

© Группа авторов, 2002

Результаты стереометрического анализа состояния передней большеберцовой мышцы при distractionном, последовательном distraction-компрессионном остеосинтезе голени, в том числе с применением «Орозина» (экспериментально-морфологическое исследование)

А.В. Попков, Г.Н. Филимонова, Д.А. Попков, С.А. Ерофеев

The results of stereometric analysis of the anterior tibial muscle condition for distraction, consecutive distraction-compression osteosynthesis of the leg including that with "Orozine" use (Experimental-and-morphologic study)

A.V. Popkov, G.N. Filimonova, D.A. Popkov, 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)

В эксперименте на 22 взрослых собаках с использованием гисто- и морфометрических методов исследования дана сопоставительная характеристика состояния передней большеберцовой мышцы при удлинении голени в условиях distractionного и последовательного distraction-компрессионного остеосинтеза, в том числе с применением "Орозина" на протяжении всего эксперимента и в период фиксации. Показано, что одномоментная компрессия distractionного регенерата с применением "Орозина" стимулирует преимущественное развитие мышечных волокон и редукцию соединительно-тканых элементов, а также ангиогенный и вазодилатирующий эффекты. При постоянном введении "Орозина" по сравнению с серией, где препарат использовался лишь в период фиксации, отмечены более высокая васкуляризация и лучший гематканевый обмен, а также меньший объем соединительной ткани и больший — мышечных волокон.

Ключевые слова: собаки, эксперимент, передняя большеберцовая мышца, последовательный distraction-компрессионный остеосинтез, "Орозин", стереометрический анализ.

Comparative characteristic of the anterior tibial muscle condition is demonstrated during experimental leg lengthening by distraction osteosynthesis and consecutive distraction-compression osteosynthesis, including that with "Orozine" use throughout the experiment and during fixation, in 22 adults dogs using histo- and morphometric methods of study. It is shown that acute compression of distraction regenerated bone using "Orozine" stimulates angiogenic and vasodilating effects, as well as preferential development of muscular fibers and reduction of connective elements. In case of "Orozine" infusion higher vascularization and better hema-tissue metabolism and also smaller volume of connective tissue and larger one of muscular fibers are noted constantly in comparison with the series, in which the preparation was only used in the period of fixation.

Keywords: dogs, experiment, anterior tibial muscle, consecutive distraction-compression osteosynthesis, "Orozine", stereometric analysis.

Теоретические и клинические исследования distractionного остеосинтеза направлены на совершенствование технологии удлинения конечности с целью сокращения сроков реабилитации больных. Для ускорения процесса удлинения конечности разработаны способы билочного и полисегментарного distractionного остеосинтеза, это позволило сократить период distraction в 1,5-2 раза. В.И. Стецулой в 1965 году было установлено, что первичное костное сращение отломков при компрессионном чрескостном остеосинтезе формируется в короткие сроки, совпадающие с минимальной продолжи-

тельностью репаративного цикла [5]. Для стимуляции репаративного процесса при удлинении конечностей В.И. Шевцов и А.В. Попков предложили способ, основанный на одномоментной компрессии регенерата по окончании distraction [6, 7].

Наряду с компрессией регенерата происходит релаксация удлинённых параоссальных тканей, в частности, мышц. Применение белкового препарата "Орозин" (α 1-кислый гликопротеин - орозомукоид), который в условиях травм и воспалительных процессов различного генеза способен предотвращать вторичные деструктивные

процессы, обеспечивает поддержание нормальной микроциркуляции в зоне повреждения [3]. Цель данной работы - сравнительное гистологическое и морфометрическое исследование

большеберцовой мышцы в эксперименте с компрессией дистракционного костного регенерата, в том числе с применением "Орозина" и в условиях дистракционного остеосинтеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служила передняя большеберцовая мышца 22 взрослых беспородных собак. Из них 3 интактных, остальным через 5 дней после закрытой флекссионной остеоклазии костей голени начинали дистракцию с темпом 1 мм за 4 приема в день (по 0,25мм). В I серии (6 животных) дистракционный остеосинтез (ДОС) осуществляли в течение 28 дней, мышцу исследовали в конце дистракции, через месяц фиксации и месяц после снятия аппарата. Во II-й (6), III (4) и в IV (3 собаки) сериях эксперимента после 35 дней дистракции регенерат подвергали компрессии с усилием в $13,1 \pm 0,96$ кгс, что соответствовало напряжению компрессии $6,01 \pm 0,70$ кгс/см². После компрессии диастаз уменьшился в среднем на $4,9 \pm 0,48$ мм, и его высота равнялась $29,3 \pm 0,5$ мм, что составило в среднем $14,9 \pm 0,36\%$ от исходной длины голени.

