

# IMPORTANȚA VASCULARIZĂRII OSULUI ȘI APORTUL ANGIOGENEZEI ÎN FRACTURI

Marina Florea

(Conducător științific: Tatiana Globa, asistent universitar)  
Catedra de Histologie, Citologie și Embriologie

*“O minte care înțelege principiile va fi  
în stare să elaboreze propriile metode.”  
(N. Andry)*

## Summary

### *Importance of vascularization of the bone and significance of angiogenesis in the fracture*

Bone circulation plays an important role in bone physiology. Angiogenesis at the fracture site has been identified as one of the most significant parameters influencing the healing procedure. This is explained by the fact that osteoblasts and endothelial cells are intimately located within the skeleton, and their interaction is an integral component of bone repair. The features of local vascularity have also determined new approaches in the surgical treatment by shifting away from the mechanical toward the biological aspects of fracture fixation, thus preserving the blood supply to the bone fragments.

## Rezumat

Circulația sangvină a osului joacă un rol substanțial în fiziologia acestuia. Angiogeneza în focarul fracturii s-a dovedit a fi unul dintre cei mai importanți parametri ce influențează procesul de regenerare. Aceasta se explică prin faptul că osteoblastele și celulele endoteliale sunt intim localizate în cadrul scheletului, și interacțiunea lor asigură continuitatea proceselor reparative din os. Particularitățile vascularizării locale au determinat și noi abordări în tratamentul chirurgical, prin trecerea de la aspectul mecanic la cel biologic al fixării fracturilor, astfel păstrându-se sursa vasculară a fragmentelor osoase.

## Introducere

Neo-vascularizarea precede temporal neo-osteogeneza. Osteogeneza determină formarea de os nou simultan cu creșterea numărului de capilare. Grefele osoase vascularizate s-au dovedit a fi mult mai eficiente decât cele convenționale. Pierderea de țesut osos în osteoporoză este însoțită de reducerea densității capilarelor [1]. Iată unele date ce relevă existența unei veritabile interacțiuni între angiogeneza și osteogeneza. Această interacțiune devine evidentă mai ales în procesul de regenerare reparativă a țesutului osos. Angiogeneza, formarea noilor capilare din vasele sangvine preexistente, reprezintă un moment crucial în consolidarea fracturilor, chiar dacă mecanismul de reglare a angiogenezei în regenerarea osoasă nu este încă pe deplin înțeles [2].

### **Vascularizarea țesutului osos**

Cu toată varietatea formelor și proporțiilor os cortical-os trabecular-cavitate medulară, caracteristicile organizării rețelei vasculare osoase sunt aceleași:

- vase aferente = artere: nutritivă, epifizare, metafizare, periostale;
- rețea microvasculară = capilare: periostale, corticale, medulare sinusoide;
- vase eferente = vene: nutritivă, epifizare, metafizare, periostale.

Există numeroase anastomoze între aceste rețele, ceea ce cauzează dezacorduri în privința contribuției fiecărei surse la irigarea diferitor zone ale osului și la regenerarea fracturilor.

Vascularizarea diafizei osului lung la adult este asigurată de a. nutritivă și rețeaua periostală. A. nutritivă, însoțită de 1-2 venule și de filete nervoase, intră prin canalul nutritiv, sub un unghi drept, în cavitatea medulară și se împarte în 2 aa. medulare: ascendentă și descendentă. Ramificațiile arterelor medulare au o direcție centrifugală, asigurând vascularizarea a 2/3 interne ale corticalei. Rețeaua periostală provenită din arteriolele musculaturii ce se inseră pe osul

respectiv asigură irigarea a 1/3 externă a corticalei diafizare. Există numeroase anastomoze între circulația diafizară și cea epifizară [3,4].

Cunoașterea vascularizării locale oaselor explică unele particularități de consolidare și determină alegerea metodei de fixare a capetelor osoase și monitorizarea complicațiilor tardive ca pseudoartroza și necroza aseptică.

