

© Группа авторов, 2004

**Стереологический анализ передней большеберцовой мышцы
и капилляров эндомизия в эксперименте
с дозированным удлинением голени при четырехкратной
и автоматической дробности**

В.И. Шевцов, Г.Н. Филимонова, С.А. Ерофеев

***Experimental stereological analysis of the tibial anterior muscle and
endomysium capillaries with graduated leg lengthening by four-fold
and automatic division***

V.I. Shevtsov, G.N. Filimonova, S.A. Yerofeyev

Государственное учреждение

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 взрослых беспородных собаках проведен сравнительный стереологический анализ передней большеберцовой мышцы и капилляров эндомизия опытной и контралатеральной конечностей с различной дробностью distraction голени. Показано, что при автоdistraction клиническая картина значительно лучше, чем при 4-кратной дробности, что объясняется лучшим кровоснабжением мышечной ткани при высокодробном удлинении. При 4-кратной дробности меньшая численная плотность микрососудов и параметра, отражающего васкуляризацию мышцы, скомпенсированы большей площадью гемато-тканевой диффузии. Ультраструктура эндотелия капилляров также свидетельствует о различных адаптационных процессах, связанных с условиями растяжения голени. Большая протяженность зон межклеточных контактов эндотелиоцитов в площади следа эндотелия при distraction с четырехкратной дробностью может свидетельствовать о повышении адгезивных свойств эндотелиоцитов, а доли площадей, занимаемые следами цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума и митохондрий в площади следа эндотелия, характеризуют высокую метаболическую активность и интенсификацию окислительно-восстановительных процессов эндотелиоцитов по сравнению с автоdistraction.

Ключевые слова: эксперимент, беспородные собаки, мышечная ткань, голень, дозированное удлинение, стереологический анализ.

Comparative stereological analysis of the anterior tibial muscle and endomysium capillaries of experimental and contralateral limbs with different divisions of the leg distraction used was made in adult mongrel dogs experimentally. The clinical picture for autodistraction was shown to be much better in comparison with 4-fold division due to better blood supply of the muscular tissue for high-division lengthening. In case of 4-fold division both the less numerical density of microvessels and the parameter, reflecting the muscle vascularization, are compensated by the greater area of hematotissular diffusion. The ultrastructure of endothelial capillaries also affirms different adaptation processes, associated with the conditions of leg distraction. Great extent of the zones of the intercellular contacts of endotheliocytes in the area of endothelial mark during distraction of 4-fold division can show the increase of endotheocyte adhesive properties, and the shares of areas, occupied by the marks of the cisternae of granular endoplasmic reticulum and mitochondria in the area of endothelial mark define high metabolic activity and intensification of endotheliocyte oxidation-reduction processes comparing to autodistraction.

Keywords: experiment, mongrel dogs, muscular tissue, leg, graduated lengthening, stereologic analysis.

ВВЕДЕНИЕ

Выбору оптимального режима distraction при distractionном остеосинтезе конечностей посвящены работы, касающиеся морфологии периферических нервов, магистральных сосудов, костного регенерата. В наших предыдущих работах по количественному стереологическому анализу уже анализировались особенности адаптационных процессов передней большеберцовой мышцы при различных режимах distraction

[5, 6]. Эти исследования касались тканевого уровня организации мышцы, и анализировалась только опытная конечность. Ультраструктура микрососудистого эндотелия удлиняемой голени в различных условиях distraction, вероятно, должна иметь адаптационные особенности. Сравнительный анализ ультраструктур капилляров эндомизия возможен лишь при использовании стереологического метода, так как визу-

альные различия в данном случае беспредметны. Целесообразность применения метода стереологии ярко продемонстрирована в литературе на примере количественного анализа ультраструктур мышечных волокон и кровеносных капилляров на четырех стадиях облитерирующего эндартериита человека [1]. Роль эндотелия макро- и микрососудов многогранна, основные

функции – гемато-тканевой обмен, регуляция гомеостаза [4, 7, 8, 9, 10].

