

**Гистоморфометрическая характеристика активности
дистракционного остеогенеза при различных способах
нарушения целостности костей голени
(экспериментальное исследование)**

Т.А. Силантьева, А.М. Чиркова, С.А. Ерофеев

**The histomorphometric characteristic of distraction osteogenesis
activity for different ways of leg bone integrity disturbance
(experimental study)**

T.A. Silantiyeva, A.M. Chirkova, S.A. Yerofeyev

Государственное учреждение науки

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

На материале трех экспериментальных серий при различных способах нарушения целостности костей голени у 30 взрослых беспородных собак оценивали активность дистракционного остеогенеза с применением методов светооптической микроскопии, гистоморфометрии и вариационной статистики. Разработан и применен гистоморфометрический критерий – индекс содержания костного вещества, позволяющий прогнозировать отдаленные результаты эксперимента по результатам количественной оценки костеобразования в периоде дистракции аппаратом. Анализ результатов исследования выявил серии с оптимальным, удовлетворительным и неудовлетворительным течением репаративного процесса, отличающиеся различной степенью травматизации костного мозга и сосудистой сети диафиза большеберцовой кости.

Ключевые слова: эксперимент, голень, дистракционный остеосинтез, остеотомия, кортикотомия, остеогенез, гистоморфометрия.

The activity of distraction osteogenesis was analyzed based on the material of three experimental series for different ways of leg bone integrity disturbance in 30 adult mongrel dogs using the methods of light optical microscopy, histomorphometry and variation statistics. Histomorphometric criterion was developed and used - the index of bone substance content, allowing to predict the long-term results of the experiment by the results of osteogenesis quantitative analysis in the period of distraction with the device. The analysis of the study results revealed the series with optimal, satisfactory and unsatisfactory reparative process, being distinguished by different extent of the traumatization of bone marrow and vascular network of tibial diaphysis.

Keywords: experiment, leg, distraction osteosynthesis, osteotomy, corticotomy, osteogenesis, histomorphometry.

В настоящее время одной из актуальных проблем клинической и экспериментальной ортопедии является сокращение сроков госпитализации пациентов без ущерба качеству проведенных лечебных мероприятий и исходу лечения. Предпосылки к решению этой задачи были заложены в работах Г.А. Илизарова и его учеников, постулировавших основные принципы компрессионно-дистракционного остеосинтеза: стабильную фиксацию отломков, стимулирующее влияние напряжения растяжения, берегательное отношение к остеогенным тканям и кровоснабжению [4, 5, 12, 13, 14]. Во многих работах достаточно полно описано строение дистракционного регенерата [4, 12] и особенности тканевого обмена при активном течении репаративного процесса – высокий уровень оксигенации в обильно васкуляризованной парной

зоне неоosteогенеза и состояние гипоксии в гиповаскулярной соединительнотканной прослойке [8]. При этом большое внимание уделяется кровоснабжению кости как в преддистракционном периоде, так и в течение периода дистракции [3, 12, 21]. Биомеханическое моделирование процесса репаративной регенерации кости, учитывающее происхождение остеогенных клеток, выявляет первоочередную роль костного мозга в качестве источника малодифференцированных клеток с высокой остеогенной активностью [19]. Оптимальное сочетание стабильной фиксации и сохранности костного мозга отломков, адекватного кровоснабжения дистракционного регенерата обеспечивает органотипическую перестройку новообразованного участка кости [5, 10, 12, 14, 17, 20, 22, 23]. В экспериментальном отделе РНЦ «ВТО» разра-

ботан ряд моделей distractionного остеосинтеза длинных трубчатых костей с целью изучения закономерностей формирования distractionного регенерата [1, 6, 9, 15, 18]. Обеспечивая одинаково стабильную фиксацию костных фрагментов, они различаются между собой способом нарушения целостности кости в области диафиза и, следовательно, степенью травматизации костного мозга и сосудистой сети органа [6, 10, 14, 16].

Целью настоящей работы являлась гистологическая и морфометрическая оценка активности остеогенеза при формировании distractionного регенерата большеберцовой кости после нарушения её целостности различными способами, а также разработка гистоморфометрического критерия, позволяющего по результатам количественной оценки костеобразования в периоде distraction прогнозировать исход эксперимента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были distractionные регенераты и прилежащие к ним отломки большеберцовых костей, взятые у 25 взрослых беспородных животных (собаки) на различных сроках эксперимента, и диафизы большеберцовых костей 4 интактных животных (норма).

