

Гистологические изменения передней большеберцовой мышцы при удлинении голени собак с повышенным суточным темпом дистракции различной дробности

Н.А. Щудло, М.М. Щудло, И.В. Борисова, Г.Н. Филимонова

Histological changes in the anterior tibial muscle for canine leg lengthening with the increased daily rate of different-division distraction

N.A. Shchudlo, M.M. Shchudlo, I.V. Borisova, G.N. Filimonova

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган
(директор — д. м. н. А. В. Губин)

Цель. Сопоставительный анализ гистологических изменений скелетной мышцы при удлинении голени собак автодистракцией с суточным темпом 3 мм за 120 и за 180 приёмов. **Материал и методы.** В опытах на 15 собаках изучены гистологические изменения передней большеберцовой мышцы при удлинении голени автодистрактором с суточным темпом 3 мм за 180 и 120 приёмов. **Результаты.** Установлено, что оба режима дистракции являются травматичными. Ведущие механизмы повреждения – микроинфаркты мышц с последующим очаговым заместительным фиброзом, дезинтеграция структур сократительного аппарата мионов, которая не сопровождается нарушением целостности сарколеммы и потому не вызывает тканевой (воспалительной) реакции – менее выражены при дистракции «3 мм за 180». **Заключение.** Обнаруженные в исследованных сериях опытов очаги острого ишемического некроза мышечных волокон (микроинфаркты мышц) не позволяют рекомендовать режимы «3 мм за 120» и «3 мм за 180» для применения в клинической практике. В перспективе необходим дальнейший поиск оптимального режима высокодробной дистракции с повышенным суточным темпом.

Ключевые слова: удлинение конечности, автоматическая дистракция, мышцы.

Purpose. Comparative analyzing histological changes in skeletal muscle for canine leg lengthening using autodistractor daily by 3 mm for 120 and 180 times. **Material and Methods.** The histological changes in the anterior tibial muscle studied in the experiments on 15 dogs for leg lengthening by an autodistractor with the daily rate of 3 mm for 180 and 120 times. **Results.** Both modes of distraction established to be traumatic. The leading mechanisms of injury – muscle microinfarction with further focal substitutionary fibrosis, the disintegration of myons' contractile apparatus structures not accompanied by sarcolemma integrity breach and thereby not causing tissue (inflammatory) reaction – less marked in case of “3 mm for 180 times” distraction. **Conclusion.** The foci of acute ischemic necrosis of muscle fibers revealed in the experimental series studied (muscle microinfarctions) don't allow recommending the modes of «3 mm for 120 times» and «3 mm for 180 times» to be used in clinical practice. Perspectively, the further search of the optimal mode of high-division distraction with increased daily rate should be made.

Keywords: limb lengthening, automatic distraction, muscles.

Функциональные результаты ортопедических операций по удлинению конечности методом чрескостного дистракционного остеосинтеза решающим образом зависят от адаптационно-пластических перестроек скелетных мышц в процессе дистракции и в отдалённом периоде.

Открытие Г.А. Илизаровым общебиологического свойства тканей отвечать на дозированное растяжение ростом и регенерацией [1] было подтверждено не только в фундаментальных исследованиях сотрудников РНЦ «ВТО», но и работах зарубежных исследователей. В частности, C.S. Day et al. [6], применяя бромдеоксиуридиновый тест как маркёр пролиферации и десмин – маркёр мышечных волокон, установили, что при удлинении голени кроликов происходит рост скелетных мышц, который реализуется пролиферацией и фузией миобластов. Однако только при очень низком суточном темпе дистракции – 0,4-0,7 мм [11] саркомерогенез не сопровождается признаками повреждения мышечных волокон, альтернативного воспаления и фиброза.

Для уменьшения травматизации тканей при растяжении академик Г.А. Илизаров предложил принцип дробной и высокодробной дистракции – разделение суточного темпа на несколько или несколько десятков приёмов (разовых удлинений). Последнее требовало применения автоматических дистракторов, которые были внедрены в РНЦ «ВТО» ещё в 80-е годы XX века [2]. В экспери-

ментальных исследованиях 90-х годов было установлено, что высокодробная дистракция (1 мм за 60 приёмов) улучшает условия остеогенеза и адаптации мягких тканей к удлинению конечности [3, 4, 5].

В эти же годы и несколько позже за рубежом исследовались режимы автоматической дистракции ещё более высокой дробности. Установлено, что удлинение голени кроликов в режиме 1 мм за 120 приёмов в отличие от ручной дистракции предотвращает повреждение хряща смежных суставов, нарушение проводимости и кровотока в большеберцовом нерве [7, 8]. J.S. Shilt et al. [9] удлинляли голень кроликов с темпом 1 мм в сутки за 1440 приёмов и 1 мм в день за 3 приёма. При гистологическом исследовании скелетных мышц не было выявлено разницы, но объём движений в скакательном суставе и соматосенсорные вызванные потенциалы были лучше в группе с высокодробной дистракцией.

P. Williams et al. [11], не применяя высокодробных режимов, исследовали степень атрофии и повреждения мышечных волокон при темпах дистракции 1,3 и 3 мм. Авторы установили, что при повышенном суточном темпе усиливается экспрессия неонатального миозина тяжёлых цепей – индикатора регенерации, хотя возрастает потеря объёма движений в суставах, усиливается мышечная атрофия и частота повреждений мышечных волокон.

