистивных сосудов и *de novo* – из адвентициальных элементов.

В контрольной группе ангиогенез наблюдается по аналогичному тренду, но процесс протекает более медленными темпами, отмечены единичные тромбы, чего не обнаружено в основной группе.

При изучении мезенхимального компонента (мышцы, сосуды) в основной группе отмечается активное формирование сосудов достаточно больших размеров по толщине волокна, с гипертрофированными ядрами, полнокровие резистивных сосудистых резервуаров, оптимальные межмышечные прослойки жировой ткани. В группе сравнения по окончании эксперимента определяются скопления адипоцитов в виде очагов липоматоза интерстициальной ткани, при этом наблюдалось скопление клеток воспалительного инфильтрата и интерстициальный отек.

При проведении молекулярно-генетического исследования у животных основной группы выявлена экспрессия генов VEGFR и EGFR. Показатели экспрессии рецепторов сосудисто-эндотелиального и эпидермального фактора 2,2–2,8 раза выше по сравнению с контрольной группой (102,3±36,4 пг/мл, 40,71±14,71 пг/мл, соответственно).

Обсуждение

Аппараты наружной фиксации являются неотъемлемой частью современной травматологии и ортопедии. Но, при их применении возникают типичные осложнения: воспаление мягких тканей вокруг них и их расшатывание в кости. [1,2,3,14].

Перспективным направлением в решении этих проблем является использование погружных элементов аппаратов с биологически активным покрытием с ПНКФК [8,9,12,15]. Полученные нами данные гистологического исследования подтверждают стимулирующий эффект регенерации костной ткани, описанный в работах Жлусова И.А. с соавт. и Шевцова В.И. с соавт. [8,9]. Так активные процессы регенерации костной ткани нами выявлены уже на 14 день после начала эксперимента, а на 30-е и 60-е сутки отмечена сформированная губчатая костная ткань, при этом необходимо отметить на полное отсутствие хрящевой ткани в месте консолидации.

При изучении процессов регенерации костей таза у экспериментальных животных в контрольной группе на 14-е сутки отмечали полное отсутствие сращения переломов. С 28-х по 42 сутки после фиксации в аппарате в данной группе отмечается волокнисто-соединительнотканно-костно-хрящевое сращение перелома [5].

Выявленная нами гипероссификация в области спиц с покрытием мы расцениваем как проявление эктопичес-

кого костеобразования обнаруженного при исследованиях Yuan H. с соавт.[11], где они имплантировали в мышцы собак содержащие гидроксиапатит материалы.

По всей видимости выраженность этого эффекта обусловлена большим мышечным массивом области проведения спиц (ягодичные мышцы, разгибатель спины), соответственно мощным кровоснабжением и как следствие более активным действием морфогенных белков. В пользу этого предположения свидетельствует повышенная экспрессия сосудисто-эндотелиального и эпидермального факторов. Гиперэкспрессия генов VEGFR и EGFR, по всей видимости, индуцирует пролиферативный эффект всех элементов остеогенеза. Таким образом, вследствие ускоренного ангиогенеза провизорной структуры репарации и обеспечения оптимальной трофики определяется остеоиндуктивный эффект ПНКФК.

Заключение

Экспериментально установлено отсутствие характерных для лечения при помощи аппарата наружной фиксации осложнений (воспаление мягких тканей, нестабильность аппарата) при их использовании с погружными элементами покрытыми ПНКФК. Рентгенологически обнаружен выраженный остеогенез подвздошных костей в области контакта спиц с покрытием с сохранением нормальной балочной костной структуры, в то время, как при использовании обычных спиц подобной реакции кости не наблюдалось, напротив, отмечено ее склерозирование в месте контакта со спицами. Гистологическое исследование показало выраженный остеоиндуктивный эффект ПНКФК покрытия, который, вероятно, обеспечивается экспрессией генов VEGFR и EGFR. Дальнейшее исследование в этом направлении позволит выявить новые данные о роли ПНКФК в регенераторном остеогенезе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко А.В., Смазнев К.В. Чрескостный остеосинтез в реабилитации пациентов с повреждениями таза и вертлужной впадины при политравме. Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2006; (4):18–23.
2. Гудзь Ю.В., Хомутов В.П. Остеосинтез переломов тазовых костей. Травматология и ортопедия России. 2006; 40(2):90.
3. Грицук А.Н., Пусева М.Э., Тишков Н.В., Ткаченко А.В., Васильев В.Ю., Бушманов А.В. Лечение нестабильных повреждений таза – история и перспективы. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2008; (4):11–18.
4. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2003; (4): 34–36.
5. Кирсанов К.П., Краснов В.В., Силантьева Т.А., Чиркова А.М. Репаративная регенерация костей и соединений таза в условиях управляемого чрескостного остеосинтеза. Гений Ортопедии. 2008; (4):32–38.
6. Лобанов Г.В. Морфо-биомеханический выбор вида связи "кость-аппарат" в лечении тяжелой травмы таза. В кн.: Кутепов С.М., ред. Диагностика, лечение и реабилитация больных с повреждениями костей таза. Екб.; 1996. с. 42–48.
7. Никурадзе В.К. Применение гидроксиапатит-содержащего материала в хирургии шейного отдела позвоночника [дис. ... док. мед. наук]. М.: Первый ГМУ. им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития; 2013.
8. Хлусов И.А., Карлов А.В., Суходоло И.В. Генез костной ткани на поверхности имплантатов для остеосинтеза. Гений Ортопедии. 2003; (3):16–26.
9. Шевцов В.И., Волокитина Е.А., Лулева С.Н., Гребнева О.Л., Ковинька М.А., Талашова И.А., Стогов М.В., Накоскин А.Н., Силантьева Т.А., Кононович Н.А., Петровская Н.В., Ткачук Е.А., Гасанова А.Г., Еманов А.А., Гайдышев А.И. О перспективах использования наноматериалов в лечении повреждений и заболеваний тканей опорно-двигательной системы. Гений Ортопедии. 2008; (4):26–31.
10. Шевцов В.И., Кирсанов К.П., Меньщикова И.А., Мельников Н.М. Топографо-анатомическое обоснование внешней аппаратной фиксации таза и крестца экспериментальных животных. Гений Ортопедии. 1999; (2):43–46.
11. Yuan H., Yang Z., Li Y. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. J. Mater. Sci. Mater. Med. 1998; (9):723–726.
12. Saithna A. The influence of hydroxyapatite coating of external fixator pins on pin loosening and pin track infection: A systematic review. Injury, Int. J. Care Injured 2010; (41):128–132.
13. Smith W.R., Ziran B.H., Morgan S.J. Fractures of the pelvis and acetabulum. New York: Informa Healthcare USA; 2007. 135 p.
14. Solomon L.B., Pohl A.P., Sukthankar A., Chehade J. The Subcrystal Pelvic External Fixator: Technique, Results, and Rationale. J. Orthop. Trauma. 2009; 23(5):365–369.
15. Пат. 100392 РФ, МПК А61В17/60 Погружной стержень для аппаратов внешней фиксации таза. Гринь А.А., Сергеев К.С., Рабченко М.А., Козлов Л.Б. Заявитель и потенциальный обладатель ГБОУ ВПО ТюмГМА. № 2010126106/14; заявл. 28.06.2010; опубл. 20.12.2010. Бюл. № 35.