Цель работы – сравнительный анализ стереометрических характеристик передней большеберцовой мышцы и капилляров эндомизия опытной и контралатеральной конечностей в эксперименте с различной дробностью distraction голени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах на взрослых беспородных собаках производили дозированное удлинение голени с темпом 1 мм в сутки: в четырехкратном режиме – 0,25×4 (I серия) и с использованием автодистрактора 0,017×60 (II серия), вели клинические наблюдения за функцией удлиняемой конечности и состоянием животных на протяжении всего экспериментального периода. Животных выводили из опыта через 14 и 28 дней distraction, 30 дней фиксации, 30 и 180 дней после снятия аппарата. Методом стереологического анализа исследовали передние большеберцовые мышцы опытной и контралатеральной конечностей первой серии (n=10) и второй серии (n=11). Исследовано 3 интактных животных – интактная серия. Материал для гистохимического исследования забирали из средней трети брюшка передней большеберцовой мышцы, из нефиксированного материала изготавливали криостатные срезы, выявляли активность миозиновой АТФ-азы. С помощью тестовой решетки коротких отрезков методом стереологического анализа определяли: объемную (V_v), поверхностную (S_v), численную (N_A) плотность микрососудов, мышечных волокон и объемную плотность соединительной ткани. Также рассчитывали вторичные параметры: отношение численной плотности микрососудов к численной плотности мышечных волокон ($N_{A_{MC}}/N_{A_{MB}}$) – параметр, отражающий васкуляризацию мышцы и косвенно степень ее оксигенации [5], отношение поверхностной плотности

микрососудов к поверхностной плотности мышечных волокон ($S_{v_{MC}}/S_{v_{MB}}$) – площадь гемато-тканевой диффузии [5]. Для выборок с нормальным распределением определяли достоверность различий между экспериментальными сериями по t-критерию Стьюдента. Дополнительно произведен ультраструктурно-стереологический анализ эндотелия капилляров передней большеберцовой мышцы через 28 дней distraction и месяц фиксации (8 собак из числа вышеуказанных). Для получения ультратонких срезов из средней трети брюшка передней большеберцовой мышцы иссекали небольшой участок, закрепляли на жесткой основе, после альдегидно-осмиевой фиксации, дегидратации в спиртах и ацетоне полимеризовали в эпоксидных смолах. Ультратонкие срезы исследовали в трансмиссионном микроскопе JEM-100B при увеличении 11800х. Используя открытую тестовую решетку коротких отрезков, в безъядерных зонах эндотелия определяли: долю площади, занимаемую следами цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума ($\Gamma_{ЭР}$) и митохондрий (MTX) в площади следа эндотелия (Θ) ($A_{\Gamma_{ЭР}}/A_{\Theta}$); протяженность зон межклеточных контактов (МК) в тестовой площади следа эндотелия ($T_{МК}/A_{\Theta}$) [1]. Достоверность различий выборок для опытной и контралатеральной конечностей, для опытной конечности между сериями эксперимента определяли по W-критерию Вилкоксона для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На поперечных срезах мышц с выявленной активностью миозиновой АТФ-азы идентифицируются мышечные волокна двух основных типов, интенсивность реакции несколько выше в контралатеральной конечности, чем в оперированной. Визуально гистологические картины мышцы в двух сериях различаются: через 14 дней автодистракции – более многочисленные и меньшего диаметра как микрососуды, так и мышечные волокна. При четырехкратном режиме отмечаются мышечные волокна большего диаметра и часто продольно ориентированные

микрососуды на поперечных срезах мышцы (рис. 1). Через 28 дней в автоматическом режиме distraction несколько меньшие диаметры мышечных волокон сохраняются.

По результатам стереологического анализа передней большеберцовой мышцы в опытной конечности численная плотность микрососудов через 14 и 28 дней автодистракции составила 220 и 200% от значения интактной серии ($P<0,001$), соответственно при четырехкратном режиме – лишь 140 и 120% ($P<0,001$) (рис. 2).

