

© Ю.М. Ирьянов, А.Н. Дьячков, С.В. Мухтяев, 1998

**Пространственная организация, стереоультраструктура и минеральный состав регенератов, формирующихся при первичной краниопластике**

Ю.М. Ирьянов, А.Н. Дьячков, С.В. Мухтяев

**Spatial organization, stereoultrastructure and mineral content of regenerates, formed during primary cranioplasty**

Y.M. Iriyanov, A.N. Diachkov, S.V. Mukhtiyev

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган (Генеральный директор — академик РАМТН, д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ В.И. Шевцов)

В экспериментах на взрослых собаках исследованы костные регенераты, формирующиеся в дефектах костей свода черепа при перемещении в них костных фрагментов на питающей ножке. Материал исследовали при помощи трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии, световой микроскопии полутонких срезов и рентгеновского электронно-зондового микроанализа. Показано, что костные регенераты, образующиеся в дефекте костей черепа, имеют много общего в своем строении с регенератами, формирующимися при заживлении переломов длинных трубчатых костей и при дистракционном остеосинтезе. Во всех случаях они образованы ретикулофиброзной костной тканью, клеточный источник которой один и тот же - популяция малодифференцированных периваскулярных клеток с остеогенными потенциалами, которые врастают в диастаз вместе с сосудистыми терминалями, образуя зону роста регенератов. Установлено, что пространственная организация костных регенератов определяется их ангиоархитектоникой.

Ключевые слова: чрескостный остеосинтез, краниопластика, репаративное костеобразование, стереоультраструктура, минерализация.

Bone regenerates, which are formed in defects of skull vault bones during transport of pedicle-provided bone fragments in them, are studied experimentally, in adult dogs. The material is studied by transmission and scanning electron microscopy, light microscopy of semithin sections and roentgen electron-probe microanalysis. It is demonstrated, that structure of the bone regenerates, formed in a defect of skull vault bones, has much in common with that of the regenerates, which are formed in the process of fracture healing in long tubular bones and of distraction osteosynthesis. In all the cases they are formed with reticulofibrous bone tissue, cellular source of which is the same - population of low-differentiated perivascular cells, having osteogenic potentials, which grow into diastasis together with vascular terminals and form growth plate of the regenerates. It is established, that spatial organization of the bone regenerates is determined by their angioarchitectonics.

Keywords: transosseous osteosynthesis, cranioplasty, reparative osteogenesis, stereoultrastructure, mineralization.

Проведенные ранее исследования [1] показали, что при замещении дефектов костей черепа методом дистракции костного фрагмента на питающей ножке в диастазе формируется костный регенерат, строение которого весьма близко к структуре дистракционных регенератов трубчатых костей. Вместе с тем, недостаточно изу-

чены особенности течения репаративного костеобразовательного процесса при тех специфических условиях регенерации, которые возникают при первичной краниопластике костным фрагментом, сохраняющим питающие связи с параоссальными мягкими тканями, что и определило цель настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 36 взрослых беспородных собаках. Исследовали костные регенераты, формирующиеся на различных этапах после операции краниопластики, методика выполнения которой подробно описана ранее [1]. При этом в костях свода черепа создавали

дефект прямоугольной формы, который замещали костным фрагментом на питающей (мышечной) ножке. Эвтаназию животных осуществляли через 7 и 21 сутки после операции. Для сравнения исследовали костные регенераты, формирующиеся в аналогичные сроки после

остеотомии большеберцовых костей и фиксации отломков аппаратом Илизарова, а также дистракционные регенераты и неповрежденные диафизы большеберцовых костей взрослых собак.