Профессором В.И. Шевцовым была выдвинута идея исследования высокодробной дистракции с повы-

шенным суточным темпом, что продиктовано задачами клинической практики – необходимостью сокращения сроков и повышением эффективности лечения ортопедотравматологических больных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 15 собаках, которым в асептических условиях операционной под тиопенталовым внутривенным наркозом на правую голень накладывали аппарат Илизарова и нарушали целостность берцовых костей путем флексионной остеоклазии. Фиксацию костных фрагментов производили аппаратом Илизарова, состоящим из четырех опор. На 5 день после операции у всех опытных животных начинали дозированное удлинение правой голени с одинаковым суточным темпом – 3 мм в день, но в разных режимах: у животных 1 группы – за 180 приёмов, у животных 2 группы – за 120 приёмов. Через 10 дней distraction прекращали и костные фрагменты 30 дней фиксировали аппаратом до формирования корковой пластинки в диастазе, затем аппарат снимали и животных наблюдали еще в течение месяца. Часть животных вывели из опыта в конце периода distraction и в конце периода фиксации в аппарате. Эксперименты выполнены д.м.н. С.А. Ерофеевым и канд.вет. наук М.А. Степановым.

При проведении экспериментов соблюдали требования Министерства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник (Федеральный закон «О защите животных от жестокого обращения», принятый Государственной Думой 1 декабря 1999 г., «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» согласно приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.), а так-

же «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Выведение из опыта осуществляли передозировкой барбитуратов.

После эвтаназии для морфологических исследований забирали фрагменты передней большеберцовой мышцы. Изготавливали поперечные и продольные парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином-эозином по ван-Гизону и трёхцветным методом по Маскону. Часть материала заливали в эпоксидные смолы для изготовления полутонких срезов, окрашенных по Ontell и Weakley. Препараты изучали и оцифровывали, используя большие исследовательские микроскопы фирмы «Orton» (ФРГ) и АПК «Диаморф» (Россия), а также микроскоп Микромед-5 с телекамерой Myscope500M. Для количественных исследований использовали полноцветные цифровые изображения продольных и поперечных полутонких срезов. Определяли процентную долю мионов, дегенерировавших на протяжении, в общем объёме выборки из нескольких десятков мышечных волокон; рассчитывали индекс васкуляризации мышечных волокон. Результаты количественного анализа мышц экспериментальных животных сопоставляли с данными, полученными в аналогичных исследованиях мышц 3 интактных собак. Проверку статистических гипотез о различии проводили с применением теста Вилкоксона-Манна-Уитни и точного метода Фишера-Ирвина.

же «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Выведение из опыта осуществляли передозировкой барбитуратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

К концу distraction (срок опыта 15 дней) в микроциркуляторном русле мышц обеих групп животных выражены явления эритроцитарного стаза, обнаружено значительное количество пересокращённых контрактурно изменённых волокон. В группе «3 мм за 120 приёмов» мышечные волокна полностью утрачивают поперечную исчерченность, многие из них содержат по одиночке или группами расположенные аксиальные регенераторные ядра, но только единичные волокна инфильтрированы тучными клетками и макрофагами (рис. 1). У 2 собак из 3 этого срока, несмотря на полное разрушение контрактурного аппарата, мышечные волокна и микрососуды сохраняют анатомическую непрерывность, ещё у одной собаки во многих полях зрения определяются очаги кровоизлияний и разрывов пучков дистрофичных мышечных волокон, многоуровневые разрывы отдельных мышечных волокон, инфильтрация межфибриллярных пространств клетками воспалительного ряда (рис. 2). В группе «3 мм за 180 приёмов» большинство мышечных волокон сохраняет поперечную исчерченность. Нередки картины активации миосателлитов: увеличивается количество клеток, расположенных как обычно после цитотомии – группами (рис. 3, сверху). В то же время выявляются очаги массовой гибели мионов и деструктивно-репаративных изменений распределительных артерий

перимизия (рис. 3, внизу), артерий малого калибра и микрососудов мышцы. У животных обеих групп уже в это время увеличено количество миобластов и фибробластов в эндомизии, появляются депозиты коллагена.

Через 30 дней фиксации (срок опыта 45 дней) у животных обеих групп выражены утолщение перимизия и отдельных прослоек эндомизия, а также очаги заместительного фиброза эндомизия в участках массовой гибели мионов, где остаётся лишь незначительное количество резко атрофированных, гипертрофированных либо регенерирующих мышечных волокон. Такие очаги заместительного фиброза более выражены в группе 3 мм за 120 приёмов (рис. 4, сверху). Поперечная исчерченность мышечных волокон на этом сроке хорошо выражена в группе «3 мм за 180 приёмов» и частично восстанавливается в группе «3 мм за 120 приёмов». В обеих группах сохраняется значительное количество пересокращённых контрактурно изменённых волокон, некротизированных на протяжении.

