

© Группа авторов, 2008

**Особенности метаболизма тканей при удлинении
конечности методом Илизарова с темпом дистракции
3 мм в сутки в автоматическом режиме**

М.В. Стогов, С.Н. Лунева, А.А. Еманов

***The characteristic features of tissue metabolism for limb
lengthening by the Ilizarov method with the distraction rate of 3 mm
per day in the automatic mode***

M.V. Stogov, S.N. Luniova, A.A. Yemanov

Федеральное государственное учреждение

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

В проведенном экспериментальном исследовании показаны особенности тканевого обмена скелетных мышц и тканей сустава, удлиняемых в автоматическом режиме конечностей с темпом дистракции 3мм/сут. Дан анализ изменений сыровоточных показателей костного метаболизма в динамике удлинения.

Ключевые слова: удлинение конечности, скелетные мышцы, кровь, костная ткань, хрящ.

The experimental study performed has demonstrated the characteristic features of the tissue metabolism of the skeletal muscles and articular tissues in the limbs lengthened with the distraction rate of 3 mm/day in the automatic mode. The analysis of the changes in bone metabolism serum values is shown in the dynamics of lengthening.

Keywords: limb lengthening, skeletal muscles, blood, bone tissue, cartilage.

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос улучшения результатов оперативно-го удлинения конечностей с помощью внешних фиксаторов и сокращения сроков лечения остается актуальным. Значительный контингент больных с укорочениями конечностей выдвигает проблему реабилитации этих пациентов в число важных медико-социальных проблем [6, 9]. В связи с этим разработка и внедрение новых методов удлинения конечности, основанных на сберегательных, щадящих принципах имеет перспективное направление. Вмешательство на скелете, последующие манипуляции вызывают существенные изменения во внутренней среде организма, напряжение в системах, ответственных за гомеостаз и адаптацию. Известно, что структура и функция костной ткани поддержи-

вается специфическими ферментами, синтезирующими и расщепляющими компоненты внеклеточного матрикса, а также ферментами общих метаболических путей, снабжающих костные клетки энергией и пластическим материалом. При этом значимую роль в процессах регенерации костной ткани в условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза играет функциональное состояние скелетных мышц. Целью настоящего исследования явилось изучение динамики показателей сыровотки крови, характеризующих костный метаболизм, а также исследование обменных процессов, протекающих в скелетных мышцах удлиняемой конечности у собак при темпе дистракции 3 мм в сутки в автоматическом режиме.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биохимические исследования проведены на 20 беспородных взрослых собаках в возрасте от 1 до 3 лет, массой тела 21,8 кг, с длиной голени 19,2 см, которым осуществляли удлинение голени аппаратом Илизарова.

В основной группе (8 собак) — удлинение проводили с темпом 3 мм в сутки за 180 приемов в условиях автоматической высокоточной дистракции в течение 10 дней. В группе сравне-

ния — контрольная группа (12 собак) удлинение осуществляли в ручном режиме с темпом 1 мм в сутки за 4 приема в течение 28 дней. Величина удлинения сегмента в обеих группах составила 28-30 мм. Для оценки результатов использовали биохимический и клинический методы исследования.

На основании клинических исследований определяли общее самочувствие животного,

функциональное состояние удлиняемой конечности (амплитуду движения смежных суставов), отмечали состояние мышц, мягких тканей в период эксперимента.

Материалом исследования являлись сыворотка крови, передняя большеберцовая мышца удлиняемой конечности и фрагменты хряща и кости коленных суставов опытной и контралатеральной конечности. Мышечный экстракт приготавливали на 0,15M растворе KCl при 5 °C, тканевой гомогенат центрифугировали 10 мин при 14000 g на ультрацентрифуге Beckman&Coulter (США). Для определения количества минеральных веществ губчатую кость и хрящ подвергали влажному озолению.