Костные регенераты вместе с прилежащими участками костей фиксировали в параформ-глутаральдегиде, обезвоживали и заключали в эпон. После полимеризации последнего готовили продольные распилы регенератов, полученные поверхности полировали и напыляли углеродом или медью в вакуумных напылителях «JEE-4X/5B» и «IB-6». Подготовленные таким образом образцы исследовали при помощи сканирующего электронного микроскопа «JSM-840» в отраженных и вторичных электронах, а затем проводили исследования химического

состава на рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе «LINK 860-500». Из различных зон регенератов вырезали блоки размером 2-3 мм и на ультрамикротоме «LKB Bromma Ultratome Nova» с помощью алмазных ножей «LKB JUMDI» готовили полутонкие и ультратонкие срезы. Полутонкие срезы толщиной 1-2 мкм окрашивали реактивом Шиффа и метиленовым синим. Ультратонкие срезы контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца и изучали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа «JEM-100B» при ускоряющем напряжении 80 кв. и инструментальных увеличениях 1000-50000. Фотографирование изображения осуществляли на микро-радиографические фотопластинки типа MP или МК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 7 суток после операции контуры краев трансплантата и дефекта остаются ровными (рис. 1), однако при большем увеличении на отдельных участках в компактном веществе обнаруживаются микроотслоения и микротрещины, особенно заметные в трансплантате. В диастазе вокруг трансплантата формируются не только мягкотканые компоненты регенерата, но и выявляются минерализованные структуры, особенно многочисленные в углах созданного дефекта и вдоль его длинных сторон (рис. 2, 3). В этих зонах они сливаются друг с другом и формируют компактные образования, которые на отдельных участках полностью перекрывают диастаз, соединяя края дефекта с трансплантатом. В минерализованных структурах выявляются центральные зоны, приближающиеся по степени кальцификации (18-20%) к показателям коркового слоя кости, и латеральные участки, концентрация кальция в которых лишь несколько превышает фон окружающих мягкотканых структур (рис. 4).

Регенерат на этом этапе эксперимента имеет зональный тип строения, в нем можно выделить несколько зон, а именно - пять (рис. 5). В непосредственной близости от краев дефекта и трансплантата друг против друга располагаются куполообразной формы зоны скопления спиралевидных трабекул ретикулофиброзной костной ткани, которые еще весьма слабо минерализованы и содержат менее 1% кальция в их центральных наиболее минерализованных участках. Протяженность зон костных трабекул на этом этапе эксперимента невелика и составляет вблизи поверхности трансплантата 0,5-0,6 мм, а у краев дефекта почти в два раза больше - 0,8-1,0 мм. Костные трабекулы образуются остеобластами, дифференцирующимися из периваскулярных клеток и формируются по ходу штопообразно

извитых капиллярных терминалей. Последние отрастают эндотелиальными тяжами от поврежденных сосудов, расположенных в костной ткани материнского ложа и трансплантата, и имеют форму петель. Вершины их ориентированы к центру диастаза и содержат растущие сосудистые почки, эндотелиоциты которых образуют длинные цитоплазматические отростки, направленные по ходу роста капиллярных терминалей (рис. 6). На люминальной поверхности последних располагаются эндотелиальные поры, а в области интерцеллюлярных контактов - межэндотелиальные люки, что свидетельствует о значительной степени проницаемости кровеносных капилляров в этих участках. Об этом свидетельствует и наличие многочисленных экстравазальных эритроцитов и их скоплений, контактирующих с макрофагами и дегранулирующимися тучными клетками в периваскулярных пространствах регенерата (рис. 7). Здесь же располагаются гигантские многоядерные клетки с ультраструктурными признаками функционально активных макрофагов, цитоплазма которых имеет пенистый вид из-за большого количества расположенных здесь вакуолеподобных структур (рис. 8). На люминальной поверхности эндотелия в просвете сосудов микроциркуляторного русла отмечается краевое стояние, адгезия и эмиграция форменных элементов крови. В интерцеллюлярных зонах наблюдается разобщение межэндотелиальных контактов и появление многочисленных вакуолеподобных структур. Базальная мембрана капиллярных терминалей разрыхлена и фрагментирована, что также обеспечивает высокую степень проницаемости сосудистой стенки.

В центральной части регенерата, но несколько ближе к трансплантату, выявляется облакоподобная область компактного расположения

минерализованных структур, некоторые из которых содержат кальция до 18-20%. Костные трабекулы здесь отсутствуют, а костный минерал в виде игловидных кристаллов располагается внутри аморфных масс неправильной формы, состоящих из мелкозернистого, Шик-положительного материала средней электронной плотности (рис. 9).

