

УДК 591.4:[616.718.5+616.72-018.3]-001.5-089.227.84-003.93-092.9

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ КОСТЕОБРАЗОВАНИЯ, СОСТОЯНИЯ СУСТАВНОГО ХРЯЩА И БОЛЬШЕБЕРЦОВОГО НЕРВА ПРИ ПОВЫШЕННОМ ТЕМПЕ УДЛИНЕНИЯ ГОЛЕНИ АВТОДИСТРАКТОРОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Горбач Е.Н., Ступина Т.А., Варсегова Т.Н., Еманов А.А.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган, e-mail: gorbach.e@mail.ru

Проведено комплексное исследование методами световой, сканирующей электронной микроскопии, рентгеновского электронно-зондового микроанализа и морфометрии регенератов берцовых костей, суставного хряща и большеберцового нерва 11 собак, которым осуществляли удлинение голени аппаратом Илизарова с автоматическим приводом в течение 10 суток с темпом 3 мм за 180 приемов. Данный режим distractionного остеосинтеза с повышенным суточным темпом благодаря высокой дробности обеспечивает реализацию репаративного потенциала костной ткани большеберцовой кости, сокращает время восстановления ее длины по сравнению с классической методикой удлинения на 30%, не вызывает необратимых деструктивных изменений в смежных суставах и нервах.

Ключевые слова: distractionный остеосинтез голени, регенерат берцовой кости, суставной хрящ, большеберцовый нерв, морфология, морфометрия

STUDY OF OSTEOGENESIS DYNAMICS, ARTICULAR CARTILAGE AND TIBIAL NERVE STATE FOR LEG LENGTHENING OF INCREASED RATE USING AN AUTODISTRATOR EXPERIMENTALLY

Gorbach E.N., Stupina T.A., Varsegova T.N., Emanov A.A.

FSBI «Russian Ilizarov Scientific Center Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: varstn@mail.ru

Complex study of regenerated leg bones, articular cartilage and tibial nerve performed by the techniques of light, scanning electron microscopy, electron probe X-ray microanalysis and morphometry in 11 dogs underwent leg lengthening using the Ilizarov fixator with automatic drive during 10 days by 3 mm for 180 times. Due to its high divisibility this mode of distraction osteosynthesis with increased daily rate provides realization of tibial bone tissue reparative potential, reduces the time period of the tibial length restoration in comparison with the classical technique of 30% lengthening, as well as it does not cause irreversible destructive changes in adjacent joints and nerves.

Keywords: distraction osteosynthesis of the leg, regenerated leg bone, articular cartilage, tibial nerve, morphology, morphometry

В современной ортопедии оперативное удлинение применяется с целью улучшения социальной адаптации пациентов как при коррекции асимметрии в длине конечностей при наличии одностороннего укорочения различной этиологии, так и при достижении косметического эффекта у пациентов с субъективно низким ростом. Несмотря на значительные достижения в этой области медицины, поиск новых технологий distractionного остеосинтеза, позволяющих сокращать сроки пребывания пациентов в стационаре и обеспечивающих оптимальные условия для репаративного остеогенеза при минимальном риске послеоперационных осложнений [7], остается актуальной задачей, требующей решения на новом теоретическом и технологическом уровнях.

Наиболее частыми осложнениями при удлинении конечности являются т.н. «миогенные» контрактуры смежных суставов, а также иннервационные и сосудистые расстройства [7]. В проведенных ранее исследованиях было показано, что наиболее

благоприятные условия для остеосинтеза и регенерации тканей создаются при автоматической distraction с темпом 1 мм в сутки за 60 приемов по сравнению с ручной distraction (1 мм за 4 и 8 приёмов) [8, 9]. С целью сокращения сроков аппаратных этапов лечения разработаны технологии с повышенным суточным темпом [10], в РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова в настоящее время изучаются возможности повышения суточного темпа distraction до 3 мм в автоматическом режиме [4]. Дальнейшее развитие этого направления требует изучения состояния физиологических резервов, резистентности и адаптивности тканей удлиняемой конечности, что представляет как теоретический, так и практический интерес.

Цель исследования: изучение особенностей регенерации костной ткани и морфофункциональной адаптации суставного хряща (СХ) и большеберцового нерва (БН) собак в условиях высокодетальной автоматической distraction с суточным темпом 3 мм.