### **Etapele consolidării fracturii pe cale endocondrală**

Consolidarea fracturii reprezintă un proces orchestrat ce cuprinde mai multe etape în rezultatul cărora se reface aspectul biochimic și biomecanic al țesutului osos inițial. Cel mai des fracturile se consolidează prin mecanismul endocondral. Acesta prezintă următoarele faze [5]:

#### **I. Faza inflamatorie** (durata – cca 1 săptămână)

Distrugerea celulelor și matricei osoase, a vaselor sangvine și a țesuturilor moi adiacente determină formarea unei zone necrozate la extremitățile fracturate. Lezarea endoteliului vascular activează cascada complementului cu o ulterioară agregare și degranulare trombocitară. Se eliberează factori de creștere și de semnalizare chemotactică. În urma semnalizării are loc migrația leucocitelor polimorfonucleate, limfocitelor, monocitelor sangvine și macrofagelor tisulare spre focarul fracturii. Acestea sintetizează o serie de citokine, printre care menționăm PDGF (*Platelet derived growth factor*). PDGF este singurul factor cunoscut cu rol în stimularea sintezei de PTN (*Pleiotrophin*). Importanța angiogenică a PTN va fi elucidată în faza reparativă a osteogenezei [6]. Un studiu al expresiei genice a diferitor factori pentru angiogeneză și osteogeneză a stabilit că, chiar de la prima oră după impact, se mărește expresia BMP2, de 3 ori mai mult comparativ cu norma [7]. Pe lângă faptul că influențează celulele osteoprogenitoare, BMP mai activează endoteliocitele pentru angiogeneză, stimulând sinteza de VEGF și IGF [8].

Sângele extravazat coagulează. În rezultat se formează un hematom medular și subperiostal, cu rol de:

1. tampon hemostatic;
2. rețea fibrilară - platformă pentru migrare celulară;
3. sursă de molecule - semnal pentru inițierea evenimentelor celulare reparative.

Ulterior hematumul este înlocuit cu țesut de granulație, format din: fibroblaste, fibre de colagen și neocapilare. La sfârșitul fazei inflamatorii extremitățile fracturate sunt unite printr-un **calus fibrino-proteic**. În caz de administrare a inhibitorilor angiogenezei are loc formarea defectă a țesutului de granulație. Acest lucru demonstrează importanța angiogenezei începând de la etapele timpurii ale regenerării osoase [9]. Orice inhibiție a neovascularizării conduce la necroză avasculară a osului - respectiv la un eșec de consolidare a fracturii [10].

Se cunoaște că în normă în os concentrația  $O_2$  nu depășește 12,5%. În focarul fracturii, în faza inflamatorie și cea reparativă concentrația  $O_2$  e mai mică de 2% [11]. Acest mediu se menține până la 21 de zile după impact. Hipoxia de la nivelul fracturii reprezintă o determinantă majoră a tuturor fazelor de consolidare a fracturii. Ea reglează proliferarea și migrarea celulară, sinteza proteinelor matricei extracelulare. Mecanismul de acțiune constă în inducția secreției citokinelor și declanșarea altor căi de semnalizare intra-/extra- celulare. Hipoxia este și un important reglator a numărului de VEGFR (*VEGF Receptor*) exprimate de endoteliocite. [1]

Răspunsul molecular al celulelor localizate în mediu hipoxic constă în activarea transcripției HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), un heterodimer alcătuit din subunități alfa și beta, subunitățile alfa fiind  $O_2$ -sensibile. Reglarea strictă a sintezei de HIF-1 determină expresia coordonată a unei serii de gene, inclusiv a celor implicate în angiogeneză, glicoliză, metabolism oxidativ și proliferare celulară [12]. Hipoxia este direct angiogenică, stimulând osteoblastele pentru secreția VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) care are rol în proliferarea endoteliocitelor și formarea capilarelor de novo. La rândul lor, endoteliocitele aflate în condiții hipoxice secretă substanțe cu potențial osteogen: Et-1 (*Endothelin-1*) și IGF-1 (*Insulin-like Growing Factor-1*). Acestea determină proliferarea și diferențierea osteoblastelor, sporind potențialul angiogenic al acestora. Astfel hipoxia apare în calitate de mediator în înlănțuirea angio- și osteogenezei prin intermediul factorilor paracrini [1].