Углеводно-энергетический метаболизм мышечной ткани оценивали по активности ферментов – лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), креатинфосфокиназы (КК), а также по содержанию в супернатанте конечных продуктов гликолиза и перекисного окисления липидов (ПОЛ) – молочной кислоты (МК) и малонового диальдегида (МДА) соответственно. В губчатой костной ткани определяли содержание кальция и фосфата, исследование органических компонентов костной и хрящевой ткани включало в себя определение гексоз по Леонтьеву [4]. В образцах хряща также определялось содержание влаги

гравиметрическим методом.

В сыворотке крови определяли концентрацию общего кальция, неорганического фосфата, малонового диальдегида, диеновых конъюгат (ДК), а также активность щелочной (ЩФ) и тартратрезистентной кислой (ТрКФ) фосфатаз. Дополнительно для исследования соотношения объемов остеогенеза и резорбции нами рассчитывался индекс фосфатаз (ИФ=ЩФ/ТрКФ). В эритроцитах находили активность антиоксидантного фермента – супероксиддисмутазы (СОД).

Активность КК, ЛДГ, ЩФ, ТрКФ, а также концентрацию МК, кальция и фосфата определяли на анализаторе Stat Fax® 1904 Plus (США), используя наборы реагентов Vital Diagnostic (Санкт-Петербург). Ферментативную активность Г6ФДГ определяли по методу Ф.Е. Путиной [5]. Активность тканевых энзимов рассчитывали на белок, который определяли по методу Лоури. Содержание МДА находили по реакции с тиобарбитуровой кислотой [7], ДК – спектрофотометрически в гептановой фазе при длине волны 232 нм [7]. СОД – модифицированным методом N. Nishikimi [1].

Для оценки достоверности различий полученных результатов с дооперационными значениями и с нормой использовали непараметрический U-критерии Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты биохимического исследования сыворотки крови представлены в таблицах 1-2. Согласно данным таблицы 1, видно, что содержание электролитов в сыворотке крови животных основной группы на всех сроках эксперимента достоверно от дооперационных значений не отличалось, тогда как у животных с темпом удлинения 1 мм в сутки (контрольная группа) отмечалось снижение концентрации кальция к концу этапа distraction. На этом же сроке в обеих группах статистически значимо возрастала активность щелочной и кислой фосфатаз. Отсутствие значимого роста ИФ к концу distraction у животных с темпом удлинения 3 мм/сут., при увеличении фосфатазной активности, свидетельствовало об одновременной интенсификации остеосинтетических и остеолитических процессов в костной ткани при сохранении соотношения их объемов, характерных для здоровых животных.

Анализируя показатели ПОЛ и активности антиоксидантного фермента – СОД в эритроцитах собак, мы наблюдали рост концентрации МДА и снижение активности СОД к концу distraction в обеих экспериментальных группах (табл. 2). На 30-е сутки фиксации при удлинении 3 мм/сут. в автоматическом режиме происходило восстановление показателей ПОЛ и эритроцитарной СОД к дооперационным значе-

ниям, аналогичные изменения происходили и у животных контрольной группы.

Таблица 1
Динамика фосфатазной активности и электролитов сыворотки крови собак при удлинении костей голени в различных режимах distraction

		До операции	Конец distraction	30-е сутки фиксации
ЩФ, Е/л	О	53,7; 6 (53,7÷77,0)	86,1*; 7 (72,0÷153,8)	61,7; 4 (57,0÷88,6)
	К	58,2; 27 (51,6÷77,5)	130,2*; 10 (118,2÷163,7)	87,0; 4 (69,8÷110,3)
ТрКФ, Е/л	О	3,5; 6 (2,9÷4,2)	5,0*; 7 (3,4÷6,2)	4,4; 4 (4,3÷4,5)
	К	4,9; 27 (3,9÷5,7)	6,7*; 10 (6,1÷7,2)	7,9*; 4 (7,6÷8,0)
ИФ	О	12,8; 6 (12,4÷26,6)	17,3; 7 (12,5÷46,4)	13,4; 4 (12,7÷20,5)
	К	13,1; 27 (9,7÷14,3)	21,3*; 10 (17,3÷25,8)	10,9; 4 (8,8÷14,5)
Са, ммоль/л	О	2,45; 7 (2,30÷2,62)	2,30; 8 (2,23÷2,39)	2,39; 4 (2,37÷2,60)
	К	2,51; 34 (2,39÷2,68)	2,37*; 11 (2,33÷2,46)	2,43; (2,29÷2,60)
Фосфат, ммоль/л	О	1,52; 7 (1,28÷1,73)	1,58; 8 (1,40÷1,72)	1,53; 4 (1,45÷1,75)
	К	1,46; 4 (1,24÷1,66)	1,30; 11 (1,11÷1,66)	1,38; 4 (1,17÷1,62)