В III серии животным вводили препарат «Орозин», содержащий 95% очищенного орозомукоида сыворотки человека и 5% альбумина. Препарат вводился внутривенно за 5 часов до компрессии, через 18 часов после нее и на 5-е сутки. Однократная доза введения – 1,2 г сухого препарата в разведении на 10 мл физиологического раствора.

В IV серии животным на протяжении периода дистракции каждые 7 дней вводили препарат «Орозин», а также за 5 часов до компрессии, через 18 часов после нее и на 5-е сутки фиксации в аналогичных дозировках.

Исследования проводили через 15-27 дней фиксации. В поперечных криостатных срезах (10-12 мкм) исследуемой мышцы выявляли активность миозиновой АТФ-азы по Padayula, Herman в модификации З. Лойда [1]. Проекции

поперечных срезов мышцы, видимые на матовом экране "Визопана" при увеличении $\times 480$, совмещали с тестовой решеткой коротких отрезков: $P_t = 156$ - число тестовых точек, $L_t = 78$ - число тестовых отрезков, $L_t = 78$ см - длина тестовой линии. Определяли первичные параметры: относительный объем микрососудов, мышечных волокон и соединительной ткани в 1 мм³ мышц (объемная плотность структуры) $V_{vi} = P_i/P_t$, где P_i - число тестовых точек, попавших на структуру; относительную площадь поверхности мышечных волокон и микрососудов в 1 мм³ мышц (поверхностная плотность структуры) $S_{vi} = 2C_i/L_t$, где C_i - число пересечений структуры с тестовыми отрезками, L_t - длина тестовой линии; численную плотность мышечных волокон и микрососудов в 1 мм³ мышцы $N_{Ai} = N_i \times 17,1$ где N_i - количество структур в поле зрения среза, 17,1 - коэффициент данной тестовой решетки. По известным формулам [5] рассчитывали вторичные параметры: отношение численной плотности микрососудов к численной плотности мышечных волокон - видовая константа, оценивающая васкуляризацию мышцы и соответствующую оксигенацию; отношение поверхностной плотности микрососудов к поверхностной плотности мышечных волокон - площадь гематканевой диффузии ($S_{диф.}$), радиус цилиндра мышечного волокна, снабжающегося одним капилляром путем диффузии ($R_{диф.}$). Статистический анализ производили методом вариационной статистики после предварительного тестирования выборок на нормальность распределения, достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Визуальный сравнительный анализ гистохимических препаратов передней большеберцовой мышцы в исследуемых сериях выявил следующее. Через 35 дней дистракции во II серии эксперимента отмечены гораздо более мелкие мышечные волокна и многочисленные расширенные микрососуды, соединительно-тканые прослойки значительнее, чем через 28 дней дистракции в первой серии (рис. 1а). Очевидно, до-

полнительные 9 дней удлинения голени приводят к столь значительному истончению мионов и повышению доли стромальных элементов в исследуемой мышце. В конце периода фиксации более мелкие мышечные волокна второй серии сохранены (рис. 1б), через месяц после снятия аппарата визуальное различие между сериями нивелируется (рис. 1в).