Mediul hipoxic stimulează activitatea macrofagelor. Acestea secretă citokinele cu efect

angiogen, dintre care am subliniat anterior PDGF care determină sinteza de PTN. Acesta, din urmă, este membru al unei familii de proteine heparin-linkate recent descoperite, ce manifestă potențial angiogen. Faptul că PTN lipsește în osul normal, dar este expresat în calusul fractural de către endoteliocite, fibroblaste și ulterior de osteoblaste, indică asupra funcției sale în tratamentul fracturilor. PTN stimulează formarea de țesut osos prin mărirea invaziei capilare a calusului. Dar, pe lângă potențial angiogen, s-a mai dovedit că PTN joacă un important rol și în recrutarea osteoblastelor și mărirea densității osoase [6].

Studiul efectelor hipoxiei asupra celulelor mezenchimale migrate în focarul fracturii a elucidat următoarele momente interesante. În mediu hipoxic are loc inhibiția factorilor de transcripție Cbfa-1/Runx2, a genei pt OC (*osteocalcin*) și pentru colagen tip I. Cbfa-1/Runx2 sunt responsabili de diferențierea osteoblastică, iar inhibiția lor presupune inhibiție în formarea țesutului osos. OC reprezintă un marker tardiv al diferențierii osteogenice. Lipsa acestuia confirmă blocarea osteogenezei. Nu se exprimă nici colagenul I care joacă un rol important în mineralizare. În schimb crește expresia OP. Aceasta asigură interacțiunea mai multor tipuri celulare, incluzând osteoblastele, endoteliocitele și osteoclastele. Dar cea mai remarcabilă proprietate a OP este capacitatea de a induce acumularea de macrofage în focarul fracturii, măbind astfel rata răspunsului inflamator [13].

## **II. Faza reparativă**

Faza reparativă include 3 procese majore: condrogenza, osteogeneza intramembranoasă și osteogeneza endocondrală [5].

Țesuturile necrozate sunt resorbite. Se atestază o creștere a vascularizației și a celularității în focarul fracturii. Celulele sunt pluripotente, provenite fie din țesuturile adiacente, fie migrate prin vase sangvine. În funcție de condițiile locale ele se diferențiază în fibro-/condro-/osteoblaste. În locurile unde predomină forțele de presiune diferențierea se face spre condroblaste, unde predomină tracțiunea – spre fibroblaste. În locurile cu o vascularizare bogată (în apropierea stratului cambial al periostului) diferențierea urmează calea osteoblastică, dimpotrivă, acolo unde persistă hipoxia, celulele se transformă în condrocite [4]. Ulterior diferențierii celulare, calusul fibrino-proteic este înlocuit cu calusul moale format din: cartilaj (central), țesut conjunctiv fibros și os reticulofibros (periferic) bogat în vase sangvine. Ultimele asigură secreția osteoidului și a fibrelor de colagen. Astfel, după 2-3 săptămâni de la fractură, capetele fracturate sunt fixate prin **calus moale, fibro-condroid** [13].

Mineralizarea calusului fibros parcurge aceleași evenimente ca osificarea cartilajului de creștere. Condrocitele hipertrofiate secretă proteoglicani neutri ce degradează glicozaminoglicanii (inhibitori ai mineralizării). Condrocitele și osteoblastele mai eliberează vezicule matriceale, extracelulare. Componenta acestora indică asupra implicării acestora în 3 fenomene: mineralizare (fosfați de Ca, factor de mineralizare BSP (*Bone sialoprotein*), fosfataze neutre și fosfataza alcalină), osteogeneza (factori de diferențiere osteoblastică BMP2) și angiogeneza (OPN (*Osteopontine*) cu rol de facilitare a angiogenezei și VEGF, cu efect angiogenic direct) [14, 15]. Invadarea cartilajului calcificat de către capilarele din regiunile adiacente mărește presiunea oxigenului și modifică pH-ul, de la acid la slab alcalin, ceea ce asigură activitatea fosfatazei alcaline și a altor enzime care degradează matricea bogată în proteoglicani și hidrolizează esterii fosfați. Astfel se obțin ioni de fosfați ce interacționează cu  $Ca^{2+}$  formând sărurile necesare pentru mineralizare. Astfel procesul de mineralizare vine mână în mână cu procesul de invazie capilară. La finalul acestei faze extremitățile fracturii sunt fixate rigid printr-un **calus osos** de structură reticulofibroasă, respectiv crește stabilitatea la nivel de fractură [16].