Через 30 дней после снятия аппарата в группе «3 мм за 120 приёмов» нет мышечных волокон, некротизированных на протяжении, хотя встречаются участки их сегментарного некроза; выражены картины ремоделирования регистров поперечной исчерченности. В группе «3 мм за 180 приёмов» некротизированные на протяжении мышечные волокна малочисленны (рис. 5,

вверху слева), но регулярно встречаются пересокращённые контрактурно изменённые волокна (рис. 5, вверху справа) и волокна на разных стадиях сегментарного некроза (рис. 5, внизу). Уменьшается количество внутримышечных ядер, в участках сегментарного некроза регулярно встречаются регенераторные ядра (рис. 5, внизу справа). В сохранных пучках мышечных волокон (без признаков заместительного фиброза) восстанавливаются свойственные интактной мышце полигональные контуры профилей мышечных волокон и

их размерная вариативность.

При проведении количественных исследований было установлено, что в конце distraction доли мышечных волокон, некротизированных на протяжении, в исследуемых группах сопоставима. Через 30 дней фиксации она больше в группе «3 мм за 120», через 30 дней после снятия аппарата она уменьшается в обеих группах, причём в группе «3 мм за 120» до нуля (рис. 6) – в интактной мышце доля некротизированных волокон не превышает 1 %.

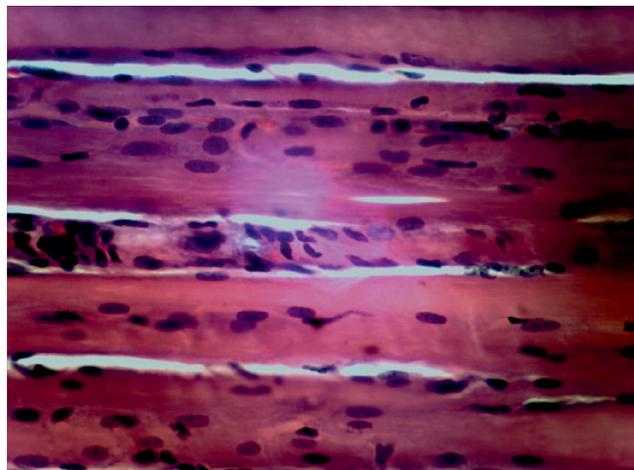
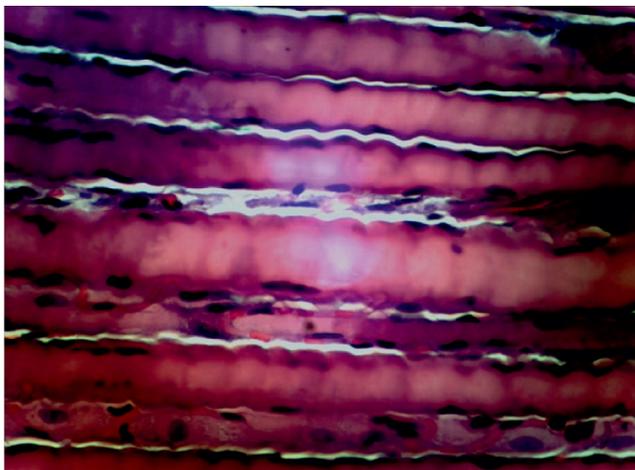


Рис. 1. Фрагменты продольных парафиновых срезов передней большеберцовой мышцы собаки группы «3 мм за 120 приёмов». Срок опыта 15 дней: до distraction 5 дней, distraction 10 дней. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение 500×