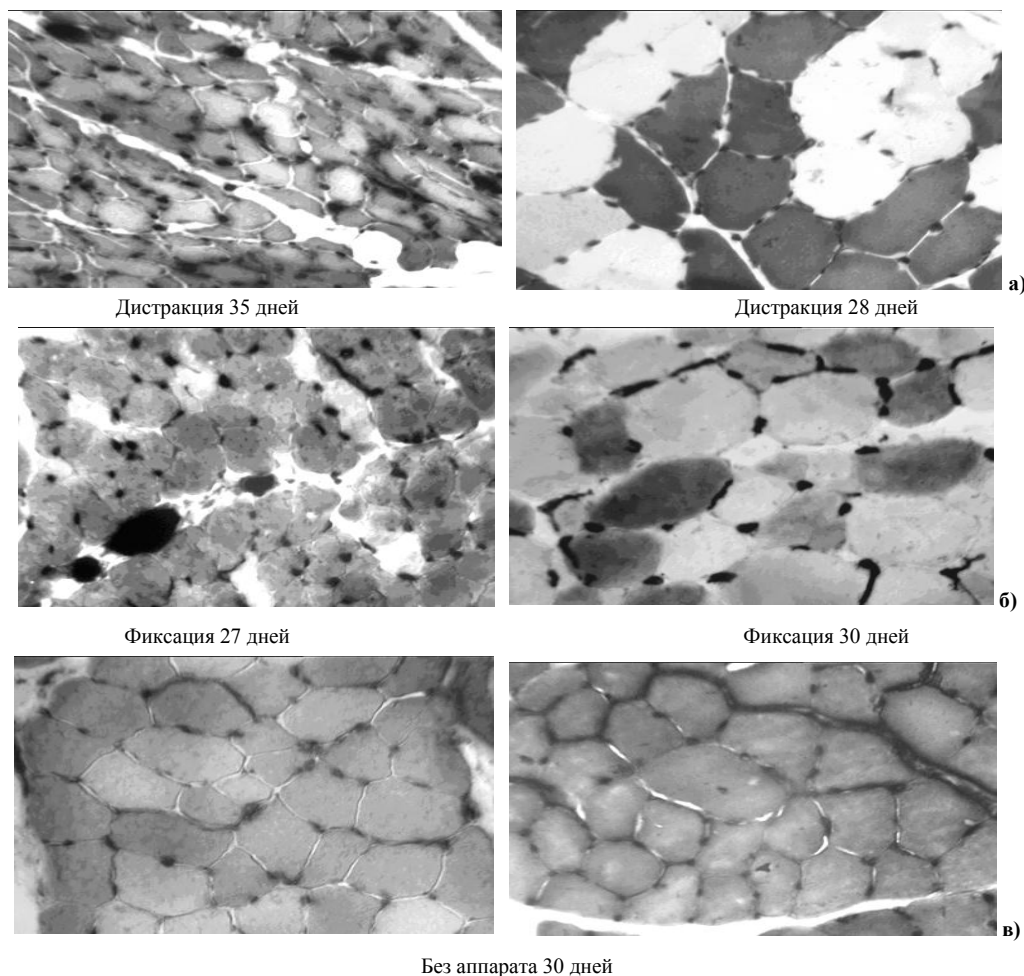
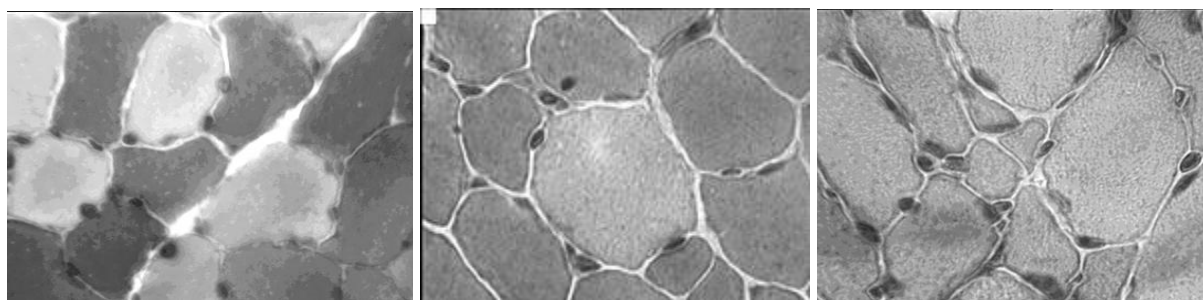


Рис. 1. Поперечные криостатные срезы передней большеберцовой мышцы при distractionно-компрессионном остеосинтезе и при distractionном остеосинтезе: а) в конце distraction, б) в конце фиксации, в) через месяц после снятия аппарата. Реакция на активность миозиновой АТФ-азы по Padycula, German. Увеличение Об. x16, Ок.12,5.