В первой серии производили безударную кортикотомию берцовых костей в средней трети диафиза, во второй – частичную косую кортикотомию берцовых костей в средней трети с последующей торсией, в третьей – остеотомию долотом на том же уровне. Отломки большеберцовой кости фиксировали аппаратом Илизарова и через 5 суток начинали удлинение голени с темпом 1 мм в сутки (за 4 приема). Удлинение осуществляли в течение 4 недель. Животных выводили из эксперимента через 33, 63 и 93 дня (по окончании 28 суток периода distraction, 30 – периода фиксации аппаратом и 30 – после снятия аппарата).

Материалом исследования явились продольные гистотопографические целлоидиновые срезы, выполненные во фронтальной плоскости, окрашенные гематоксилином и эозином, микрофуксином по методу Ван-Гизона.

Были использованы гистологический, морфометрический, статистический методы исследования. Гистоморфометрические исследования выполняли на аппаратно-программном ком-

плексе "ДиаМорф". Для оценки значимости межгрупповых различий использовали критерии Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни.

При выполнении количественного исследования по изучению остеогенной активности использовали способ, предложенный и апробированный авторами (заявка на выдачу патента РФ № 2001110381/14 приоритет от 16.04.2001), предусматривающий комплексную оценку образования костного вещества в процессе формирования и перестройки distractionных регенератов [11].

Статистически обработанные количественные данные использовали для расчета следующих параметров: коэффициента формы регенерата (Кф), коэффициента структуры регенерата (Кс), коэффициента компактизации регенерата (Кк), индекса плотности компактной костной ткани (Икк), индекса плотности губчатой костной ткани (Игк). Представленные выше параметры являлись базовыми и на их основе вычислялись показатели, позволяющие охарактеризовать состояние костеобразования: индекс содержания костного вещества в интактной кости (Ии) и индекс содержания костного вещества в регенерате (Ир). Значения базовых параметров, использованных для вычисления индексов содержания костного вещества, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Значения базовых параметров для гистоморфометрической оценки активности distractionного остеогенеза

Способ нарушения целостности диафиза большеберцовой кости	Срок эксперимента (сутки)	Кф	Кс	Игк (%)	Кк	Икк(%)
Безударная кортикотомия долотом с торсией Z-образной спицей	33	1,04±0,029	0,72±0,021*	52,2±1,74*	---	---
	63	1,01±0,044	0,91±0,037**	31,9±2,90*	0,06±0,019*	83±2,1**
	93	1,17±0,022**	0,94±0,040**	23,2±2,61*	0,25±0,013*	84±2,0**
Косая кортикотомия долотом с торсией Z-образной спицей	33	1,01±0,013	0,81±0,017**	34,8±2,61*	---	---
	63	1,10±0,025*	0,84±0,015**	35,4±3,48*	0,03±0,018*	79±1,4**
	93	1,10±0,029*	0,91±0,014*, p<0,04	23,8±2,61*	0,23±0,08*	80±1,5**
Остеотомия долотом с повреждением питающей артерии	33	0,97±0,040	0,58±0,005*	36,5±3,40**	---	---
	63	1,10±0,140	0,76±0,030*	34,0±5,70**	---	---
Контрольная группа		1,00±0,012	1,00±0,012	0,09±0,0035	0,43±0,012	99±0,001

Примечание: * – достоверность межгрупповых различий и различий с контролем, p<0,01; ** – достоверность различий с контролем p<0,01.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования были определены группы с оптимальным, удовлетворительным и неудовлетворительным течением репаративного процесса.

Нарушение целостности большеберцовой кости с применением способа безударной кортикотомии обеспечивало наиболее благоприятные условия для остеогенеза в период distraction, поскольку в этом случае сохранялись как внутрикостная сосудистая сеть отломков, так и кровоснабжение со стороны надкостницы. По данным микроскопического исследования, питательная артерия прослеживалась на всем протяжении новообразованного участка диафиза у всех экспериментальных животных данной серии.

В период distraction остеосинтетический процесс преобладал над резорбтивным (рис. 4а), площадь костных отделов составляла не менее 70% от площади всего регенерата на гистологических препаратах. Трабекулярная плотность эндостально образованной губчатой кости превышала 35%. Немаловажно, что к концу периода distraction наблюдался активный остеогенез на кортикотомированных поверхностях костных отломков в интермедиарной зоне. Это свидетельствовало о сохранении кровоснабжения компактной кости отломков и обеспечивало раннее формирование корковой пластинки distractionного регенерата (рис. 1а). Ир к этому сроку составлял не менее 90% от нормы (без учета типа костной ткани) (рис. 5).