Примечание. Здесь и в табл. 2-4 результаты представлены в виде медианы; объем выборки; 0÷100-й процентиль. * – результаты достоверно отличающиеся от дооперационных значений при уровне значимости $p < 0,05$. О и К – основная и контрольная группы соответственно.

Таблица 2

Концентрация продуктов перекисного окисления плазмы крови и СОД эритроцитов у собак при удлинении костей голени в различных режимах distraction

		До операции	Конец distraction	30 суток фиксации
ДК нмоль/мг липидов	О	1,60; 8 (1,39 ÷ 2,35)	2,17; 8 (0,92 ÷ 2,44)	1,70; 5 (0,76 ÷ 2,36)
	К	3,85; 9 (2,49 ÷ 4,94)	6,20*; 4 (5,00 ÷ 7,67)	3,20; 4 (3,18 ÷ 3,21)
МДА нмоль/мг липидов	О	0,94; 9 (0,82 ÷ 1,21)	1,25*; 8 (0,97 ÷ 1,62)	0,88; 5 (0,72 ÷ 0,92)
	К	1,17; 8 (0,94 ÷ 1,80)	1,69*; 4 (1,21 ÷ 1,85)	1,37; 4 (1,11 ÷ 1,63)
СОД, мкМ НСТ- 1*10 ⁹ Эр/мин	О	22,7; 5 (21,2 ÷ 26,2)	16,8*; 7 (15,6 ÷ 19,4)	29,5; 5 (22,2 ÷ 33,2)
	К	27,8; 10 (22,8 ÷ 39,5)	18,4*; 4 (13,6 ÷ 23,6)	24,2; 4 (23,6 ÷ 25,9)

Исследование передней большеберцовой мышцы выявило ряд особенностей метаболизма ткани у собак при автоматическом удлинении с темпом distraction 3 мм/сут. Значительный интерес представляла динамика активности ферментов ответственных за энергообеспечение ткани – ЛДГ, КК и Г6ФДГ (рис. 1).

Так, если при удлинении 1 мм в сутки за 4 приема активность ЛДГ и КК на этапе distraction возрастала, а в период фиксации снижалась, то при удлинении 3 мм в сутки их уровень относительно нормы практически не изменялся при distraction и значительно возрастал на этапе фиксации. Из приведенных данных также необходимо обратить внимание на низкую активность ЛДГ и КК на этапе distraction у собак основной группы. Стоило ожидать, что с увеличением темпа удлинения активность этих ферментов, в ответ на растяжение, должна была компенсаторно увеличиваться, однако этого не наблюдалось. Оказалось, что реактивные изменения процессов энергетического метаболизма в ткани развивались только после снятия distractionных усилий, на этапе фиксации, когда в удлиняемой мышце животных данной группы отмечалось скачкообразное повышение активности ЛДГ и КК.

Особо стоит отметить изменение активности Г6ФДГ. В ткани животных основной группы в течение всего эксперимента она существенно превышала значения собак контрольной группы (рис. 1). Отмеченное увеличение Г6ФДГ свидетельствовало о значительной активации пентозофосфатного пути (ПФП) окисления углеводов в мышечной ткани собак первой группы, что, с одной стороны, согласно А. Лабори, можно расценивать как проявление активных пролиферативных процессов, происходящих в ткани [3], а с другой – рост активности пентозофосфатного пути окисления углеводов в условиях удлинения 3 мм в сутки мог иметь компенсаторный характер, связанный со снижением роли гликолитического пути окисления углеводов.