Исследуемая мышца в III и IV экспериментальных сериях с применением "Орозина" морфологически отличается от мышцы II серии. В IV серии при регулярном введении орозомукоида через 15 дней фиксации в случае №2007 мышечные волокна кровоснабжаются многочисленными расширенными, иногда с видимым просветом, микрососудами, в III серии визуальное – сосуды меньших диаметров (рис. 2а). Через 27 дней фиксации некоторая разница между III и IV сериями также сохраняется, микрососудов становится меньше, соответственно больший объем принадлежит мышечным волокнам, в IV серии вазодилатирующие сосуды встречаются в меньших количествах по сравнению с предыдущим сроком, соединительно-тканые прослойки в обеих сериях истончаются (рис. 2б).

При сравнительном количественном анализе первых двух серий эксперимента установлено, что отношение микрососуд/мышечное волокно в конце distraction в 1,7 раза выше ($P<0,001$) во второй серии (рис. 3). Этот параметр оценивает васкуляризацию мышц, снабжение их кислородом, а также является показателем процессов роста при изменении числа мионов и микрососу-

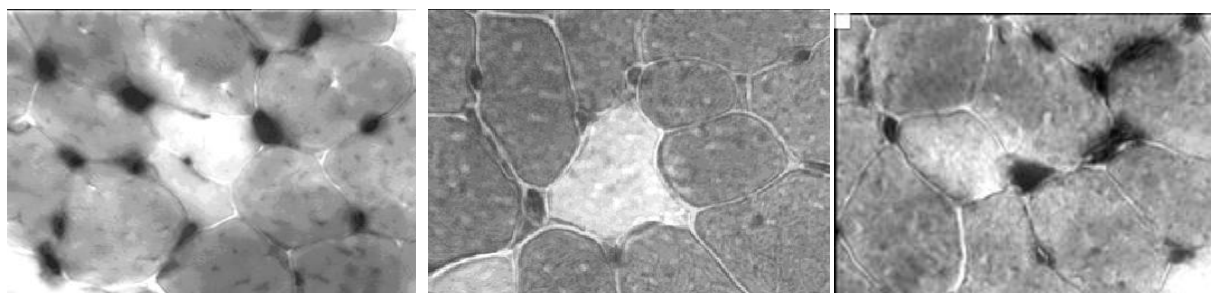
дов. Численная плотность мышечных волокон и микрососудов (рис. 4, 5) во II серии выше в 3,9 и в 2,3 раза соответственно ($P<0,001$), чем в I серии. Как уже отмечалось, дополнительные 7 дней distraction во II серии приводят неизбежно к истончению мионов и, возможно, доля новообразованных волокон и микрососудов также более значительна, чем через 28 дней удлинения голени в I серии. Но так как во II серии численность мионов возрастает более значимо, чем микрососудов, то на одно волокно приходится 2,07, а в I серии - 1,19 микрососудов (рис. 3). При этом радиус цилиндра мышечного волокна, снабжающегося одним капилляром путем диффузии, во II серии в 1,5 раза ($P<0,001$), а площадь гематканевой диффузии в 1,2 раза ниже, чем в I-й (рис. 6, 7). Относительный объем и площадь поверхности микрососудистого русла через 35 дней distraction во II серии в 1,2 ($P<0,01$) и в 1,4 ($P<0,001$) раза выше, чем через 28 дней удлинения в I серии (рис. 8, 9). Для сравниваемых серий характерно, что объемная плотность соединительно-тканых элементов во II серии в 1,6 раза выше ($P<0,001$), а мышечных волокон - в 1,1 раза ($P<0,001$) ниже, чем в I-й (рис. 11, 10).



№ 1244

№ 2005
а)

№ 2007



№ 1253

№ 1435
б)

№ 2113

II серия эксперимента
(без "Орозина")

III серия эксперимента
("Орозин" в периоде фиксации)

IV серия эксперимента
("Орозин" постоянно)

Рис. 2. Передняя большеберцовая мышца при дистракционно-компрессионном остеосинтезе: а) через 15 дней фиксации; б) через 27 дней фиксации. Реакция на активность миозиновой АТФ-азы по Paducula, German. Увеличение Об. 40, Ок.12,5.