Рис. 1. Гистопографические препараты distractionных регенератов диафиза большеберцовой кости, срок эксперимента 33 дня (28 суток периода distraction): а – серия с безударной кортикотомией; б – серия с частичной косой кортикотомией и последующей торсией; в – серия с остеотомией долотом; окр. пикрофуксином по Ван-Гизону, сканограммы

Период фиксации характеризовался закрытием «зоны роста», формированием корковой пластинки и образованием костномозговой полости, что сопровождалось резорбцией значительного объема трабекул губчатой кости (рис. 2а). Морфологическую картину подтверждали количественные данные, свидетельствующие об увеличении площади костных отделов до 91%, с одной стороны, и о снижении плотности губчатой кости до 23% - с другой. Ир в этом периоде составлял 79% от нормы (рис. 5).



Рис. 2. Гистопографические препараты distractionных регенератов диафиза большеберцовой кости, срок эксперимента 63 дня (30 суток периода фиксации аппаратом): а - серия с безударной кортикотомией; б - серия с частичной косой кортикотомией и последующей торсией; в - серия с остеотомией долотом; окр. пикрофуксином по Ван-Гизону, сканограммы

В период после снятия аппарата под влиянием функциональной нагрузки происходило remodelирование distractionного регенерата с преобладанием остеогенной активности. В то же время не отмечалось явления гиперостоза, возникающего при функциональном перенапряжении в результате несоответствия структуры костного органа (рис. 3а) [2]. Ир через месяц после снятия аппарата составлял более 95% от нормы (рис. 5).

В серии с выполнением частичной косой кортикотомии берцовых костей в средней трети с последующей торсией сосудистая сеть диафиза большеберцовой кости повреждалась как в результате ударной контузии, так и вследствие травматизации костного мозга и надкостницы вдоль значительной по протяженности линии излома. Питательная артерия прослеживалась на всем протяжении диафиза.



Рис. 3. Гистотопографические препараты дистракционных регенератов диафиза большеберцовой кости, срок эксперимента 93 дня (30 суток периода после снятия аппарата): а – серия с безударной кортикотомией; б – серия с частичной косою кортикотомией и последующей торсией; окр. пикрофуксином по Ван-Гизону, сканограммы

В конце периода дистракции, наряду с активным костеобразованием и умеренной остеокластической резорбцией в апикальных участках костных отделов (рис. 4б), площадь которых составляла не менее 80% от площади регенерата, наблюдали интенсивную резорбцию трабекул в базиллярных участках. Это определяло снижение плотности губчатой кости в сравнении с аналогичным сроком предыдущей серии (не более 25%). Ир также был снижен и состав-

лял около 65% от нормы (рис. 5). Следствием травматизации сосудов компактной кости являлось угнетение остеогенеза на их раневой поверхности, а также остеопороз и выраженная периостальная реакция в отломках (рис. 1б).

В период фиксации аппаратом, в результате ухудшения кровоснабжения «зоны роста», обусловленного редуцированием венозного и капиллярного отделов сосудистого русла, процесс остеогенеза замедлялся. Резко снижался темп прироста площади костных отделов, составлявших 84% от всего регенерата, трабекулярный объем губчатой кости сохранялся на уровне 25%. Гипоксия отдельных участков являлась причиной дифференцировки остеогенных клеток по хондроиному типу. Ир к окончанию периода составлял 79% от нормы (рис. 5). Интермедиарное пространство было заполнено преимущественно зрелой губчатой костной тканью, образованной как эндостально, так и периостально. Таким образом, к этому сроку не произошло органотипической перестройки новообразованного участка диафиза, продолжался процесс накопления массы костного вещества (рис. 2б).

В период после снятия аппарата функциональная нагрузка стимулировала перестройку регенерата. Так, через 30 суток после снятия аппарата наблюдали корковую пластинку, формирующуюся в результате компактизации губчатой кости регенерата, и разреженную сеть трабекул в центральной его части (рис. 3б). Ир составлял около 87% от нормы, что свидетельствовало о меньшей зрелости новообразованного участка, чем к тому же сроку эксперимента в предыдущей серии (рис. 5).