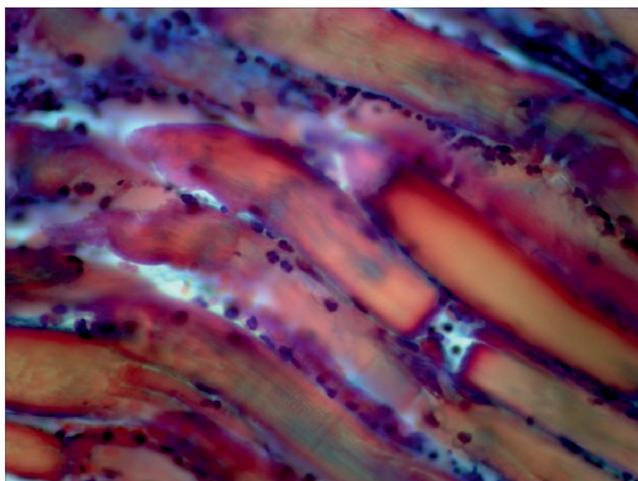
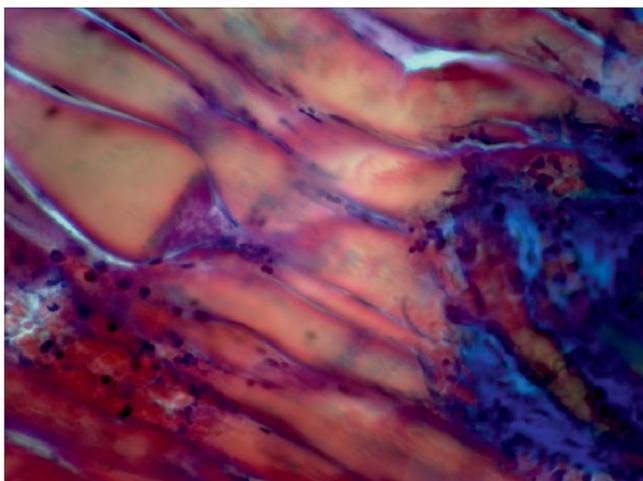
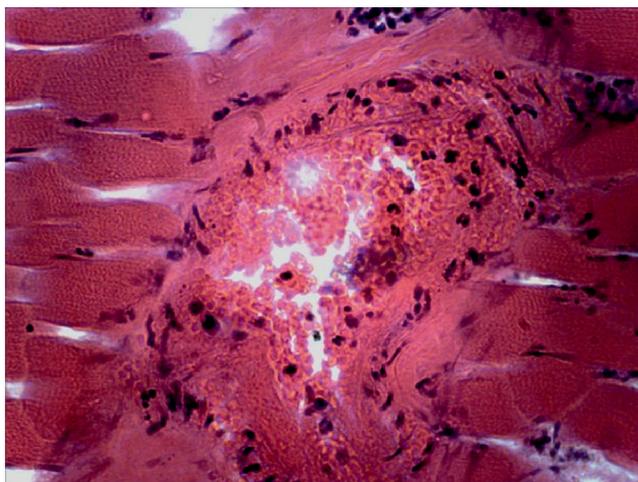
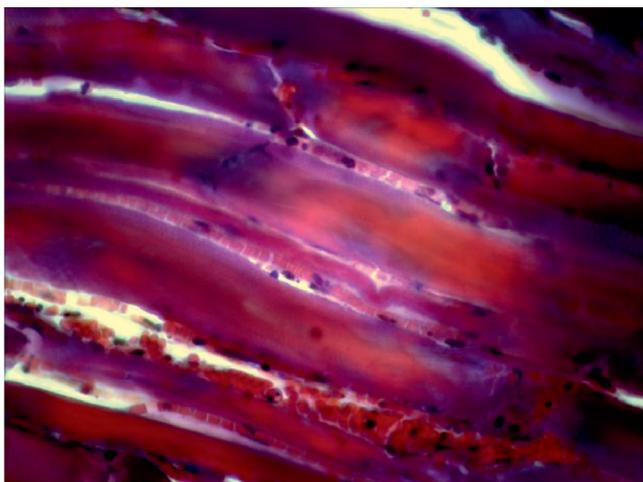


Рис. 2. Фрагменты продольных парафиновых срезов правой передней большеберцовой мышцы собаки группы «3 мм за 120». Срок опыта 15 дней: до distraction 5 дней, distraction 10 дней. Справа вверху – окраска гематоксилин-эозин, остальные поля зрения – Массон-трихром. Увеличение 400×