## **III. Faza remodelării**

Osul reticulofibros obține histostructura osului lamelar. Are loc resorbția excesului de calus și refacerea canalului medular. În dependență de factorii mecanici osul își modifică arhitectonica, redobândind proprietățile biomecanice și funcționale.

**Factori ce stimulează osteogeneza prin acțiunea asupra angiogenezei**

**VEGF**

Revascularizarea fracturii este importantă pentru resorbția țesutului necrotic și pentru migrarea celulelor progenitoare de osteoblaste. În fazele tardive angiogeneza asigură vascularizarea cartilajului cu mineralizarea ulterioară a acestuia. Astfel administrarea de VEGF condiționează mărirea ariei vasculare care, la rândul său, determină creșterea vitezei de formare a calusului și accelerarea procesului regenerativ [13]. Astfel, VEGF îndeplinește un rol crucial nu numai în vascularizarea focarului fracturii, dar și în sporirea ratei de dezvoltare a osteoblastelor. Totuși, stimularea individuală cu VEGF nu e suficientă pentru a asigura formarea rețelelor vasculare funcționale. Încercările de a accelera vascularizarea prin supraexpresia VEGF (utilizând metode genetice) a determinat formarea unor vase imature, nerezistente la factori mecanici [11]. Singur VEGF nu poate promova regenerarea osoasă. El acționează sinergistic cu BMP4, amplificând migrarea celulelor mezenchimale, mărirea ratei de supraviețuire a acestora și accentuarea formării cartilajului în timpul osteogenezei endocondrale. Efectul VEGF este strict dependent de raportul său cu BMP4. În caz de exces de VEGF acesta poate promova diferențierea celulelor mezenchimale în endoteliocite (ceea ce diminuează numărul celulelor disponibile pentru a urma calea osteoblastică) și poate determina acumularea osteoclastică, ceea ce ar conduce la resorbție excesivă de țesut osos. Astfel efectul osteogenic al VEGF nu este suficient în tratarea fracturilor fără cumulara efectelor BMP.

#### Sadat-Habdan mesenchymal stimulating peptide (SHMSP)

SHMSP este un peptid format din 13 aminoacizi, sintetizat în laborator, care stimulează creșterea osoasă și consolidarea fracturilor. În urma unui studiu [10] s-a constatat, că efectul propriu-zis al SHMSP este exercitat nu asupra osteoblastelor, ci asupra endoteliocitelor care sporesc triplu rata neovascularizării calusului. În consecință crește rata mineralizării și regenerării țesutului osos.

#### Tensiunea mecanică

Tensiunea mecanică joacă un rol major în formarea țesutului osos [17]. Ea acționează prin stimularea activității osteoblastice, dar mai ales prin inducerea producției de factori angiogenici ca VEGF. VEGF este expresat în urma stimulării cu variați factori, ca: compresia, tensiunea, fluxul citoplasmatic determinat de curenți piezoelectrice. Odată cu VEGF este stimulată și activitatea HIF-1. Influența factorului mecanic a fost dedusă și din faptul că, chiar în condiții de normoxie, celulele pot exprima HIF-1 și VEGF ca răspuns la stimulii mecanici.

#### Power Doppler Sonography

Începând cu anii '60 au debutat studiile privitor la mecanismele fizice și biologice ce asigură efectivitatea terapeutică a US de intensitate scăzută. Studiile pe fibroblaste izolate *in vitro* au demonstrat că US acționează prin mecanismul cavitației care induce anumite oscilații ale citoplasmei. În consecință este afectată permeabilitatea membranei celulare față de ionii de  $Ca^{2+}$  și  $Na^{+}$ . Aportul intracelular mărit de  $Ca^{2+}$  determină mărirea sintezei de ADN și proteine. Tot prin acest mecanism se explică și activarea macrofagelor. Sporirea activității fibroblastelor și macrofagelor este caracteristică pentru procesul normal de consolidare a fracturilor. Studii asupra efectelor US în focarul fracturii au depistat mărirea debitului sangvin local și mărirea ratei de sinteză a proteinelor matricei extracelulare. În consecință crește viteza de tratare a defectului osos [18].