Материал и методы исследования

Эксперименты выполнены на 11 взрослых беспородных собаках, которым через 5 суток после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей осуществляли удлинение голени методом чрескостного дистракционного остеосинтеза с использованием автотриггеров. Суточный темп удлинения соответствовал 3 мм за 180 приемов. Общая величина удлинения голени – 15–17%. Исследования выполняли через 10 суток дистракции (Д 10) ($n = 5$), 30 суток фиксации конечности в аппарате (Ф 30) ($n = 3$) и 30 суток после снятия аппарата (БА 30) ($n = 3$). Содержание, питание, уход, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755). Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом. Для оценки динамики формирования костного регенерата осуществляли еженедельный рентгенологический контроль (аппарат «Compact», (Милан, Италия).

Для изучения особенностей гистоструктуры регенератов берцовых костей использовали метод световой микроскопии целлоидиновых гистотопографических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Массону и полутонких срезов, окрашенных метиленовым синим с постановкой ШИК-реакции. Концентрацию кальция (W_{Ca}) в интермедиарной зоне определяли в области соединительнотканной прослойки и костных отделов дистракционных регенератов при помощи рентгеновского электронно-зондового микроанализатора INCA Energy 200 (Oxford Instrumets Analytical), смонтированном на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) JSM-840 (Jeol, Япония).

Для гистоморфометрического анализа СХ мышелков бедра применяли эпоксидные полутонкие срезы большой площади, окрашенные метиленовым синим и/или метиленовым синим и основным фуксином. На фотомикроскопе «Ортоп» (Германия) с АПК «DiaMorph» (Россия) изображения препаратов оцифровывали и анализировали в программе «ВидеоТест-Мастер-Морфология». Определяли толщину СХ (h , мкм), объёмную плотность хондроцитов ($VV_{хц, \%}$) в ткани, численную плотность хондроцитов ($NA_{хц}$) и долю (%) изогенных групп ($NN_{из, гр}$) и пустых лакун ($NN_{пуст. лак}$) в общем объёме выборки. Рельеф суставной поверхности изучали в СЭМ.

Участки БН оперированной и контралатеральной конечностей иссекали на уровне средней трети голени. Часть материала заливали в парафин, изготавливали продольные импрегнированные серебром срезы. Остальной материал заливали в аралдит. В оцифрованных изображениях поперечных полутонких срезов, окрашенных метиленовым синим и основным фуксином, определяли площадь поперечного сечения БН (A_n), суммарную площадь пучков нервных волокон с периневрием ($A_{ФРН}$), численную плотность ($NA_{мф}$) миелиновых нервных волокон (МВ) и долю их изменённых форм (Deg%).

Контроль – материал от 5 интактных собак. Достоверность различий оценивали с помощью параметрических и непараметрических критериев в программе AtteStat, версия 1.0 [1] в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Результаты исследования и их обсуждение

К окончанию периода дистракции в диастазе БК формировался регенерат нормолибо гипопластического типа (рис. 1а). Величина диастаза составляла $29,6 \pm 0,37$ мм. Костные отделы регенерата в интермедиарной зоне были представлены костноостеоидными тяжами, продольно ориентированными со стороны костных отломков к срединной части регенерата. Их протяженность составляла 5–8 мм. Срединная часть диастаза была заполнена хорошо васкуляризованной ориентированной в продольном направлении рыхлой соединительной тканью. Образующие ее волокна имели слабое ШИК-положительное окрашивание, специфичное для сиалогликопротеинов, участвующих в процессе минерализации формирующегося костного матрикса. В этой зоне содержание Ca (W_{Ca}) составило $1,1 \pm 0,03$ вес.%, на уровне костных отделов – $8,2 \pm 0,05$ (в проксимальном) и $7,4 \pm 0,02$ (в дистальном) вес.% (рис. 2).

К 30 суткам фиксации формировались регенераты гиперпластического типа. Межотломковая область была представлена эндостальным костным регенератом трабекулярного строения, содержание Ca в области заместившейся прослойки составило $11,5 \pm 0,4$ вес.% (рис. 2). Со стороны периоста отмечали образование узкого непрерывного слоя мелкопетливой губчатой кости, формирующего корковую пластинку (рис. 1б), W_{Ca} области проксимального костного отдела составило $13,7 \pm 1,7$ вес.%, дистального – $12,2 \pm 1,1$ вес.% (рис. 2).