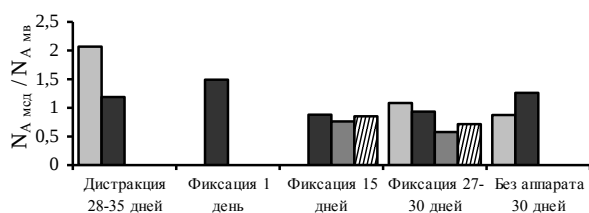


Рис. 3. Динамика васкуляризации передней большеберцовой мышцы.

Обозначения к рис. 3 - 11

- ДОС
- ДКОС
- ▨ ДКОС, "Орозин" в период фиксации
- ▤ ДКОС, "Орозин" постоянно

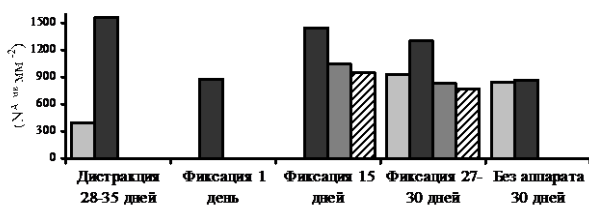


Рис. 4. Динамика численной плотности мышечных волокон.

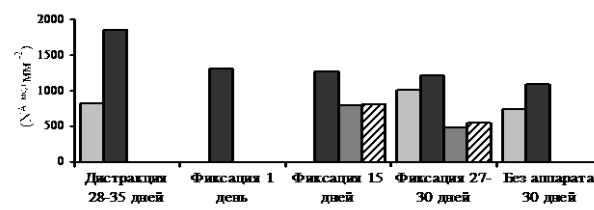


Рис. 5. Динамика численной плотности микрососудов.

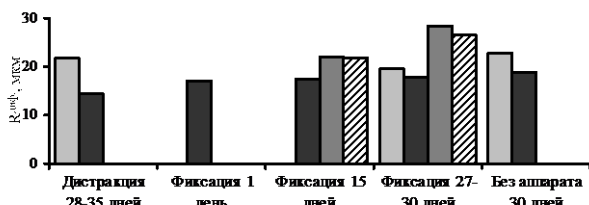


Рис. 6. Динамика радиуса диффузионного цилиндра, мкм.

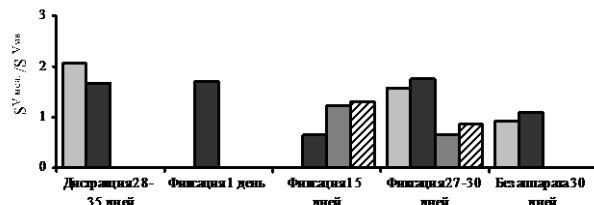


Рис. 7. Динамика площади гематканевой диффузии.

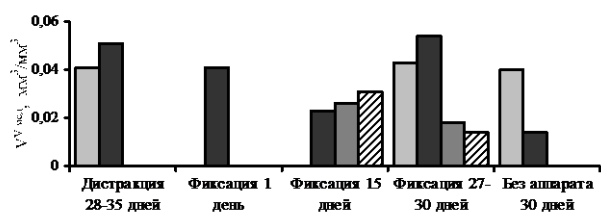


Рис. 8. Динамика объемной плотности микрососудов.

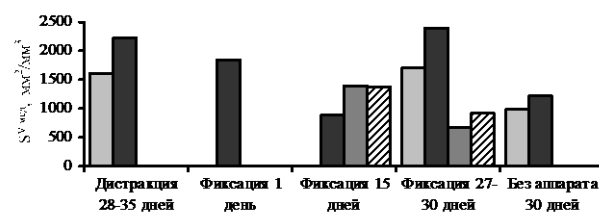


Рис. 9. Динамика поверхностной плотности микрососудов.

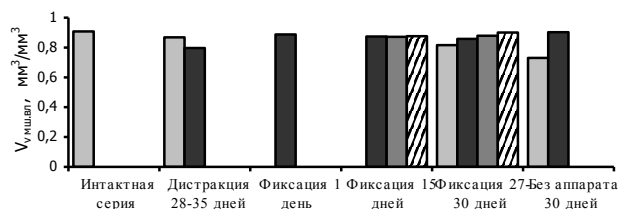


Рис. 10. Динамика объемной плотности мышечных волокон.