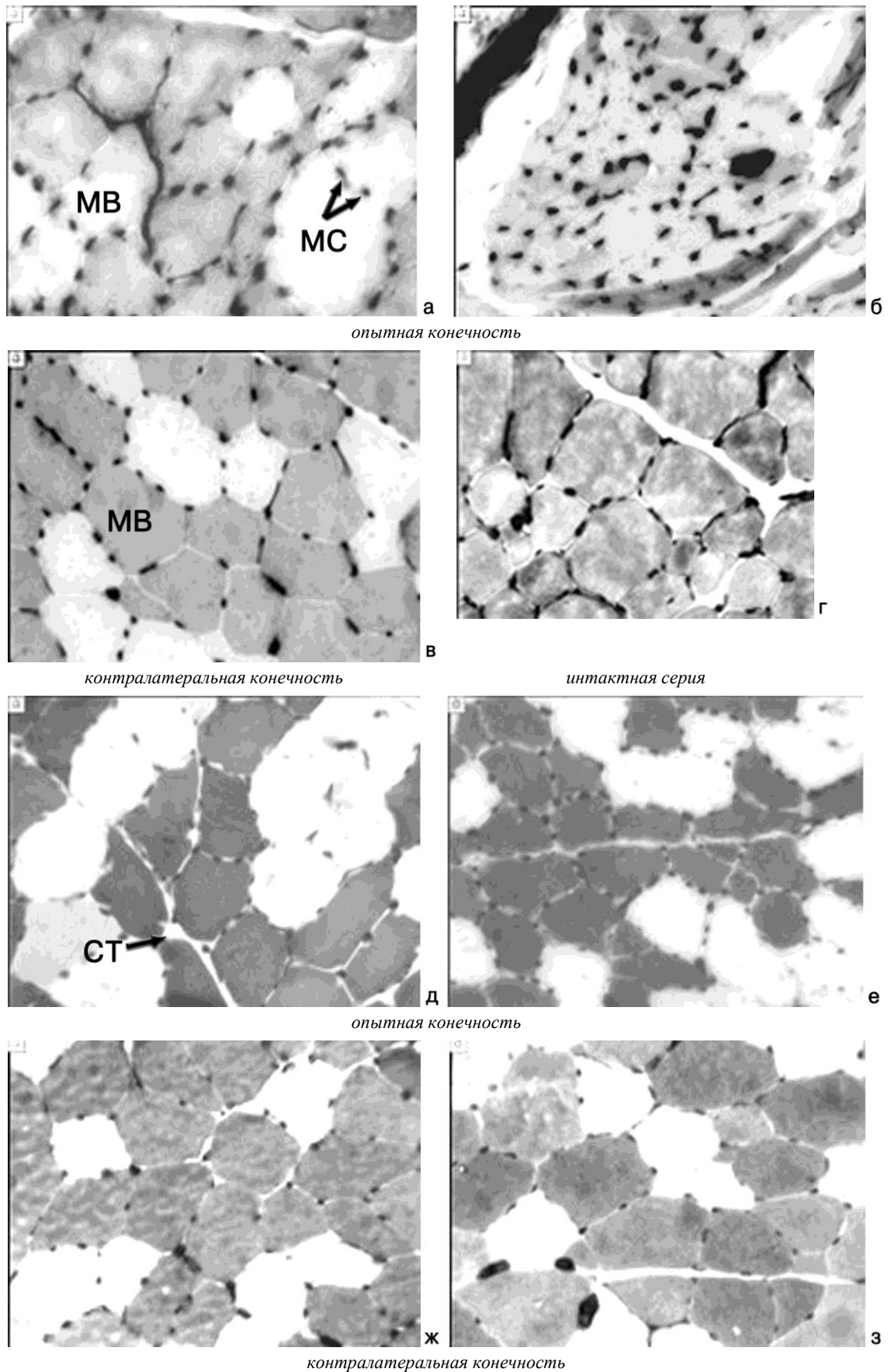


Рис. 1. Передняя большеберцовая мышца: а, б, в - через 14; д, е, ж, з - через 28 дней дистракционного остеосинтеза голени в различных условиях эксперимента; г - интактная серия. Слева - первая серия (0,25 x 4), справа - вторая серия (0,017 x 60). Поперечные криостатные срезы с выявленной активностью миозинового АТФ-азы по Padicula, German. MB - мышечные волокна, MC - микрососуды, CT - соединительная ткань. Об. 16, ок. 10х