На 21 сутки после операции в диастазе вокруг трансплантата располагаются хорошо выраженные массивные костные регенераты, в которых протяженность зон костных трабекул увеличена в несколько раз по сравнению с предыдущим сроком эксперимента и достигает 2-3 мм. Хотя на отдельных участках они почти полностью перекрывают диастаз, между ними все еще наблюдается узкая, толщиной 0,3-0,5 мм, прослойка слабо минерализованных структур (рис. 10). Таким образом, и на этом этапе эксперимента сращение между краями трансплантата и дефекта носит характер костно-остеоидного.

Как и на предыдущем сроке эксперимента в прослойке удастся выявить пять зон в пространственном расположении слабоминерализованных структур (рис. 11). От вершин костных трабекул регенерата, формирующихся от краев дефекта и трансплантата, в прослойку врастают

их остеоидные участки, являющиеся их продолжением и ориентированные относительно прослойки под различными углами, но преимущественно в перпендикулярном направлении. В центральных участках прослойки располагается зона циркулярно ориентированных и более кальцифицированных структур, которые отделены от остеоидных участков трабекул зонами с наименьшей плотностью расположения минерализованных структур.

У краев дефекта и трансплантата трабекулы сливаются друг с другом наружными поверхностями и образуют более компактные структуры, которые по показателю индекса компактности, вычисляемому как отношение концентраций кальцифицированных и неминерализованных компонентов, приближаются к корковому слою кости.

Наименее кальцифицированные трабекулы располагаются на периферии костных отделов, в зонах роста регенератов, где они формируются по ходу врастающих в прослойку сосудистых петель и имеют бокаловидную форму, вследствие того, что их стороны, обращенные к прослойке, незамкнуты кальцифицированной тканью.



Рис. 1. Ровные контуры краев трансплантата и дефекта, созданного в костях черепа. В углах диастаза и вдоль его длинных сторон формируется регенерат, содержащий скопления минерализованных структур (стрелки). 7 суток после операции. Электронная сканограмма. Увеличение 6,5

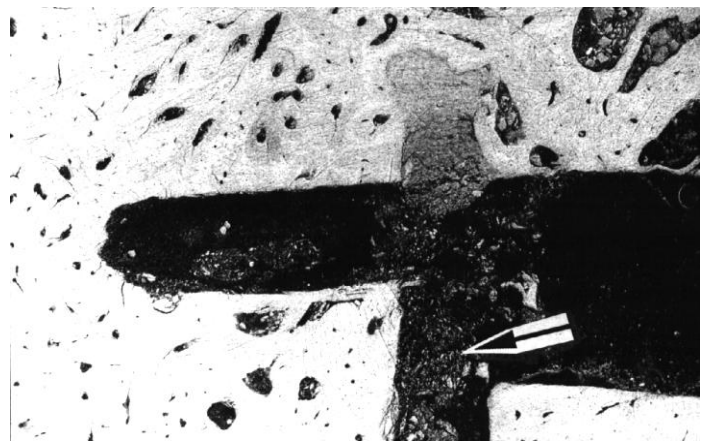


Рис. 2. Минерализованные структуры регенерата в углу дефекта (стрелка). 7 суток после операции. Электронная сканограмма. Увеличение 20



Рис. 3. Минерализованные структуры регенерата (стрелка) в диастазе вдоль длинной стороны дефекта. 7 суток после операции. Электронная сканограмма. Увеличение 32