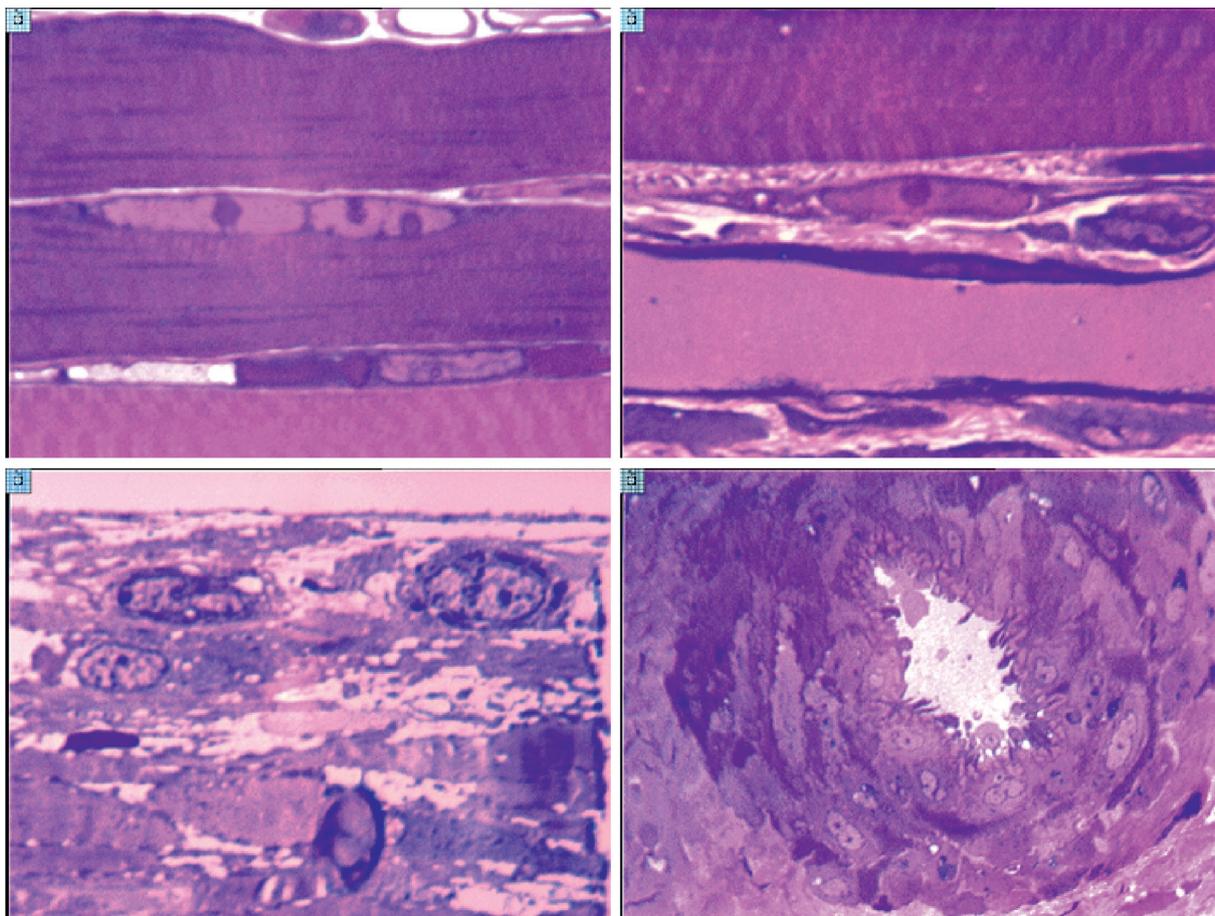


Рис. 3. Фрагменты продольных полутонких срезов правой передней большеберцовой мышцы собаки группы «3 мм за 180». Срок опыта 15 дней: до distraction 5 дней, distraction 10 дней. Окраска по Ortell. Увеличение 500×

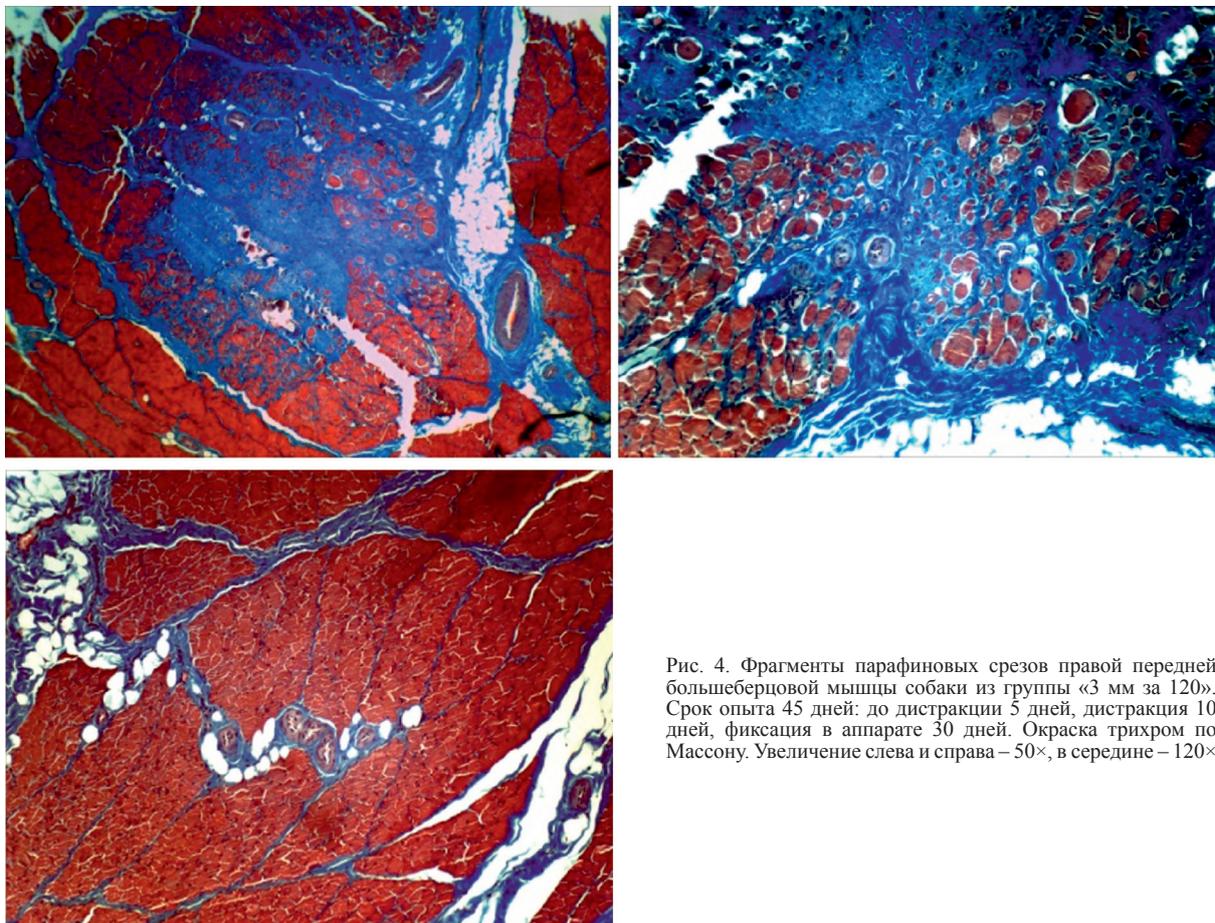


Рис. 4. Фрагменты парафиновых срезов правой передней большеберцовой мышцы собаки из группы «3 мм за 120». Срок опыта 45 дней: до distraction 5 дней, distraction 10 дней, фиксация в аппарате 30 дней. Окраска трихром по Массону. Увеличение слева и справа – 50×, в середине – 120×