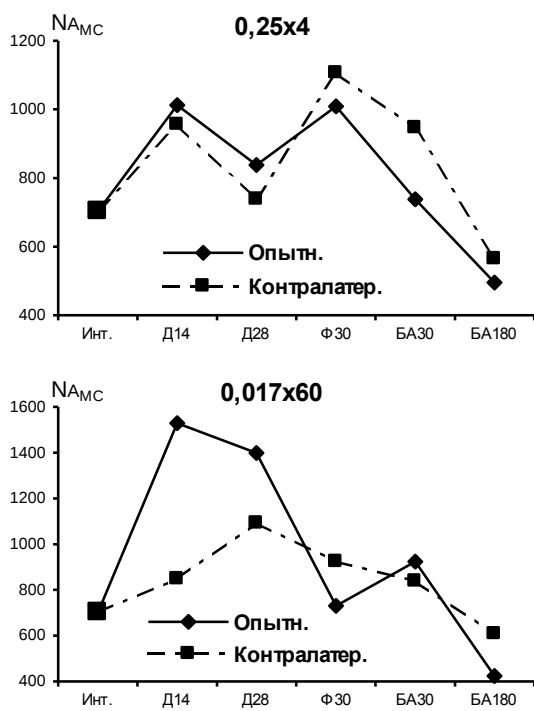


Рис. 2. Численная плотность микрососудов (NA_{MC}) в передней большеберцовой мышце при distractionном остеосинтезе голени в динамике эксперимента

Разница в численной плотности микрососудов между режимами в исследуемые сроки составила 1,5 и 1,7 раза ($P < 0,001$). Через месяц фиксации в серии с четырехкратным режимом NA микрососудов на оперированной голени несколько увеличивается, при автодистракции – снижается в 1,9 раза ($P < 0,001$). Через месяц после снятия аппарата в I серии численная плотность микрососудов уменьшается в 1,4 раза относительно предыдущего срока ($P < 0,001$), во II – возрастает в 1,3 раза ($P < 0,001$). Через полгода после снятия аппарата данный параметр выше в 1,2 раза ($P < 0,001$) в I серии эксперимента по сравнению со второй серией.

Динамика численной плотности мышечных волокон в эксперименте с четырехкратным режимом distraction аналогична таковой для микрососудов в этой серии (рис. 3). При автоматическом удлинении иначе: через 14 дней удлинения NA мышечных волокон, аналогично микрососудам, значительно возрастает, составляя 290% от значения интактной серии ($P < 0,001$), а к 28 дню – снижается в 2,2 раза относительно предыдущего срока, в то время как число микрососудов уменьшается незначительно. Через месяц фиксации численная плотность мышечных волокон возрастает в 1,7 раза при снижении численной плотности микрососудов. Через месяц после снятия аппарата NA мышечных волокон снижается в 1,6 раза ($P < 0,001$) при увеличении NA микрососудов.

Различия между режимами в соотношении численной плотности микрососудов и мышечных волокон обуславливают степень васкуляризации мышцы. Через 14 дней distraction значение данного параметра несколько меньше при автомати-

ческом удлинении, оставаясь на уровне интактной серии в условиях четырехкратной дробности (рис. 4). Через 28 дней distraction значение NA_{MC}/NA_{MB} в обоих режимах составляет 150% от значения интактной серии. Через месяц фиксации этот параметр во II серии снижается в 3,3, а в I – лишь в 1,9 раза. В первом случае данный факт обусловлен снижением численной плотности микрососудов при повышении численной плотности мышечных волокон, а во втором – снижение происходит на фоне увеличения численной плотности и мышечных волокон, и микрососудов. В период после снятия аппарата значение NA_{MC}/NA_{MB} ниже контрольного уровня в обеих сериях.