#### **Abordarea chirurgicală a fracturilor în relație cu vascularizarea osoasa**

Din punct de vedere istoric, cel mai important moment în tratamentul fracturilor diafizare este trecerea de la abordarea mecanică a principiilor de fixare internă la abordarea biologică. Actual fixarea fracturilor diafizare pune accent pe biologia osului și pe păstrarea aportului sangvin spre fragmentele fracturale. Se cunoaște că reducerea directă a capetelor osoase, care se utilizează de obicei ca procedură de fixare prin compresie interfragmentară cu placa convențională, reprezintă cauza majoră a devitalizării osului. O îmbunătățire a situației s-a constatat la utilizarea tehnicilor bridge plating. Ideea fundamentală este de a acționa minim asupra extremităților osoase și de a fixa placa pe părțile proximală și distală ale osului fracturat. Fixarea plăcii de capetele intacte ale osului menține lungimea, unghiul de rotație și aliniaritatea fragmentelor. Acest tip de fixare nu este absolut rigid, astfel încât consolidarea fracturii urmărește mecanismul

endocondral [19].

În timpul studiului efectelor biologice ale plăcilor convenționale de compresie asupra cortexului subiacent, Perren a făcut o importantă descoperire - plăcile interacționează semnificativ cu aprovizionarea vasculară a cortexului. Formarea porozitatilor osoase este direct relaționată cu gradul de necroză a țesutului osos localizat sub placă. Aceasta observație a determinat crearea plăcilor cu contact limitat, de ex. LC-DCP (*limited-contact dynamic compression plate*), iar ulterior a plăcilor NCP (*noncontact plates*).

### Concluzii

Consolidarea fracturilor reprezintă un proces fiziologic complex și delicat. Anterior s-a vorbit despre existența a 3 parametri fundamentali care determină consolidarea fracturii. Acestea sunt osteogeneza, osteoinducția și osteoconducția. Pentru a împlini imaginea reală a procesului regenerativ e important de a adăuga la cele 3 și angiogeneza. Astfel cunoașterea atât a particularităților de vascularizare locală la nivelul diferitor segmente ale scheletului, cât și a mecanismului general de acțiune a angiogenezei în focarul fractural, reprezintă un imperativ în instruirea specialiștilor în ortopedie și traumatologie.

### Bibliografie

1. **J.T. Street, B. Lenehan, K. deSchrijver, J.H. Wang, Q.D. Wu, H.P. Redmond** Hypoxia regulates the paracrine coupling of angiogenesis and bone formation. *Eur J Orthop Surg Traumatol* (2005) 15:214-225
2. **C. Lu, R. Marcucio, T. Miclau** Assessing angiogenesis during fracture healing. *Iowa Orthop J* (2006) 26:17-26
3. **Ian McCarthy** The physiology of bone blood flow: A review. *J Bone Joint Surg Am* (2006) 88:4-9
4. **D. Antonescu, St. Cristea** *Elemente de ortopedie si traumatologie*. Bucuresti, 2001
5. **J.R. Lieberman, G.E. Friedlaender** *Bone regeneration and repair*. 2005; Cap.2 Fracture repair
6. **W. Petersen, B. Wildemann, T. Pufe, M. Rashke, G. Schmidmaier** The angiogenic peptide pleiotrophin (PTN/HB-GAM) is expressed in fracture healing: an immunohistochemical study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* (2004) 124:603-607
7. **G.R. Wohl et al.** Stress fracture healing: Fatigue loading of the rat ulna induces upregulation in expression of osteogenic and angiogenic genes that mimic the intramembranous portion of fracture repair. *Bone* (2009) 44:320-330
8. **R. Dimitriou, E. Tsiridis, P.V. Giannoudis** Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury, Int. J. Care Injured* (2005) 36:1392-1404
9. **M.R. Hausman, M.B. Schaffler, R.J. Majeska** Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* (2001) 29:560-564
10. **M. Sadat-Ali et al.** Angiogenesis: A new factor on the block – a preliminary observation. *Int J Angiology* (2005) 14:87-91
11. **E. Potter et al.** Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* (2007) 40:1078-1087
12. **A.M. Zahm, M.A. Bucaro, V. Srinivas, I.M. Shapiro, C.S. Adams** Oxygen tension regulates preosteocyte maturation and mineralization. *Bone* (2008) 43:23-31
13. **L.E. Harry, E.M. Paleolog** From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological and pathological angiogenesis. *Birth defects research* (2003) 69:363-374
14. **N.N. Nahar, L.R. Missana, R. Garimella** Matrix vesicles are carriers for BMPs, VEGF, and noncollagenous matrix proteins. *J Bone Miner Metabol* (2008) 26:514-519
15. **N.C. Keramaris et al.** Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF