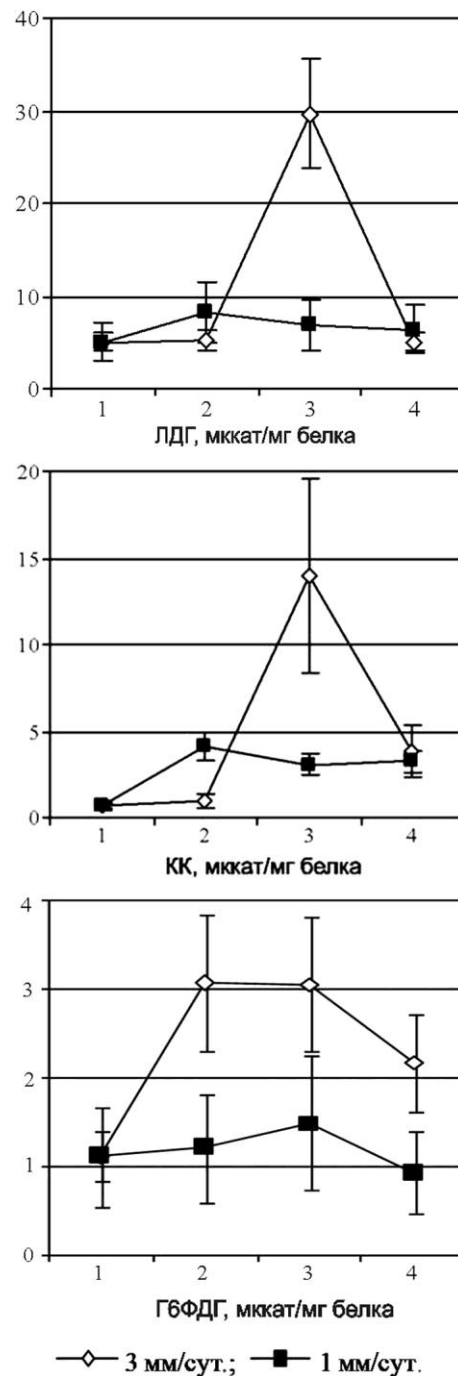


Рис. 1. Изменение активности ферментов энергетических циклов в передней большеберцовой мышце удлиняемой конечности у собак экспериментальных групп. Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс: 1 – интактные животные; 2 – конец distraction; 3 – 30-е сутки фиксации; 4 – месяц после снятия аппарата

Анализ содержания продуктов гликолиза и перекисного окисления в ткани собак экспериментальных групп показал, что в динамике эксперимента средние значения концентрации МК и МДА в передней большеберцовой мышце удлиняемой конечности между группами отличались незначительно (рис. 2). Отсутствие таких различий с учетом известного обстоятельства о способности продуктов гликолитического расщепления углеводов и ПОЛ ингибировать ак-

тивность АТФ-азы саркоплазматического ретикулула (что в конечном итоге выражается в снижении сократительных свойств ткани) [2, 8], объясняет клинические наблюдения. Так, в частности, к концу distraction у собак основной группы относительно контрольной группы отмечалось незначительное уменьшение объема мягких тканей в области бедра, в коленном суставе сгибание (пассивное) было в полном объеме, разгибание было ограничено. К 30-м суткам фиксации животные обеих серий наступали на конечность в стойке и при ходьбе, объем мягких тканей был незначительно снижен по сравнению с контралатеральной. В основной группе разгибание в коленном суставе приближалось к норме. Через месяц после снятия аппарата собаки основной группы полностью нагружали опери-

рованную конечность, атрофии мягких тканей не отмечено, амплитуда движений в коленном суставе была в норме, а в скакательном суставе сохранялась незначительная контрактура.