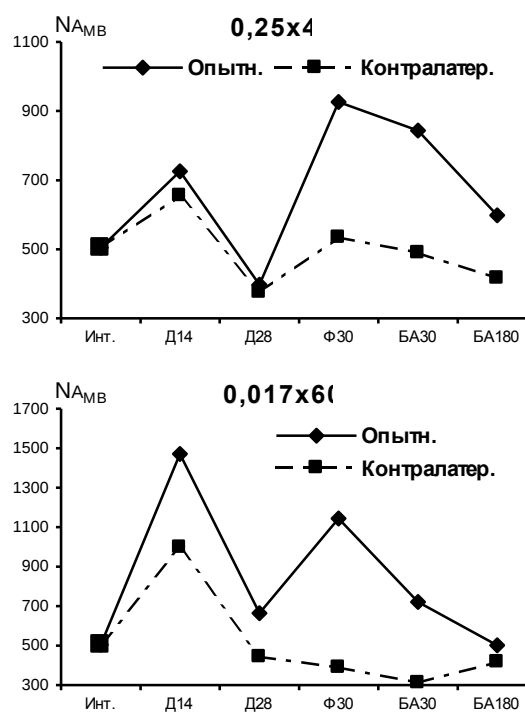


Рис. 3. Численная плотность мышечных волокон (NA_{MB}) в передней большеберцовой мышце при distractionном остеосинтезе голени в динамике эксперимента

Площадь гемато-тканевой диффузии через 14 дней удлинения голени выше при четырехкратном режиме в 1,6 раза, через 28 дней distraction значение данного параметра идентично в сравниваемых сериях (рис. 5). Через месяц фиксации Sv_{MC}/Sv_{MB} выше в 1,7 раза в I серии эксперимента, а через месяц после снятия аппарата в 2,2 раза выше во II серии. Через 180 дней после снятия аппарата значение Sv_{MC}/Sv_{MB} одинаково в сравниваемых сериях, составляя 75% от значения интактной серии. Площадь гемато-тканевой диффузии обусловлена в большей степени поверхностной плотностью микрососудов (рис. 6).

Объемная плотность сосудистого русла при сравнении серий эксперимента достоверно выше лишь через 28 дней автодистракции ($P < 0,05$) (рис. 7).

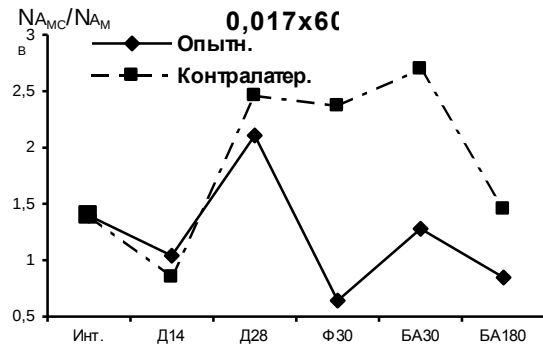
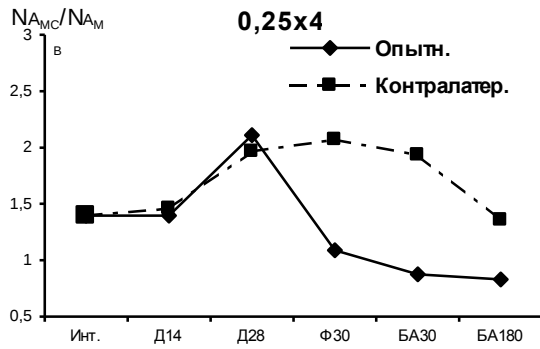