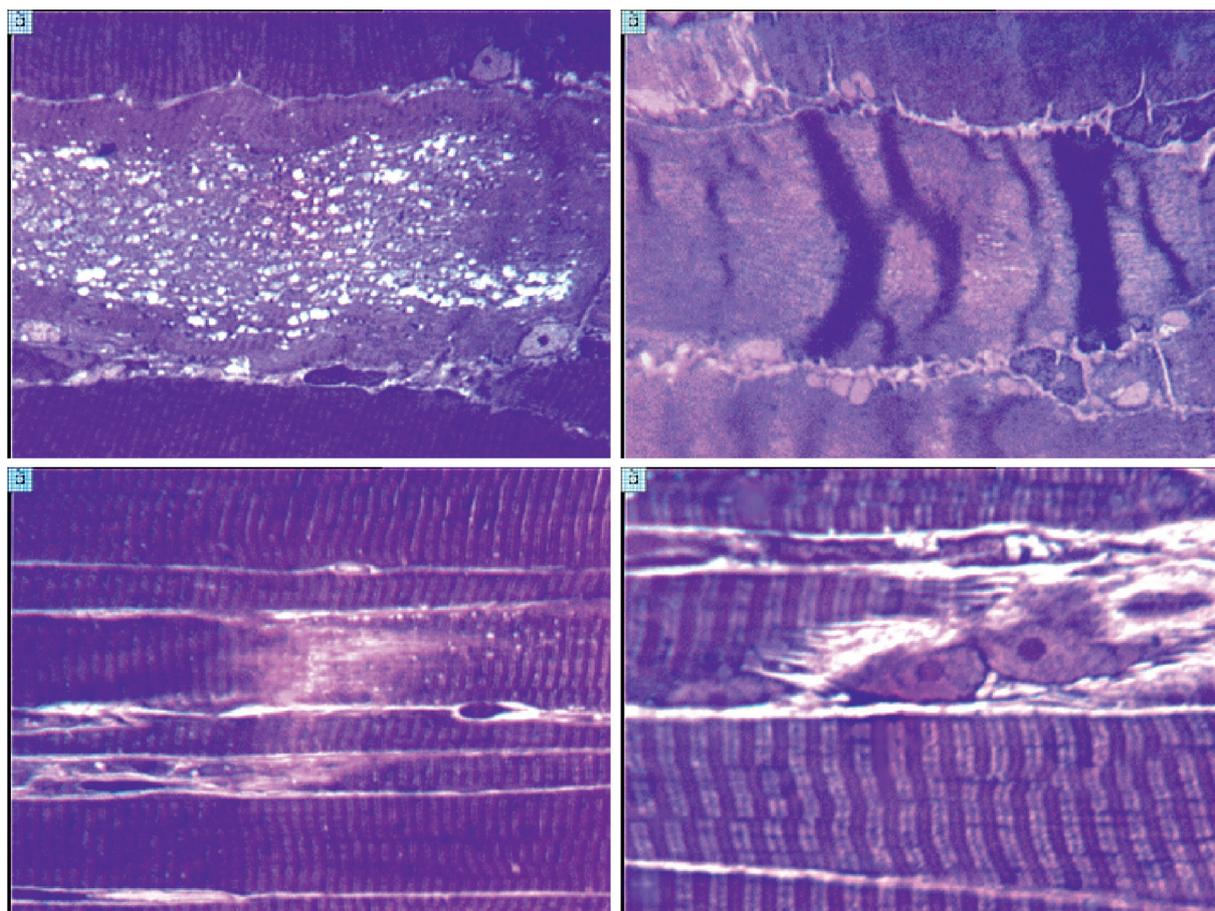


Рис. 5. Фрагменты продольных полутонких срезов правой передней большеберцовой мышцы собаки группы «3 мм за 180». Вверху – 30 дней фиксации, внизу – 30 дней без аппарата. Окраска по Оттелу. Вверху и внизу слева – увеличение 500×, внизу справа – увеличение 1250×

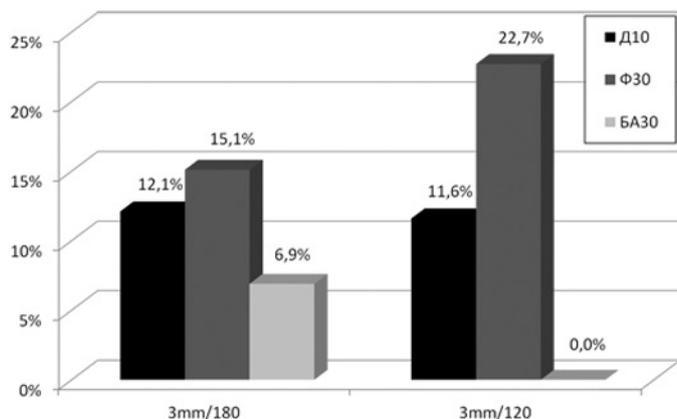


Рис. 6. Доля волокон, некротизированных на протяжении, на этапах эксперимента по удлинению с повышенным темпом при разной дробности distraction. Д10 – срок 10 дней distraction, Ф30 – 30 дней фиксации в аппарате, БА 30 – 30 дней после снятия аппарата