Через месяц после снятия аппарата в диастазе формировался новообразованный участок диафиза нормопластического типа. На гистотопограммах наблюдали формирование непрерывной корковой пластинки компактного строения ($W_{Ca} = 18,6 \pm 2,02$ вес.%) и костномозговой полости, содержащей кроветворно-жировой мозг (рис. 1в).

При гистологическом изучении СХ мышелков бедра через 10 суток дистракции выявляли деструктивные изменения поверхностной зоны в виде очагов разволокнения (рис. 3а, 4а). В части наблюдений отмечено нарушение целостности базофильной линии, проникновение сосудов в хрящ.

К концу этапа фиксации наблюдали аналогичные картины деструктивных процессов в поверхностной зоне (рис. 3б, 4б). На этапе фиксации и после снятия аппарата преобладали репаративные процессы, которые выражались повышением проли-

феративной и биосинтетической активности хондроцитов. Наблюдалось увеличение толщины СХ, объемной и численной плотности клеток (табл. 1).

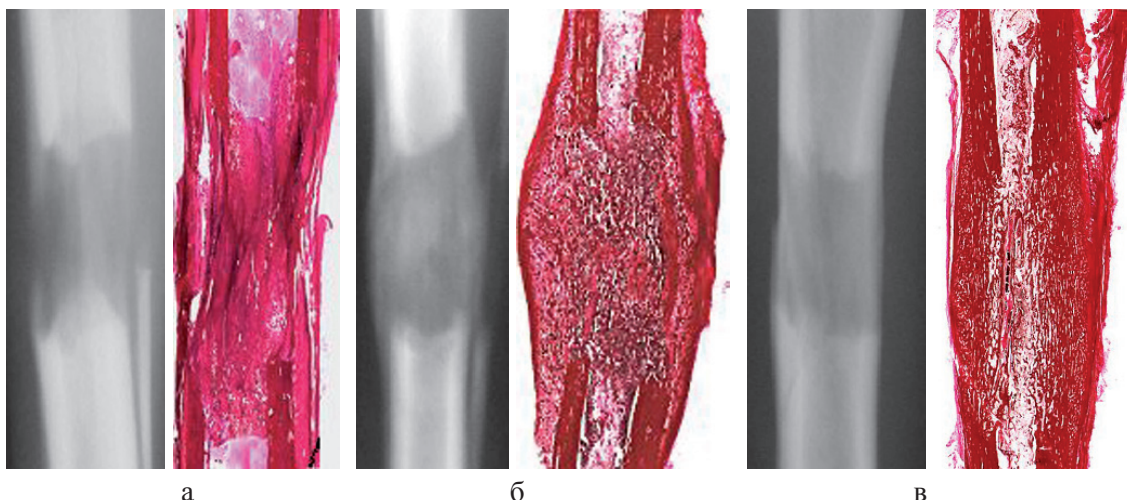


Рис. 1. Процесс костеобразования при удлинении голени автоматическими дистракторами с темпом 3 мм в сутки за 180 приемов: а – через 10 суток дистракции; б – через 30 суток фиксации голени в аппарате; в – через 30 суток после снятия аппарата. Слева – фрагменты рентгенограмм голени собаки. Справа – гистотопограммы дистракционного регенерата диафиза большеберцовой кости. Гистотопографические срезы окрашены гематоксилином и эозином. Увеличение – 1,5х

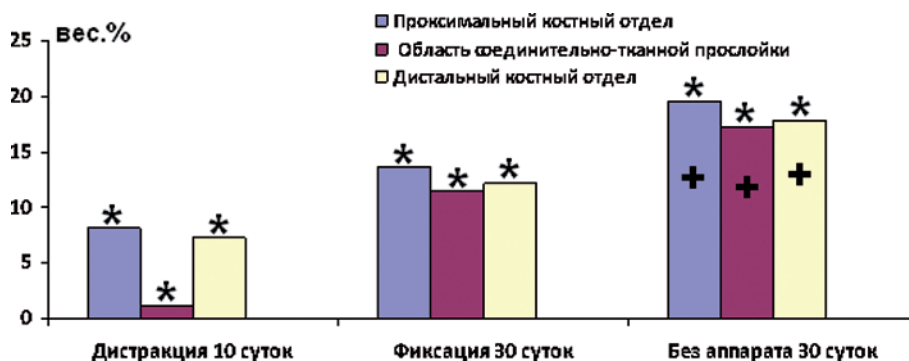


Рис. 2. Динамика содержания Са в различных зонах регенерата большеберцовой кости на этапах эксперимента (* – различия между показателями одной зоны регенерата в различные периоды эксперимента достоверны по критерию Вилкоксона для независимых выборок при $p < 0,01$; + – отсутствие достоверности различий между показателями различных зон в один и тот же период эксперимента при $p \geq 0,05$)