Рис. 4. Параметр, оценивающий васкуляризацию передней большеберцовой мышцы (NA_{MC}/NA_M) в динамике эксперимента с дистракционным остеосинтезом голени

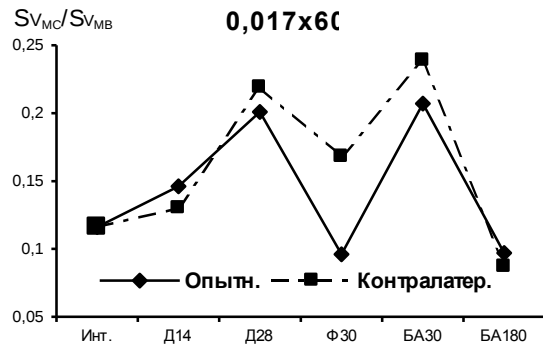
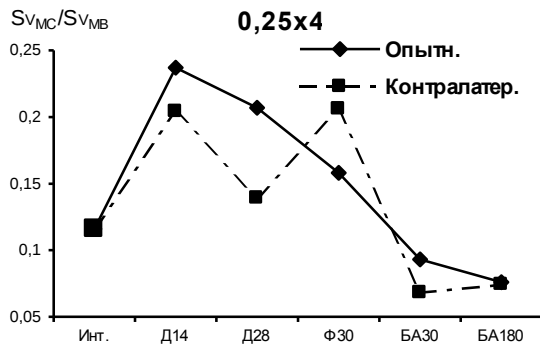


Рис. 5. Площадь гемато-тканевой диффузии (SV_{MC}/SV_{MB}) в передней большеберцовой мышце при дистракционном остеосинтезе голени в динамике эксперимента

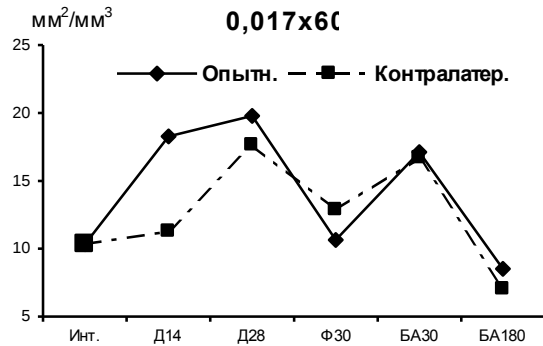
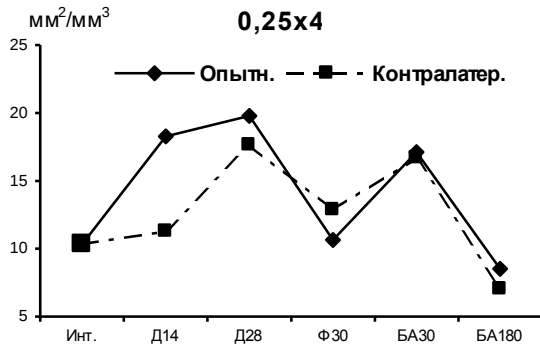


Рис. 6. Поверхностная плотность микрососудов (SV_{MC}) в передней большеберцовой мышце при дистракционном остеосинтезе голени в динамике эксперимента

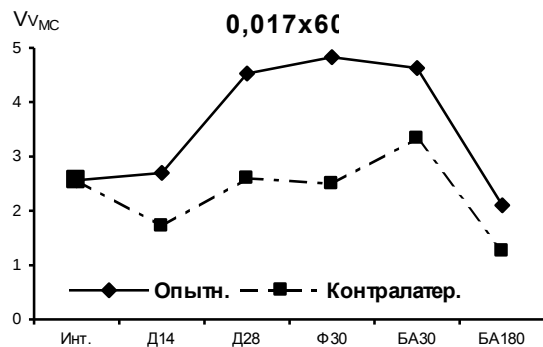
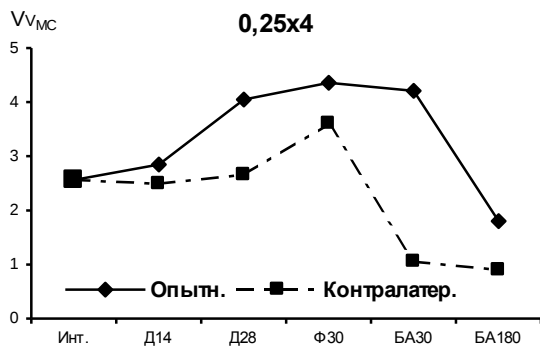