Исследования минеральной и органической фазы матрикса хряща и кости коленных суставов не выявили достоверных отличий между удлиняемой и контралатеральной конечностями у животных с автоматическим удлинением (табл. 3-4). Однако прослеживалась следующая тенденция: снижение минеральной фазы в губчатой костной ткани коленного сустава удлиняемой конечности и потеря органической компоненты гиалиновым хрящом. Такие изменения свидетельствовали о незначительных дистрофических изменениях в тканях коленного сустава в данных условиях удлинения.

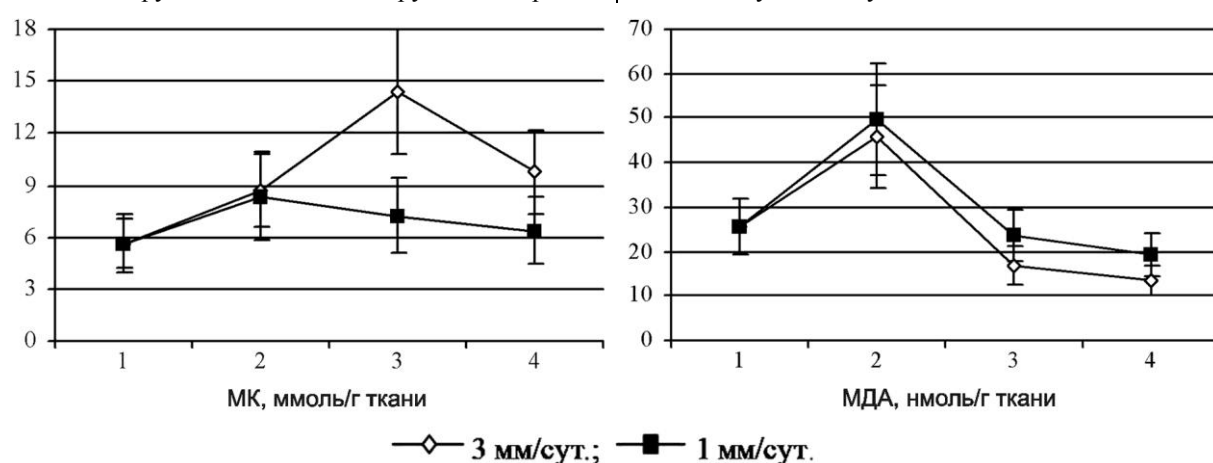


Рис. 2. Содержание продуктов гликолиза – МК и перекисного окисления липидов – МДА в передней большеберцовой мышце удлиняемой конечности у собак экспериментальных групп

Таблица 3

Показатели губчатой костной ткани суставов собак при удлинении голени в автоматическом режиме с темпом distraction 3 мм/сут.

	Удлиняемая конечность	Контралатеральная конечность
Ca ²⁺ , г/100 г сухой ткани	11,59 9,52÷17,52	12,33 8,53÷23,31
PO ₄ ³⁻ , г/100 г сухой ткани	5,38 2,20÷10,93	5,85 1,12÷9,47
[Ca ²⁺]*[PO ₄ ³⁻]	67,2 29,6÷191,5	89,9 9,6÷149,5
Гексозы, г/100 г сухой ткани	0,58 0,17÷1,39	0,57 0,17÷1,49

Таблица 4

Показатели хрящевой ткани суставов собак при удлинении голени в автоматическом режиме с темпом distraction 3 мм/сут.