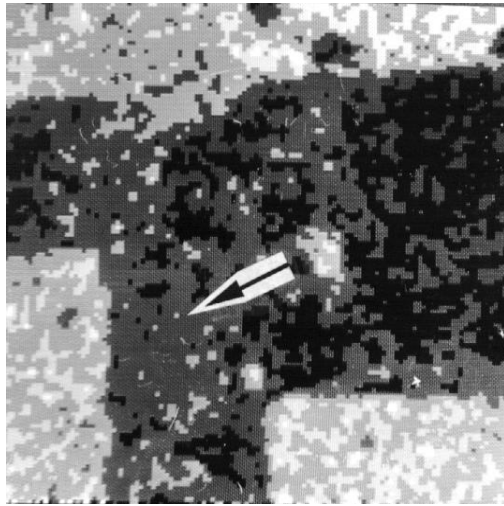


Рис. 4. Компактно расположенные минерализованные структуры регенерата (стрелка) на отдельных участках в углу дефекта полностью перекрывают диастаз. 7 суток после операции. Карта рентгеновского электронно-зондового микроанализа. Изображение в рентгеновских лучах кальция. Увеличение 27

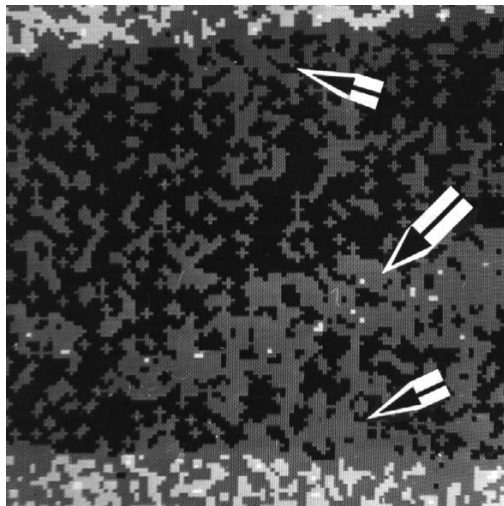


Рис. 5. Минерализованные структуры регенерата в диастазе вдоль передней стороны трансплантата. У краев дефекта и трансплантата располагаются две зоны спиралевидных трабекул (короткие стрелки). В центральной части регенерата, ближе к трансплантату находится область компактного расположения минерализованных структур (длинная стрелка). Между ними и трабекулами выявляются две промежуточные зоны, где осуществляется их контакт. 7 суток после операции. Карта рентгеновского электронно-зондового микроанализа. Изображение в рентгеновских лучах кальция. Увеличение 27

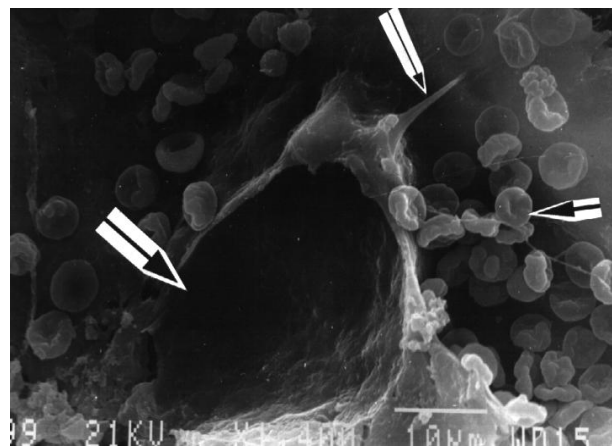


Рис. 6. Продольный скол сосудистой почки капиллярной терминали (толстая стрелка) в зоне новообразованных костных трабекул регенерата. Эндотелиоциты капилляра образуют длинные цитоплазматические выросты (тонкая стрелка), направленные по ходу роста терминалей. В периваскулярном пространстве располагаются многочисленные форменные элементы крови (короткая стрелка): эритроциты, лейкоциты и лимфоциты. 7 суток после операции. Электронная сканограмма. Увеличение 1600

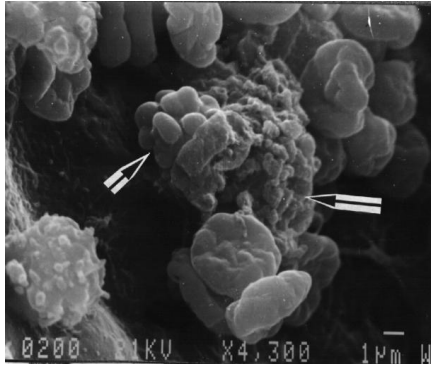


Рис. 7. Скопление эритроцитов, контактирующих с макрофагом (длинная стрелка) и тучной клеткой (короткая стрелка) в периваскулярном пространстве регенерата. 7 суток после операции. Электронная сканограмма. Увеличение 5000