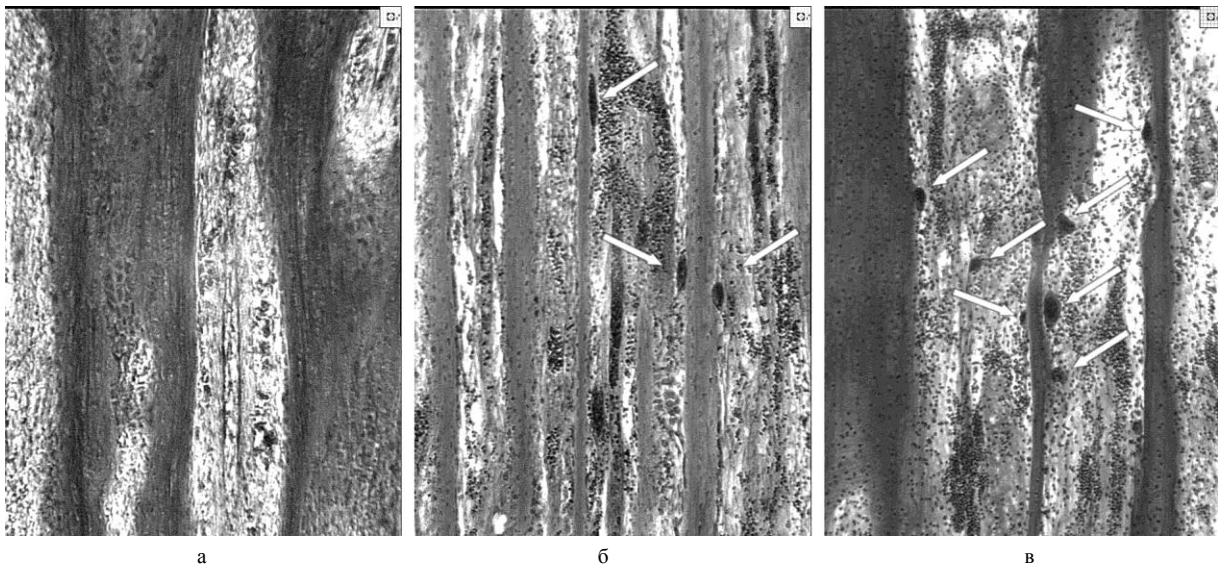


Рис. 4. Апикальные участки костных отделов дистракционных регенератов, срок эксперимента 33 дня (28 суток периода дистракции): а – серия с безударной кортикотомией; б – серия с частичной косою кортикотомией и последующей торсией; в – серия с остеотомией долотом, окр. гематоксилином-эозином, ув. об. 6,3, ок. 10. Стрелками указаны остеокласты, располагающиеся на поверхности новообразованных костных трабекул

Наиболее неблагоприятной в отношении сохранения сосудистой сети являлась остеотомия долотом в тех случаях, когда полностью пересекалась костномозговая полость, что подтверждено гистологическими исследованиями. Такие данные получены при изучении диафизов большеберцовых костей у животных, выведенных из эксперимента по окончании периодов distraction и фиксации голени в аппарате. У двух животных, выведенных из опыта в период после снятия аппарата, при выполнении остеотомии не наблюдалось кровотечения из операционной раны, что свидетельствовало о сохранении внутрикостного кровоснабжения и было подтверждено гистологически.

Низкий уровень остеогенной активности и резорбция новообразованных трабекул в период distraction (рис. 4в) обуславливали резкое уменьшение площади костных отделов регенерата по сравнению с тем же периодом предыдущих серий – в среднем около 60% (рис. 1в). Плотность губчатой костной ткани составляла около 25%. В составе трабекул встречались многочисленные участки хондроидной ткани, что свидетельствовало об их недостаточном кровоснабжении. Ир в этом случае составлял менее 50% от нормы (рис. 5).

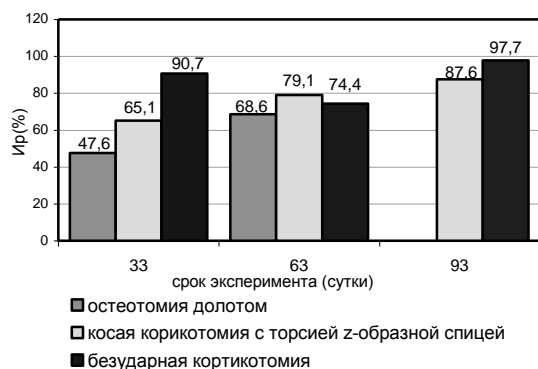


Рис. 5. Индекс содержания костного вещества в регенерате (Ир) в процентах от нормы (Ип)