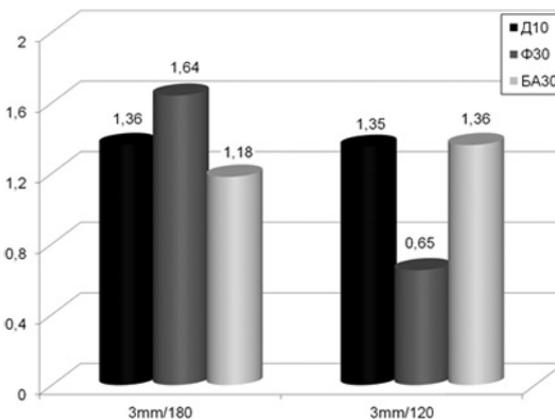


Рис. 7. Индекс васкуляризации на этапах эксперимента по удлинению с повышенным темпом при разной дробности distraction. Д10 – срок 10 дней distraction, Ф30 – 30 дней фиксации в аппарате, БА 30 – 30 дней после снятия аппарата

Индекс васкуляризации в конце distraction в обеих исследуемых группах не отличается от интактного. Через 30 дней фиксации он повышается на 20,5 % в группе «3 мм за 180» и снижается на 53,6 % в группе «3 мм за 120 приёмов». Через 30 дней после снятия аппарата в группе

«3 мм за 180» индекс васкуляризации ниже интактного на 15,7 %, а в группе «3 мм за 120» сопоставим с интактным. С учётом малого количества животных обнаруженные различия количественных параметров не удалось подтвердить статистически, и они расценены как тенденция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженные в исследованных сериях опытов очаги острого ишемического некроза мышечных волокон (микроинфаркты мышц) не позволяют рекомендовать режимы «3 мм за 120» и «3 мм за 180» для применения в клинической практике. Однако выполненное исследование позволило сформировать ранее неизвестные

представления о структурной адаптивности и пластичности скелетной мышечной ткани. В пучках мышечных волокон с сохранной васкуляризацией преобладающая реакция мионов на distraction в режиме 3 мм за 120 приёмов – дезинтеграция структур сократительного аппарата, которая не сопровождается нарушением целост-

ности сарколеммы и потому не вызывает тканевой (воспалительной) реакции. После прекращения distraction такие мионы остаются жизнеспособными, и постепенно в них происходит ремоделирование миофибрилл. Часть мышечных волокон подвергается аналогичным перестройкам и при режиме «3 мм за 180 приёмов». Комплекс описательных признаков и количественных параметров свидетельствует, что distraction в режиме «3 мм за 180 приёмов» носит более щадящий характер по сравнению с «3 мм за 120 приёмов» как по отношению к мышечным

волокон, так и сосудам мышц. Кроме того, при удлинении в режиме «3 мм за 180 приёмов» более выражены признаки активации миосателлитов на этапе distraction. Быстрое увеличение количества ядерного материала позволяет реализовать опережающий эффект вставочного роста миофибрилл и сохранить сократительный аппарат в большинстве мышечных волокон.