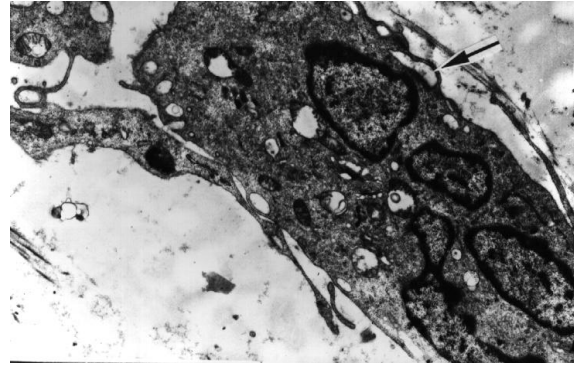


Рис. 8. Гигантская многоядерная клетка с ультраструктурными признаками функционально активного макрофага в периваскулярном пространстве регенерата. Клетка содержит многочисленные цитоплазматические выросты (стрелка), с помощью которых осуществляется захват материала из межклеточного пространства и перенос его в вакуолеподобных структурах в цитоплазму. 7 суток после операции. Электронограмма. Увеличение 10000

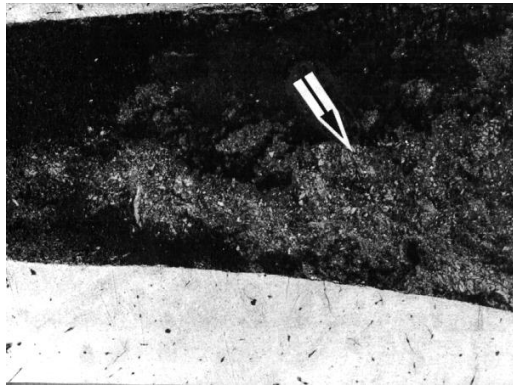


Рис. 9. Компактно расположенные минерализованные структуры (стрелка) регенерата в диастазе у передней поверхности трансплантата. 7 суток после операции. Электронная сканограмма. Увеличение 30

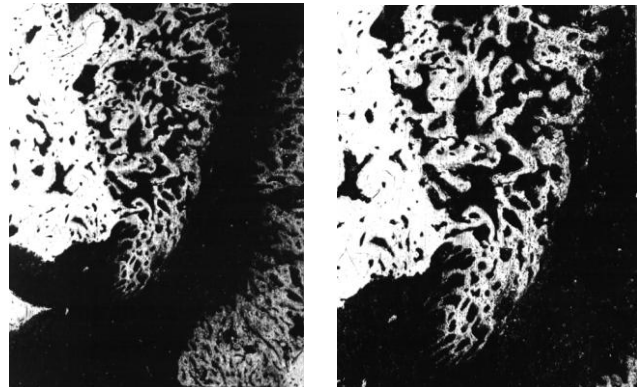


Рис. 10. Строение регенерата в диастазе между трансплантатом (слева) и краем дефекта (справа). От краев дефекта и трансплантата навстречу друг к другу отрастают новообразованные костные трабекулы, имеющие форму замкнутых округлых лакун, которые разделены слабоминерализованной прослойкой. 21 сутки после операции. Электронные сканограммы. Увеличение: а-20, б-30

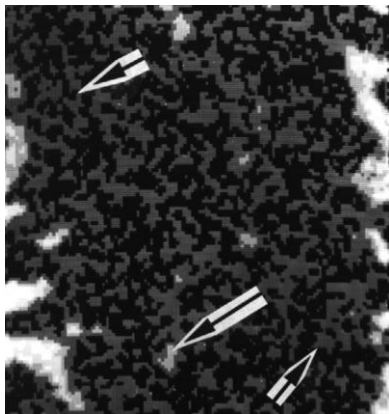


Рис. 11. Строение слабоминерализованной прослойки между костными отделами регенерата. От вершин кальцифицированных костных трабекул отрастают в прослойку весьма слабо минерализованные костно-остеоидные спиралевидные трабекулы (короткие стрелки). В центральной части прослойки трабекулы более кальцифицированы (длинная стрелка). 21 сутки после операции. Карта рентгеновского электронно-зондового микроанализа. Изображение в рентгеновских лучах кальция. Увеличение 60