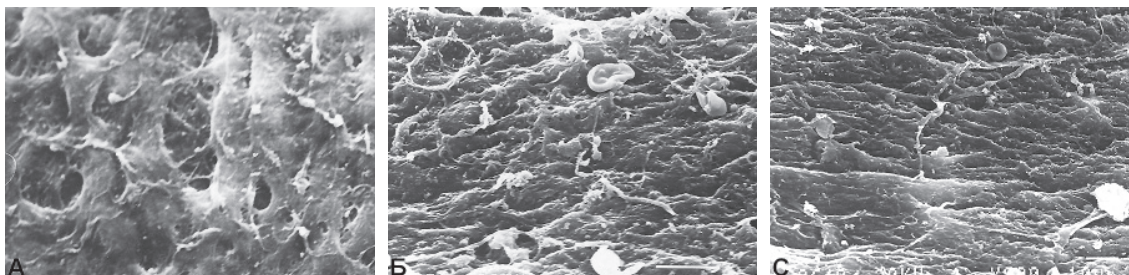


Рис. 3. СЭМ. Поверхность, обращенная в суставную полость: а – увеличение 900, 10 суток дистракции; б – увеличение 1600, 30 суток фиксации голени в аппарате; с – увеличение 800, 30 суток после снятия аппарата

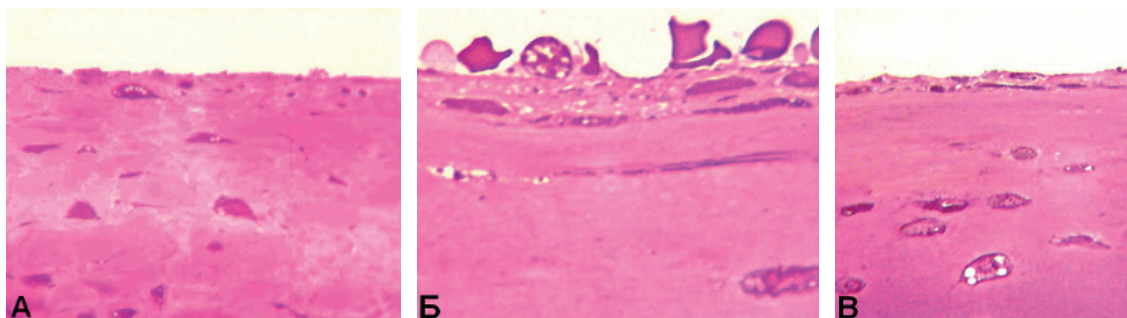


Рис. 4. Поверхностная зона, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином: а – об. 40, ок. 12,5х, 10 суток distraction; б – об. 100, ок. 12,5х, 30 суток фиксации голени в аппарате; в – об. 40, ок. 12,5х, 30 суток после снятия аппарата

Через месяц после снятия аппарата определялись обширные участки с регулярной волнистостью (рис. 3в) и участки со вскрытыми клеточными лакунами. Наблюдалось увеличение интенсивности окраски и восстановление гомогенности межклеточного вещества поверхностной зоны (рис. 4в).

Мозаичность распределения очагов деструкции, наличие вокруг них неповрежденных участков с функционально активными клетками, а также положительная динамика количественных характеристик свидетельствовали о возможности восстановления суставной поверхности.