В период фиксации репаративный процесс протекал по-разному. В одном случае, при сохранении фиброзированной соединительнотканной прослойки, костные отделы разрежились (рис. 2в), плотность губчатой кости составляла всего 16%. В другом случае внутри фиброзного «чехла», располагавшегося по периферии всего новообразованного участка, костные отделы разделяла зона хондроидной ткани. Плотность губчатой кости в этом случае была выше и составляла 33%. В обоих случаях Ир был ниже, чем в те же сроки для предыдущих серий, и в среднем составлял 68% (рис 5). Признаков формирования корковой пластинки на уровне регенерата к этому сроку не наблюдалось. Поскольку в толще «зоны роста» не было отмечено очагов остеогенеза, следует отметить необходимость продления периода фиксации для данной экспериментальной серии. Это озна-

чает, что сроки оганотипической перестройки новообразованного участка диафиза также должны были увеличиться [7].

Неожиданно раннее «созревание» регенерата, наблюдаемое к 30 суткам периода после снятия аппарата, можно объяснить сохранением питательной артерии у животных, выведенных из эксперимента в этом периоде. Новообразованный участок диафиза был представлен зрелой губчатой костной тканью, компактизирующейся по периферии.

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы:

- при проведении distractionного остеосинтеза длинных трубчатых костей в условиях стабильной фиксации отломков эффективность репаративного процесса зависит от степени травматизации отломков, в первую очередь – от сохранности кровоснабжения кости;
- определяющим показателем интенсивности репаративного остеогенеза является накопление костного вещества в регенерате в период distraction;
- индекс содержания костного вещества является информативным показателем, позволяющим количественно оценивать эффективность distractionного остеогенеза при исследовании гистологического материала.

Наиболее благоприятное течение репаративного процесса в период distraction при удлинении большеберцовой кости в области диафиза после выполнения безударной кортикотомии характеризуется накоплением костного вещества в объеме, составляющем не менее 90% от такового у интактного животного. В период фиксации аппаратом «зона роста» регенерата замещается губчатой костной тканью. Через 30 суток после снятия аппарата под влиянием физиологических нагрузок формируются костномозговая полость и компактная корковая пластинка.

Удовлетворительный результат наблюдается в эксперименте с выполнением частичной косой кортикотомии берцовых костей в средней трети с последующей торсией. Накопление костного вещества к окончанию периода distraction превышает 65% от нормы. В период фиксации аппаратом в «зоне роста» сохраняются отдельные участки плотной волокнистой соединительной ткани. Спустя 30 суток периода после снятия аппарата формирующаяся корковая пластинка имеет строение губчатой кости, костномозговая полость находится в начальной стадии формирования.

При неудовлетворительном течении distractionного остеосинтеза, после выполнения остеотомии берцовых костей долотом, объем костного вещества к окончанию периода удлинения не превышает 50% от нормы. К 30 суткам периода фиксации аппаратом «зона роста» реге-

нерата представлена фиброзной либо хондроидной тканью, корковая пластинка не сформирована, что требует увеличения продолжительности