	Удлиняемая конечность	Контралатеральная конечность
Вода, гр/100 г сырой ткани	71,2 66,4÷79,2	72,4 70,4÷72,6
Ca ²⁺ , г/100 г сухой ткани	1,60 0,44÷12,37	1,87 0,69÷2,22
Гексозы, г/100 г сухой ткани	3,47 0,87÷3,90	5,08 1,09÷11,34

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что характер остеорепаративных процессов при различных режимах удлинения – 3 мм/сут. и 1 мм/сут. был одинаков. Такое сходство репаративных реакций при столь значительных отличиях в режимах удлинения, на наш взгляд, является проявлением общебиологического закона стимуляции генеза тканей под действием дозированного растяжения, высказанного Г.А. Илизаровым. При удлинении темпом 3 мм/сут в основе проявления этой закономерности лежит эффект высокодетальной дистракции, получаемый при удлинении в автоматическом режиме. Однако на основании количественных изменений биохимических показателей сыворотки крови можно отметить более низкую остеобластическую активность к концу дистракции при удлинении темпом 3мм/сут. Так, активность ЩФ в контрольной группе к концу дистракции превышала дооперационные значения в 2,24 раза ($p=0,01$), а в опытной в 1,60 ($p=0,05$).

Существенным моментом при удлинении голени в автоматическом режиме с темпом 3 мм/сут. являлся относительно короткий срок дистракции, составлявший 10 суток (в отличие от 28 дней при удлинении 1 мм/сут.). В этих условиях в тканях суставного хряща удлинением конечности не успевали развиваться значительные дистрофические изменения.

Метаболические процессы в передней большеберцовой мышце конечности, удлиняемой при темпе 3 и 1 мм/сут., имели ряд различий: 1) у животных при удлинении голени темпом 3 мм/сутки активизировались резервные пути обмена ткани, и, в частности, пентозофосфатный путь окисления углеводов; 2) активация центральных метаболических путей скелетных мышц (гликолиз, креатинкиназная система) при удлинении 3 мм/сут. наблюдалась на этапе фиксации, тогда как в условиях дистракции темпом 1 мм/сутки она приходилась на период дистракции. Суммируя выше сказанное, можно заключить, что при повышении дистракционных усилий в скелетных мышцах удлиняемой конечности возрастает роль универсальных путей обмена, к которым можно отнести и пентозофосфатный путь. Универсальность последнего связана не только с его высокой энергетической эффективностью, но и с его существенной ролью в синтетических процессах (промежуточные метаболиты пентозофосфатного шунта – пентозы – используются для синтеза нуклеиновых кислот).

Таким образом, ведущими факторами, позволяющими тканям удлиняемой конечности адаптироваться к растяжению в условиях повышенного режима дистракции в 3 мм/сут., являются высокодетальный режим дистракции и короткие сроки удлинения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Векслер, Б. М. Характеристика системы перекисного окисления липидов крови в семьях больных ишемической болезнью сердца : дис... канд. биол. наук / Б. М. Векслер. – СПб., 1995. – 176 с.
2. Каган, В. Е. Ca^{2+} -АТФаза при перекисном окислении липидов в саркоплазматическом ретикулуме / В. Е. Каган, Ю. В. Архипенко, Ю. П. Козлов // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. – М. : Наука, 1982. – С. 50-58.
3. Лабори, А. Регуляция обменных процессов / А. Лабори. – М. : Медицина, 1970. – 384 с.
4. Леонтьев, В. К. Биохимические методы исследования в клинической и экспериментальной стоматологии / В. К. Леонтьев, Ю. А. Петрович. – Омск, 1976. – 44 с.
5. Методы биохимических исследований / под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – 272 с.
6. Попова, Л. А. Характеристика обращаемости ортопедических больных за специализированной помощью / Л. А. Попова // Материалы VI съезда травматологов-ортопедов СНГ. – Ярославль, 1993. – С. 27.
7. Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 62–68.
8. Тимофеев, А. А. Роль ПОЛ в изменении структуры Са-АТФазы СРР скелетных мышц при гиперхолестеринемии / А. А. Тимофеев, О. А. Азизова, Г. В. Чернышева // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. – 1985. – № 3. – С. 301-303.
9. Lower limb discrepancies. A epidemiological study / J. M. Guichet, J. M. Spivak, P. Trouilloud, P. M. Grammont // Clin. Orthop. - 1991. – No 272. – P. 235-241.

Рукопись поступила 18.12.06.