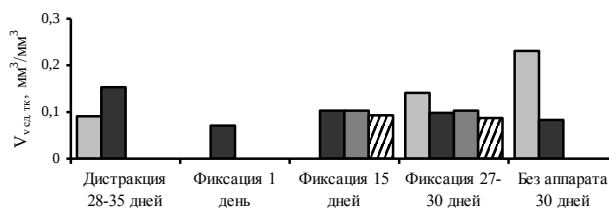


Рис. 11. Динамика объемной плотности эндомизия.

Через 1 день фиксации голени в аппарате, после компрессии регенерата, значения всех первичных стереометрических параметров передней большеберцовой мышцы снижаются относительно последнего дня дистракции, относительный же объем мионов возрастает до 111% (рис. 10), также несколько улучшается васкуляризация и гематканевый обмен (рис. 7). Во II серии в динамике по срокам эксперимента численная плотность микрососудов снижается, оставаясь относительно высокой через месяц после снятия аппарата. При этом число мышечных волокон в 1 мм³ тестируемой мышцы снижается более значимо, поэтому васкуляризация мышцы в серии с компрессией регенерата по окончании эксперимента остается достаточно высокой по сравнению с дистракционным остеосинтезом (рис. 3).

Сравнительный анализ II-й, III-й и IV-й серий эксперимента позволил выявить отличия в зависимости от степени использования препарата "Орозин". Через 15 дней фиксации основной стереометрический параметр - отношение микрососуд/мышечное волокно во всех трех экспериментальных сериях различается незначительно, но выше во II серии и наименьший - в III-й (рис. 3). Численная плотность мышечных волокон и микрососудов (рис. 4, 5) во II серии выше в 1,45 и в 1,6 раза ($P < 0,001$), чем в III-й и IV-й сериях, соответственно, радиус диффузионного цилиндра в сериях с применением "Орозина" в 1,3 раза ($P < 0,001$) больше, чем во второй (рис. 6). При этом относительный объем микроциркуляторного русла достоверно выше в IV серии в 1,3 раза ($P < 0,05$), чем во II-й (рис. 8). Также значительно выше (в 1,6 раза) поверхностная плотность микрососудов в III-й и IV-й сериях эксперимента, составив 160% ($P < 0,001$) от значения данного параметра во II-й серии (рис. 9). Следовательно, микрососуды в серии без использования "Орозина" многочисленны, но меньшего диаметра. Вероятно, применение дан-

ного препарата, особенно постоянно на протяжении всего эксперимента, не имея значительного ангиогенного эффекта, стимулирует перекалировку сосудов микроциркуляторного русла, их вазодилатацию и, соответственно, повышение их площади поверхности и улучшение гематканевого обмена. Это подтверждено вторичным параметром, оценивающим площадь гематканевой диффузии, который выше в 2,0 раза в IV серии и в 1,9 раза в III-й по сравнению со II серией эксперимента (рис. 7). Объемная плотность эндомизия (рис. 11) через 15 дней фиксации в IV серии достоверно ниже, что также является показателем лучшего функционального состояния мышцы при использовании орозомукоида.

В конце периода фиксации наилучшая васкуляризация исследуемой мышцы зарегистрирована во II серии эксперимента (в 1,2 раза выше, чем в I-й) и наименьшая - в III серии (рис. 3). При дистракционном остеосинтезе относительно высокая васкуляризация мышцы обусловлена меньшим в 1,4 раза ($P < 0,001$) числом мышечных волокон и лишь в 1,2 раза ($P < 0,001$) меньшим числом микрососудов (относительно II серии) (рис. 4, 5). Различия, подобные численной плотности микрососудов, отмечены также для объемной и поверхностной их плотности (рис. 8, 9). В сериях, где применяли "Орозин", площадь гематканевой диффузии уменьшается относительно предыдущего срока эксперимента в 1,9 раза для III серии и в 1,5 - для IV, составив 37% и 49% соответственно от значения II серии (рис. 7). Васкуляризация мышцы в этих сериях эксперимента значительно ниже, чем в первых двух сериях, но при сравнении между собой отмечена большая (в 1,2 раза) васкуляризация в IV серии - при постоянном использовании препарата. Снижение васкуляризации в III и IV сериях относительно предыдущего срока эксперимента обусловлено меньшей (в 2,5 раза) ($P < 0,001$) численной плотностью микрососудов