16. **E.F. Morgan et al.** Micro-computed tomography assessment of fracture healing: Relationships among callus structure, composition and mechanical function. *Bone* (2009) 44(2):335-334
17. **C. Faure et al.** Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor – A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerization. *Bone* (2008) 42:1092-1101
18. **N.M. Rawool et al.** Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound. *J Ultrasound Med* (2003) 22:145-153
19. **B.D. Browner, J.B. Jupiter, A.M. Levine, P.G. Trafton, C. Krettek** *Skeletal trauma*. 2008.

## **TRANSPLANTUL DE MEMBRU SUPERIOR**

**Alexandru Cebanu**

(Conducător științific: Tatiana Globa, asistent universitar)

Catedra de Histologie, Citologie și Embriologie

### **Summary**

#### *Transplant of the upper limb*

Making an analysis of specialized literature on the limb's transplantation, it can be ascertained that the satisfactory results in this area have been obtained in 20<sup>th</sup> century, following the discovery of suturing vessels techniques and techniques of immunosuppression. Microsurgical techniques offered the possibility to enlarge the functional capacity of transplanted limb. Increasing the survivability and preventing severe graft rejection can be ensured by the administration of corticosteroid hormones, polyclonal antibodies, calcineurin inhibitors, antiproliferatives coupled with vascularized bone marrow transplantation, which increases the chimerism. Analysis of data from literature concludes that the main directions of development in limb transplantation technique are: tissue printing, elaboration and development of new products, methods and techniques of immunosuppression.

### **Rezumat**

Făcând o analiză a literaturii de specialitate asupra transplantului de membru, se poate concluziona că rezultatele satisfăcătoare în acest domeniu au fost obținute în secolul XX, în urma descoperirii tehnicii suturării vaselor și tehnicii de imunosupresie. Tehnicile microchirurgicale au oferit posibilitatea de a mări capacitatea funcțională a membrului transplantat. Sporirea surviabilității și prevenirea respingerii severe poate fi asigurată prin administrarea hormonilor corticosteroizi, anticorpilor policlonali, inhibitorilor calcineurini, antiproliferativelor cuplați cu transplantul de măduvă osoasă vascularizată, ce mărește chimerismul. Analiza datelor din literatura de specialitate concludă că principalele direcții de dezvoltare a tehnicii de transplant de membru sunt: printingul tisular, elaborarea și dezvoltarea noilor produse, metode, tehnici de imunosupresie.

Transplantul de membru - visul umanității din antichitate - a fost expus în diverse legende și mituri. Despre primul transplant de membru în literatură se menționează transplantarea membrului inferior efectuată în secolul III e. n. Această operație nu poate fi considerată un alotransplant de succes, pentru că la momentul acela nu se cunoșteau despre mecanismele răspunsului imun și tehnicile microchirurgicale de suturare a vaselor.[1,2] În secolul XVIII a fost efectuat primul alotransplant de tendonul lui Achilles la găini. În secolul XIX se practica tot mai des transplantarea țesuturilor: piele, tendoane, nervi, cartilaj, cornee. În secolul XX, după descoperirea tehnicii suturării vaselor în anul 1902 Alexis Carrel (chirurg francez), definește problema răspunsului imun al organismului, la corpul străin asociat. O mare însemnătate a avut