Таблица 1

Характеристики суставного хряща наружного мыщелка бедра на органном и тканевом уровнях на этапах эксперимента

Параметры	VV _{хц} (%M ± m)	NA _{хц} (M ± m)	h (мкм, M ± m)	NN _{пуст. лак.} (%)	NN _{из.гр.} (%)
Контроль	9,03 ± 1,55	6,12 ± 0,64	475,55 ± 1,31	13,6	14,5
Д 10	4,79 ± 0,39*	5,88 ± 0,48*	375,74 ± 1,89***	25,9	18,8
Ф 30	5,43 ± 0,21*	4,84 ± 0,27*	439,52 ± 1,85***	28,9	22,1
БА 30	7,72 ± 0,49*	6,56 ± 0,45	446,84 ± 1,67***	22,8	22,5

Примечание. При определении достоверности различий с контролем для VV_{хц}, NA_{хц} – использовали критерий Вилкоксона, для h_{хр} – критерий Стьюдента. Различия достоверны: *** – при p < 0,001, * – при p < 0,05.

В продольных срезах БН на уровне удлинения через 10 суток distraction отчетливо различались протяженные участки со сглаженной извитостью нервных волокон. Часть аксонов имела неровные контуры, признаки дисхромии. Встречались единичные удлиненные узлы Ранвье (паранодальная демиелинизация), «овоидные» структуры, а также короткие (вставочные) интернодальные сегменты.

Динамику изменения длины интернодальных сегментов на этапах эксперимента косвенно оценивали по изменению доли профилей ядросодержащих МВ крупного калибра в поперечных срезах. Данный показатель по окончании distraction составил 2,4 ± 0,5%, фиксации – 5,0 ± 0,6%, после снятия аппарата – 4,5 ± 0,1% (в интактном БН – 3,2 ± 0,1%), что свидетельствует об удлинении интернодальных расстояний по окончании distraction при наличии небольшого числа коротких

«вставочных» сегментов миелина, и значительном повышении их количества в последующие сроки эксперимента, что указывает на происходящие в нерве процессы демиелинизации, не завершающиеся в изученные сроки.

В поперечных срезах БН обнаруживались МВ с признаками демиелинизации и аксональной дегенерации, картины валлеровской дегенерации были единичны. По окончании distraction Deg% составляла в среднем 2,61 ± 0,11% (в интактном БН 1,62 ± 0,21%), по окончании этапа фиксации (1,43 ± 0,12%) и после снятия аппарата доля измененных волокон приближалась к значениям интактного нерва (1,61 ± 0,12%).

NA_{mf} через 10 дней distraction снижалась (p < 0,001) на 21,1%, составляя 15300 ± 1136 волокон в 1 мм² (в интактном БН – 19364 ± 461), при этом A_{f-pn} возрастала на 21,7% (табл. 2).

Таблица 2

Общая площадь поперечного среза БН (A_n), суммарная площадь пучков нервных волокон с периневрием (A_{f-pn})

Срок эксп.	A_n (10^3мкм^2)		A_{f-pn} (10^3мкм^2)	
Д 10	2322,21 ± 203,12	2234,68 ± 385,11	917,01 ± 64,68*	718,54 ± 23,88
Ф 30	2194,42 ± 396,59	2348,08 ± 193,44	654,05 ± 35,52	665,14 ± 33,04
БА 30	1993,41 ± 383,71	1897,11 ± 375,02	713,34 ± 14,53*	678,12 ± 12,33

Пр и м е ч а н и е . * – различия между опытной и контралатеральной конечностями достоверны по результатам парного двухвыборочного t-теста при $p < 0,05$.

Через 30 суток фиксации различия по параметрам A_n и A_{f-pn} отсутствовали (табл. 2), NA_{mf} возросла (21601 ± 1986 в 1мм^2) и превышала ($p < 0,001$) значения интактного нерва на 10%. В конце опыта NA_{mf} нормализовалась.

Таким образом, проведенные исследования показали, что применение высокого суточного темпа автоматического удлинения значительно сокращает срок необходимой distraction. К концу этого периода в результате воздействия высокого темпа коллагеновые волокна, формирующие срединную прослойку регенерата не успевают полностью созреть, что способствует их быстрой оссификации после прекращения воздействия растягивающих усилий, о чем свидетельствует интенсивность ШИК-положительного окрашивания волокон прослойки и наличие ионов Са [5]. Из этого следует, что малодифференцированные фибробластоподобные клетки срединной прослойки регенерата, синтезирующие эти вещества, обладают остеогенной потенцией. Однако окончательная их дифференцировка в остеогенном направлении подавляется воздействием distraction, что ранее было отмечено и другими авторами [2]. Этот факт объясняет быстрое формирование эндостального костного регенерата уже в период фиксации.