Дальнейший поиск оптимального режима distraction с повышенным суточным темпом представляется перспективным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диплом № 355 (СССР) Общебиологическое свойство тканей отвечать на дозированное растяжение ростом и регенерацией (эффект Илизарова) / Г. А. Илизаров (СССР). № ОТ. 11271 ; заявл. 25.12.1985 ; опубл. 23.04.1989, Бюл. № 15. 1 с.
Discovery No. 11271. Pat. 355, USSR. Obshchebiologicheskoe svoystvo tkanei otvechat' na dozirovannoe rastiashenie rostom i regeneratsiei (effekt Ilizarova) [The general biologic property of tissues to respond by growth and regeneration to graduated tension stress]. Ilizarov GA. Zaiavl. 25.12.1985; opubl. 23.04.1989. Biul. № 15. 1 s.
2. Возможности автоматического управления процессом distraction / Г. А. Илизаров, И. А. Катаев, А. А. Шрейнер, В. М. Быков, И. И. Мартель // Лечение ортопедо-травматологических больных в стационаре и поликлинике методом чрескостного остеосинтеза, разработанным в КНИИЭКОТ : тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. Курган, 1982. Ч. 2. С. 21-23.
Ilizarov GA, Kataev IA, Shreiner AA, Bykov VM, Martel' II. Vozmozhnosti avtomaticheskogo upravleniia protsessom distraktsii [The possibility of automatic controlling the process of distraction]. In: Lechenie ortopedo-travmatologicheskikh bol'nykh v stacionare i poliklinike metodom chreskostnogo osteosinteza, razrabotannym v KNIIEKOT: tez. dokl. Vsesoiuz. nauch.-prakt. konf. Kurgan, 1982 (Pt. 2):21-23.
3. Значение ритма distraction для реализации «эффекта Илизарова» в нервах удлиняемого сегмента конечности. / Г. А. Илизаров, М. М. Щудло, Н. П. Карымов, М. С. Сайфутдинов // Гений ортопедии. 1995. № 1. С. 12-18.
Ilizarov GA, Shchudlo MM, Karymov NR, Saifutdinov MS. Znachenie ritma distraktsii dlia realizatsii «effekta Ilizarova» v nervakh udliniaemogo segmenta konechnosti [Importance of the rhythm of distraction for realization of "the Ilizarov effect" in nerves of the elongated limb segment. Genij Ortop. 1995;(1):12-18.
4. Зависимость репаративной регенерации кости и функциональное состояние удлиняемой конечности от дробности distraction (экспериментальное исследование) / Г. А. Илизаров, С. А. Ерофеев, А. А. Шрейнер, А. М. Чиркова, Г. И. Шевченко // Гений ортопедии. 1995. № 1. С. 8-12.
Ilizarov GA, Yerofeyev SA, Shreiner AA, Chirkova AM, Shevchenko GI. Zavisimost' reparativnoi regeneratsii kosti i funktsional'noe sostoianie udliniaemoi konechnosti ot drobnosti distraktsii (eksperimental'noe issledovanie) [Dependence of bone reparative regeneration and functional condition of the elongated limb on distraction division (An experimental study)]. Genij Ortop. 1995;(1):8-12.
5. Состояние сосудистого бассейна мышц конечности при разных режимах удлинения / В. И. Шевцов, С. Н. Асонова, А. Д. Наумов, С. А. Ерофеев, Н. И. Гордиевских, Л. С. Кузнецова, Г. Н. Филимонова // Гений ортопедии. 1997. № 2. С. 5-11.
Shevtsov VI, Asonova SN, Naumov AD, Yerofeyev SA, Gordievskikh NI, Kuznetsova LS, Filimonova GN. Sostoianie sosudistogo basseina myshts konechnosti pri raznykh rezhimakh udlineniia [Status of vascular pool in limb muscles during different modes of elongation (A morphofunctional study)]. Genij Ortop. 1997;(2):5-11.
6. Day C.S. et al. Limb lengthening promotes muscle growth. / C.S. Day, M.S. Moreland, S.S. Floyd, J. Huard // J. Orthop. Res. 1997. Vol. 15, No. 2. – P. 227–234.
Day CS, Moreland MS, Floyd SS, Huard J. Limb lengthening promotes muscle growth. J Orthop Res. 1997;15(2):227–234.
7. Mizumoto Y. et al. Tibial nerve function during tibial lengthening. Measurement of nerve conduction and blood flow in rabbits / Y. Mizumoto, H. Mizuta, E. Nakamura, K. Takagi // Acta Orthop. Scand. – 1995. – Vol. 66, No. 2. – P. 275-277.
Mizumoto Y, Mizuta H, Nakamura E, Takagi K. Tibial nerve function during tibial lengthening. Measurement of nerve conduction and blood flow in rabbits. Acta Orthop Scand. 1995;66(2):275-277.
8. Mizuta H. et al. Effect of distraction frequency on bone formation during bone lengthening / H. Mizuta, E. Nakamura, Y. Mizumoto, S. Kudo, K. Takagi // Acta Orthop.Scand. 2003. – Vol. 74, No. 6. – P. 709-713.
Mizuta H, Nakamura E, Mizumoto Y, Kudo S, Takagi K. Effect of distraction frequency on bone formation during bone lengthening. Acta Orthop Scand. 2003;74(6):709-713.
9. Shilt J.S., Deeney V.F., Quinn C.O. The effect of increased distraction frequency on soft tissues during limb lengthening in an animal model // J. Pediatr. Orthop. 2000. – Vol. 20, No. 2. – P. 146-150.
Shilt JS, Deeney VF, Quinn CO. The effect of increased distraction frequency on soft tissues during limb lengthening in an animal model. J Pediatr Orthop. 2000;20(2):146-150.
10. Simpson A.H.R.W. et al. The response of muscle to leg lengthening. / A.H.R.W. Simpson, P.E. Williams, P.E. Kyberd, G. Goldspink, J. Kenwright // J. Bone Joint Surg. (Br). 1995. – Vol. 77, No. 4. – P. 630-636.
Simpson AH, Williams PE, Kyberd PE, Goldspink G, Kenwright E. The response of muscle to leg lengthening. J Bone Joint Surg (Br). 1995 Jul;77(4):630-636.
11. Williams P. et al. Muscle fibre damage and regeneration resulting from surgical limb distraction / P. Williams, H. Simpson, J. Kenwright, G. Goldspink // Cells Tissues Organs. 2001. – Vol. 169, No. 4. – P. 395-400.
Williams P, Simpson H, Kenwright J, Goldspink G. Muscle fibre damage and regeneration resulting from surgical limb distraction. Cells Tissues Organs. 2001;169(4):395-400.

Рукопись поступила 17.01.2012.

Сведения об авторах:

1. Щудло Наталья Анатольевна – ФГБУ "Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова" Минздрава России, заведующая клинико-экспериментальной лабораторией реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти, д. м. н.
2. Щудло Михаил Моисеевич – ФГБУ "Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова" Минздрава России, в. н. с. клинико-экспериментальной лаборатории реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти, д. м. н.; e-mail: m.m.sch@mail.ru.
3. Борисова Ирина Владимировна – ФГБУ РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России, клинико-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти, научный сотрудник, к. б. н.
4. Филимонова Галина Николаевна – ФГБУ РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России, лаборатория морфологии, старший научный сотрудник, к. б. н.