этого периода и замедляет восстановление органотипического строения кости.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.С. 1727503 СССР, МПК⁵ G 09 В 17/56 Способ кортикотомии и устройство для его осуществления / Г.А. Илизаров (СССР). - № 4749176/14; заявл. 16.10.89. ДСП
2. Бруско А.Т. Особенности репаративной реакции при функциональном перенапряжении и переломах костей // Ортопед., травматол. - 1994. - № 4. - С. 71.
3. Григоровский В.В. Количественные аспекты патоморфологии и патогенез травматического инфаркта длинной кости // Ортопед., травматол. - 1997. - № 3. - С. 41.
4. Илизаров Г.А., Хелимский А.М. Особенности репаративной регенерации при чрескостном компрессионно-дистракционном остеосинтезе // Современные проблемы регенерации. - Йошкар-ола, 1980. - С. 28-55.
5. Илизаров Г.А., Шрейнер А.А., Имерлишвили И.А. Остеогенные потенции костного мозга диафиза // Экспериментально-теоретические и клинические аспекты чрескостного остеосинтеза: Тез. докл. Международ. конф. - Курган, 1986. - С. 26-27.
6. Костеобразование после безударной кортикотомии (экспериментальное исследование) / В.И. Шевцов, С.А. Ерофеев, А.М. Чиркова и др. // Новые технологии в медицине: Тез. докл. науч.-практ. конф. с международ. участ. - Курган, 2000. - Ч. II. - С. 124-125.
7. Многотомное руководство по патологической анатомии. Т. VI.: Патологическая анатомия болезней костно-суставной системы, мышц и сухожилий. - М., 1962. - 518 с.
8. О природе эффекта Илизарова / К.С. Десятниченко, Л.С. Кузнецова, О.Л. Гребнева, М.А. Ковинька // Ортопед., травматол. - 2000. - № 2. - С. 102-103.
9. Оперативное удлинение нижних конечностей: Учебно-метод. рекомендации / ВКНЦ «ВТО»; Сост.: Г.А. Илизаров, А.В. Попков, А.Д. Карагодина, С.Г. Лаврентьева-Илизарова. - Курган, 1990. - 34 с.
10. Регенерация кости после различного вида нарушения ее целостности в условиях фиксации аппаратом Илизарова / В.И. Шевцов, С.А. Ерофеев, А.М. Чиркова, Т.Г. Мощенко // Современные проблемы медицины и биологии: Материалы XXX обл. юбил. науч.-практ. конф. - Курган, 1998. - С. 88-89.
11. Способ гистоморфометрического исследования дистракционного остеогенеза на оцифрованных изображениях с использованием аппаратно-программного комплекса «ДИАМОФ» / Т.А. Силантьева, А.М. Чиркова, С.А. Ерофеев, В.Н. Тимофеев // Современные технологии в диагностических исследованиях: Сб. докл. Международн. науч.-практ. конф. - Днепропетровск, 2002. - С. 185-189.
12. Стецула В.И., Девятков А.А. Чрескостный остеосинтез в травматологии. - Киев, 1987. - 200 с.
13. Шевцов В.И., Ирьянов Ю.М. Особенности формирования костного сращения в условиях дистракции // Анналы травматол. ортопед. - 1995. - № 2. - С. 20-23.
14. Шрейнер А.А. Удлинение голени в условиях сохранения остеогенных тканей и кровоснабжения кости: Автореф. дис...канд. мед. наук. - Новосибирск, 1979. - 18с.
15. Шрейнер А.А., Бородайкевич Р.Д. Частичная кортикотомия в сочетании с флексионной остеоклазией при устранении угловых деформаций диафиза (эксперим. исследование) // Лечение повреждений и заболеваний опорно-двигательного аппарата методом Илизарова: Науч. тр. ВКНЦ «ВТО», Казанский филиал. Т. XXXVII. - Казань, 1991. - С. 59-62.
16. Шрейнер А.А., Ерофеев С.А. Эффективность разных видов кортикотомий диафиза для дистракционного остеосинтеза (экспериментальное исследование) // Актуальные вопросы и перспективы развития многопрофильного лечебного учреждения: Тез. докл. Всерос. науч. конф. с международ. участием, посвящен. 15-летию 16 Центр. Военного специализ. госпиталя. - Шиханы, 2001. - С. 418-420.
17. Шрейнер А.А., Чиркова А.М., Силантьева Т.А. Сравнительные экспериментальные данные различных видов кортикотомии // Новые технологии в медицине: Тез. докл. науч.-практ. конф. с международ. участ. - Курган, 2000. - Ч. II. - С. 154.
18. Экспериментальное обоснование шадящих методов нарушения целостности кости: отчет о НИР (заключит.) / МЗ РФ, РНЦ «ВТО»; Руководитель В.И. Шевцов. - № ГР 01950004231; Инв. № 02980005062. - Курган, 1995. - 21 с.
19. Biomechanical model to stimulate tissue differentiation and bone regeneration / D. Lacroix, P.J. Prendergast, G. Li, D. Marsh // Med. Biol. Eng Comput. - 2002. - Vol. 40, N. 1. - P. 14-21.
20. Goodship A.E., Cunningham J.L., Kenwright J. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing // Clin. Orthop. - 1998. - N 355, Suppl. - P. 105-115.
21. Hausman M.R., Schaffler M.B., Majeska R.J. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis // Bone. - 2001. - Vol. 29, N 6. - P. 560-564.
22. Uhthoff H.K., Finnegan M.A. The role of rigidity in fracture fixation. An overview // Arch. Orthop. Trauma Surg. - 1984 - Vol. 102, N 3. - P. 163-166.
23. Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages / S. Hankemeier, S. Grassel, G. Plenz et al. // J. Orthop. Res. - 2001. - Vol. 19, N. 4. - P. 531-538.

Рукопись поступила 09.01.03.