Наличие обширных периостальных наслоений в этот период можно объяснить хорошей васкуляризацией надкостницы, в которой в период distraction наблюдается активный процесс ангиогенеза.

Рентгенологическое состояние регенерата и клиническая проба позволяли снимать аппарат через 30 суток фиксации. Функциональная нагрузка на конечность в безаппаратный период способствовала быстрой органотипической перестройке

и формированию в межотломковой области новообразованного участка диафиза типического строения уже через 30 суток после снятия аппарата.

В данных условиях эксперимента в суставном хряще мышелков бедра выявлены структурно-функциональные изменения реактивного и/или деструктивно-репаративного характера. О включении механического компонента в патогенез свидетельствует локализация деструктивных изменений в участках высокой нагрузки (разволокнение поверхностной зоны, проникновение сосудов в глубокую зону со стороны субхондральной кости). В срок 30 суток после снятия аппарата репаративные процессы в суставном хряще имели незавершенный характер, в части наблюдений сохранялось нарушение организации матрикса поверхностной зоны. Гистоморфометрический анализ показал, что высокодетальная автоdistraction с темпом 3,0 мм по сравнению с «веерной» distraction (один из современных методов удлинения) [6] позволяет снизить травматизацию смежных суставов и обеспечивает высокую эффективность адаптационных реакций, направленных на восстановление структуры суставного хряща.

Высокодетальное удлинение с суточной скоростью 3 мм сопровождается повышением доли ядросодержащих профилей миелинизированных волокон БН на этапах фиксации и после снятия аппарата, что свидетельствует о процессах демиелинизации нервных проводников. Но восстановление численной плотности МВ и внутривольных объемных отношений за счет активно протекающих в нерве репаративных процессов, в отличие от того, что наблюдали другие авторы при distraction с суточным темпом 3 мм, но в другом ре-

жиме [3], свидетельствует о том, что такой режим оказался относительно щадящими для периферических нервов.

Заключение

Высокая дробность, обеспечиваемая автоматическими приводами к аппарату Илизарова, позволяет создать условия для реализации репаративного потенциала костной ткани БК, позволяя увеличить суточный темп удлинения конечности до 3 мм, сокращая время восстановления ее длины по сравнению с классической методикой удлинения на 30%, не вызывая необратимых деструктивных изменений в смежных суставах и нервах.

Список литературы

1. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. – СПб.: Питер, 2001. – 752 с.
2. Ирьянов Ю.М. Морфологические исследования костных регенератов, формирующихся в условиях distractionного остеосинтеза // Гений Ортопедии. – 1998. – № 2. – С. 5–10.
3. Краснов А.Ф., Котельников Г.П., Чернов А.П. Сухожильно-мышечная пластика в травматологии и ортопедии. – Самара: Самарский Дом печати, 1999. – 376 с.
4. Особенности костеобразования при удлинении голени автоматическими дистракторами с темпом 3 мм за 180 приемов (экспериментальное исследование) / В.И. Шевцов, С.А. Ерофеев, Е.Н. Горбач, А.А. Еманов // Гений ортопедии. – 2006. – № 1. – С. 10–16.
5. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе. – Киев: Наук. Думка, 1989. – 192 с.
6. Ступина Т.А., Ерофеев С.А. Гистоморфометрические характеристики изменений суставного хряща при «веерном» удлинении голени в эксперименте // Гений ортопедии. – 2007. – № 2. – С. 57–60.
7. Шевцов В.И., Попков А.В. Оперативное удлинение нижних конечностей. – М.: Медицина, 1998. – 192 с.
8. Шрейнер А.А., Ерофеев С.А., Щудло М.М. Теоретические аспекты distractionного остеосинтеза. Значение ритма distraction // Гений ортопедии. – 1999. – № 2. – С. 13–17.
9. Щудло М.М., Ступина Т.А., Ерофеев С.А. Экспериментально-гистологическое исследование суставного хряща наружного мыщелка бедра при удлинении голени собак // Морфология. – 2005. – № 5. – С. 67–71.
10. Morphometric analysis of canine skeletal muscles following experimental callus distraction according to the Ilizarov method / Fink B., Neuen-Jacob E., Madej M., Lienert A., Rütther W. // J Orthop Res. – 2000. – № 18. – P. 620–628.