и лишь в 1,6 раза ($P<0,001$) меньшим числом мионов по сравнению со II серией. Вероятно, в IV серии в первом периоде фиксации (15 дней) вазодилиатирующие микрососуды и, соответственно, высокий уровень гематканевого обмена создают оптимальные условия для постдистракционной мышцы, и поэтому через следующие 2 недели фиксации (27 дней) соединительно-тканые прослойки минимальны, сохраняется большая численная плотность микрососудов при меньшей плотности мышечных волокон и соответственно – лучшая васкуляризация. В III серии эксперимента численная плотность микрососудов меньше, соединительно-тканые образования минимальны в IV-й серии (рис. 11), составив 85% ($P<0,05$) от значения III-й, соответственно объем мышечных волокон достоверно выше в IV серии ($P<0,01$) (рис. 9).

Через месяц после снятия аппарата васкуляризация передней большеберцовой мышцы и площадь гематканевой диффузии во II серии выше, чем в I-й в 1,4 и в 1,2 раза соответственно (рис. 3, 7). Это обусловлено большей в 1,5 раза ($P<0,001$) численной плотностью микрососудов во II серии при идентичном количестве числа мионов в обеих сериях (рис. 4, 5). Соответственно, радиус диффузионного цилиндра меньше при дистракционно-компрессионном остеосин-

тезе (рис. 6), при этом объем микроциркуляторного русла в 3,0 ($P<0,001$) раза выше при дистракционном остеосинтезе (рис. 8), а площадь поверхности микрососудов в 1,2 раза выше при дистракционно-компрессионном остеосинтезе (рис. 9). Характерно, что во II серии относительный объем мышечных волокон в 1,2 раза ($P<0,001$) выше, чем в I-ой, приближается к значению интактной серии (рис. 10).

Особенностью в данном эксперименте обладают соединительно-тканые элементы. Динамика этого параметра по срокам эксперимента в двух сравниваемых сериях различна: в I серии составляет 93%, 141%, 231% условного объема мышцы; во II серии – 153%, 90%, 83%. То есть при дистракционно-компрессионном остеосинтезе объемная плотность соединительной ткани в ходе эксперимента имеет тенденцию к снижению, а при дистракционном остеосинтезе – к возрастанию. Через месяц после снятия аппарата данный параметр во II серии в 2,8 раза ($P<0,001$) ниже, чем в I-ой (рис. 11). Вероятно, сброс дистракционных усилий после компрессии стимулирует развитие паренхиматозных элементов – мышечных волокон и некоторую редукцию стромы в сравнении с экспериментом без компрессии регенерата.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Известно, что структурно-метаболические параметры мышечной ткани в значительной степени зависят от кислородного режима мышцы. Доказано, что увеличение напряжения сдвига и/или увеличение тангенциального напряжения капиллярной стенки может служить стимулом к пролиферации эндотелиальных клеток и, следовательно, к капиллярогенезу [10]. С этой точки зрения вклад механического стимула роста капилляров за счет напряжения растяжения равнозначен в период дистракции во всех сериях эксперимента. Следовательно, различия между сериями могут быть объяснены влиянием метаболического стимула роста капилляров.

В работе Н.В.Буртон и Дж.Барклау указывается, что снижение парциального давления кислорода в среде вызывает пролиферацию эндотелиальных клеток мышечных капилляров собак [8]. Этот эффект отсутствует при добавлении лактата, углекислого газа и аденозина. Орозомукоид обладает целым рядом важных защитных функций: непосредственно воздействует на мембраны эритроцитов, увеличивая способность последних к изменению формы при прохождении через капилляры с внутренним диаметром 3-4 мкм [4, 12], взаимодействует со стенками микрососудов, увеличивает их отрицательный заряд, что препятствует стазу и агрегации эритроцитов [9]. Очевидно, что улучшение микроцир-

куляции в удлиняемых тканях ускоряет доставку кислорода к мышечным волокнам, что уменьшает капиллярогенез и сопровождающий его рост стромальных элементов.