У краев дефекта и трансплантата трабекулы сливаются друг с другом наружными поверхностями и образуют более компактные структуры, которые по показателю индекса компактности, вычисляемому как отношение концентраций кальцифицированных и неминерализованных компонентов, приближаются к корковому слою кости.

Наименее кальцифицированные трабекулы располагаются на периферии костных отделов, в зонах роста регенератов, где они формируются по ходу врастающих в прослойку сосудистых петель и имеют бокаловидную форму, вследствие того, что их стороны, обращенные к прослойке, незамкнуты кальцифицированной тканью.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Через 7 суток после операции морфофункциональное состояние регенератов, формирующихся в диастазе, можно охарактеризовать, как поздняя стадия травматического воспаления и начало формирования грануляционно-фиброзной ткани. Об этом, в частности, свидетельствуют ультраструктурные особенности сосудистых терминалей, отражающие их повышенную проницаемость. Наблюдаются также различные этапы диапедеза форменных элементов крови: краевое стояние, адгезия на люминальной поверхности эндотелия и эмиграция их через межэндотелиальные люки в периваскулярное пространство. Здесь наблюдаются значительные скопления эритроцитов и лейкоцитов, главным образом нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе продуктов деструкции клеток. В периваскулярных пространствах обнаруживаются и экстравазальные скопления гликопротеидов сыворотки крови, подвергающиеся кальцификации с формированием войлокоподобных структур из хаотично расположенных кристаллов гидроксиапатита. Следует отметить, что подобные полиморфные минерализованные образования к концу первой недели послеоперационного периода при повреждениях костей наблюдали на светооптическом уровне и другие авторы, идентифицируя их, как костные опилки. Рядом с этими минерализованными структурами, а также в непосредственной близости от эндотелия капилляров мы наблюдали через 7 суток после операции появление особого типа функционально активных макрофагов с характерной ультраструктурой, относящихся к категории гигантских многоядерных клеток инородных тел, появление которых, как известно, характерно для вяло текущего воспалительного процесса - гранулем и для процессов секвестрации инородных тел. Последними в данном случае являются минерализованные участки экстравазальных гликопротеидов - "костных опилок". Гигантские многоядерные клетки являются специализированными макрофагами, возникающими при слиянии мононуклеарных фагоцитов - моноцитов, и специализируются как для фагоцитоза и переваривания, так и для секреции и активны в отношении деструкции инертных веществ, таких как уголь, стекло и т.д. Они удаляют, по нашим данным, и некротический клеточный детрит и экссудат, микрокапли которого окутывают своими цитоплазматическими отростками, изолируют, поглощают и переваривают.

Костные отделы регенератов, отрастающие от краев дефекта и трансплантата в диастаз при краниопластике, имеют много общего в своем строении с регенератами, формирующимися при

заживлении переломов диафизов длинных трубчатых костей и при дистракционном остеосинтезе. Во всех случаях они образованы ретикуло-фиброзной костной тканью, которая в плоскостном изображении на срезе выглядит как анастомозирующие друг с другом трабекулы, представляющие собой в трехмерном пространстве стенки пересеченных на том или ином уровне округлых костных лакун или первичных остеонных лакунарной формы, или цилиндрических - в дистракционных регенератах. В центральной части лакун и первичных остеонных располагается 1 или 2-3 кровеносных сосуда с ультраструктурой прекапилляров, синусоидных капилляров или венул, вокруг которых в периваскулярных пространствах находятся циркулярно ориентированные клетки на различных этапах остеогенной дифференцировки. Таким образом, рост костных отделов регенератов, формирующихся как при краниопластике, так и при заживлении переломов длинных трубчатых костей осуществляется, главным образом, по типу интраканаликулярного, аппозиционного роста костной ткани внутри лакун, о чем свидетельствует значительное сужение просвета сосудистых каналов в лакунах, расположенных у краев дефекта и трансплантата, или у костных отломков, где они сформированы в наиболее ранние сроки.

В отличие от дистракционных регенератов, где сосудистые петли врастают навстречу друг другу, главным образом, в вертикальном направлении по вектору дистракции, образуя угол близкий к прямому относительно прослойки, в данном случае в регенератах, формирующихся при краниопластике, сосудистые петли врастают в прослойку по касательной под острыми углами, чем и объясняется относительно замедленный темп костеобразования и значительно меньшая протяженность зон роста регенератов.

Клеточный источник костной ткани регенератов, формирующихся в результате репаративного костеобразования при различных условиях: при замещении дефектов костей черепа, при заживлении переломов и при дистракционном остеосинтезе один и тот же - это популяция малодифференцированных периваскулярных клеток, окружающих в виде муфты сосудистые терминали, врастающие в диастаз и доставляющие их таким образом в зону остеогенеза (ростковую зону регенератов), где они дифференцируются последовательно в преостеобласты, остеобласты и остеоциты. Таким образом, пространственная организация костного регенерата (костной мозоли) всецело зависит и определяется его ангиоархитектоникой и, главным образом, в ростковой зоне [2, 3, 4].

В связи с вышеизложенным нельзя согласиться с утверждением о правомочности и даже более того необходимости введения таких терминов, как "дистракционный гистогенез" и "вставочный рост длинных трубчатых костей" при описании процессов остеогенеза в условиях дистракционного остеосинтеза. Применение

этих терминов, являющихся результатом ошибочных трактовок сущности репаративных костеобразовательных процессов, может отрицательно повлиять на формирование правильных представлений молодых исследователей на особенности костеобразования в условиях дистракции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Замещение дефекта костей свода черепа методом дозированной тракции костного фрагмента, сохраняющего связи с мягкими тканями / Г.А. Илизаров, А.М. Чиркова, С.Я. Зевенко, А.Н. Дьячков // Экспериментально-теоретические и клинические аспекты чрескостного остеосинтеза, разрабатываемого в КНИИЭКОТ: Тез. докл. Международ. конф. (Курган, 3-5 сентября 1986 года). - Курган, 1986. - С. 22-24.
2. Илизаров Г.А., Ирьянов Ю.М. Особенности остеогенеза в условиях напряжения растяжения // Бюл. эксперим. биол. - 1991. - Т. III, № 2. - С.194-196.
3. Шевцов В.И., Ирьянов Ю.М. Особенности формирования костного сращения в условиях дистракции // Анналы травматол. ортопед. - 1995. - № 2. - С.20-23.
4. Шевцов В.И., Ирьянов Ю.М. Остеогенез и ангиогенез при дистракционном остеосинтезе // Бюл. эксперим. биол. - 1995. - № 7. - С.95-99.

Рукопись поступила 14.04.98.

#### ПАМЯТИ Г.А. ИЛИЗАРОВА

*Казуистика, представленная Илизаровым в Белладжио, буквально ошеломила присутствующих и была встречена бурными аплодисментами. Итальянские ортопеды единодушно выразили мнение о чрезвычайно интересной терапевтической философии, которая дает новое направление в ортопедии.*

*Профессор Катанео из Лекко показал, что в маленькой периферийной больнице тоже можно проводить исследования. У него есть в распоряжении аппарат Илизарова, и он скоро начнет применять его.*

*“Первым предполагаемым этапом, — сказал профессор Бьянки Майоки, президент Итальянского отделения Ассоциации изучения остеосинтеза, — является овладение аппаратом, как инструментом. В будущем мы надеемся поддерживать контакты с Илизаровым и, кроме того, посылать в его институт наших врачей для обучения”*

**Cristina Kettlitz**

**Aumenta la statura di oltre 20 cm lo scienziato che allunga le ossa. - Corriere. - 18.06.81. (Италия)**