Согласно классической концепции А.Крогх [11], еще одним из адаптационных механизмов скелетной мышцы к гипоксии является снижение площади поперечного сечения мышечного волокна, что способствует облегчению диффузии кислорода от капилляров к митохондриям. Очевидно, что повышение парциального давления кислорода в тканях за счет улучшенной микроциркуляции позволяет избежать значительного снижения площади поперечного сечения мышечного волокна в условиях дистракционного остеосинтеза.

Различия в уровне васкуляризации между сериями с введением орозомукоида предположительно могут быть объяснены хроническим увеличением кровотока в мышцах удлиняемой конечности в IV серии, что само по себе является механическим стимулом роста капилляров [10].

Таким образом, проведенный стереометрический анализ позволяет сделать несколько выводов.

Во-первых, при ДКОС наблюдается увеличение относительного объема паренхиматозных элементов, функционально значимых, и относи-

тельная редукция стромы, при этом отмечена лучшая васкуляризация и гематканевой обмен по сравнению с ДКОС.

Во-вторых, введение орозомукоида обеспечивает в 2 раза лучший гематканевой обмен по сравнению с ДКОС без использования "Орозина".

В-третьих, с увеличением срока фиксации голени в аппарате исследуемая мышца под воздействием "Орозина" приближается к признакам интактной мышцы с минимальными соеди-

нительно-тканевыми образованиями и меньшим числом микрососудов.

В-четвертых, при периодическом введении "Орозина" на протяжении всего эксперимента, по сравнению с серией, где препарат начинали использовать лишь в период фиксации, зарегистрированы более высокая васкуляризация и лучший гематканевой обмен, меньший объем соединительной ткани и больший – мышечных волокон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лойда З. и др. Гистохимия ферментов / З. Лойда, Л. Госсрау, Т. Шиблер. - М.: Мир, 1982. - 270 с.
2. Непомнящих Л.М. и др. Морфометрический и стереологический анализ миокарда. Тканевая и ультраструктурная организация / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Л.В. Колесникова. - Новосибирск, 1984. - 159 с.
3. Орозомукод как возможное средство нормализации периферической микроциркуляции и обменных процессов при травмах и воспалении / В.В. Саломатин, А.Г. Лютов, В.С. Корытный, Д.А. Попков // Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине: Материалы междунардн. симпозиума, посвящ. 150-летию со дня рожд. И.И. Мечникова. - Уфа, 1995. - Ч. 2. - С.41-47.
4. Саломатин В.В. Роль α 1-кислого гликопротеина в патогенезе термических поражений и перспективы его лечебного применения: Автореферат дис... д-ра мед. наук. - Челябинск, 1993. - 40с.
5. Стецула В.И. Репаративная регенерация длинных трубчатых костей при компрессионном остеосинтезе: Дис... д-ра мед. наук. - Свердловск, 1965. - 361 с.
6. Шевцов В.И., Попков А.В. Дистракционно-компрессионный остеосинтез при удлинении конечностей аппаратом Илизарова // Травматол. ортопед. России. - 1995. - №1. - С. 35 - 38.
7. Шевцов В.И., Попков А.В. Стимуляция перестройки дистракционного регенерата // Анналы травматол. ортопед. - 1995. - № 2. - С.23-26.
8. Burton H.W., Barclay J.K. Metabolic factors from exercising muscle and proliferation of endothelial cells // Med. Sci. Sports Exerc. - 1986. - Vol. 18, N 4. - P. 390.
9. Curry F.E., Rutledge J.C., Lenz J.F. Modulation of microvessel wall charge by plasma glycoprotein orosomuroid // Amer. J. Physiol. - 1989. - Vol. 257. - P. H1354-H1359.
10. Hudlicka O., Price S. The role of blood flow and/or muscle hypoxia in capillary growth in chronically stimulated fast muscles // Pfluger Arch. - 1990. - Vol. 417, N 1. - P. 67.
11. Krogh A. The number of distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue // J. Physiol. - 1919. - Vol. 52. - P. 409.
12. Maeda H., Nishi K. Agent for caring peripheral circulation insufficiency // Biol. Abstr. USA. - 1982. - Vol. 70. - N 76207.

Рукопись поступила 16.08.01.