Рис. 7. Относительный объем микрососудов (V_{MC}) в передней большеберцовой мышце при дистракционном остеосинтезе голени в динамике эксперимента

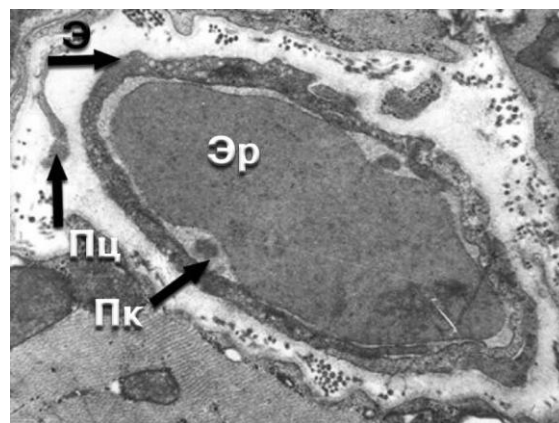
Во все другие сроки эксперимента существенные различия отсутствуют. Через 30 дней фиксации при одинаковом относительном объеме сосудов отмечена большая (в 1,6 раза) ($P < 0,001$) относительная площадь их поверхности в первой серии, что может свидетельствовать о микрососудах большего калибра и мелких сосудах при автодистракции. Через месяц без аппарата обратное соотношение: при одинаковом значении объемной плотности микрососудов их поверхностная плотность в 1,7 раза ($P < 0,001$) выше в серии с автодистракцией, что обусловлено в большей степени снижением поверхностной плотности мышечных волокон относительно предыдущего срока эксперимента и, соответственно, увеличением их диаметра.

Для дополнения стереометрических данных мышц удлиняемой голени в различных режимах дистракции исследовали капилляры эндомизия передней большеберцовой мышцы при четырехкратной и автоматической дробности дистракции, наиболее используемых в медицинской практике. В базальном слое капилляров соматического типа локализованы 1-3 перицита с цитоплазматическими отростками. Люминальная поверхность эндотелиальных клеток часто образует цитоплазматические выросты, выпячивания внутрь просвета, чаще – в зоне межклеточных контактов. Система микровезикул выражена достаточно хорошо, визуальные различия между режимами почти отсутствуют (рис. 8). Гранулярная эндоплазматическая сеть в виде узких цистерн, мелкие митохондрии немногочисленны.

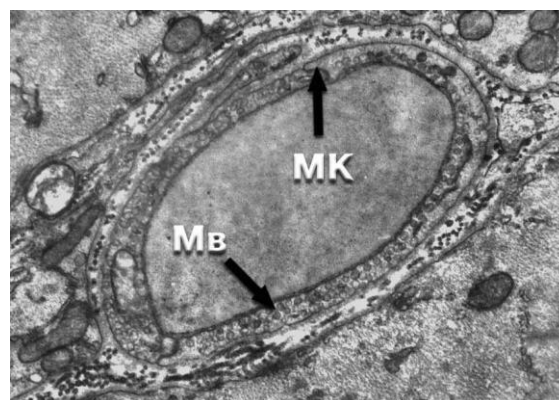
В конце дистракции доля площади, занимаемая следами цистерн ГЭР в площади всего эндотелия, в I серии в 1,3 раза выше, чем во II-й ($P < 0,01$) (рис. 9). Через месяц фиксации значение данного параметра при автодистракции снижается недостоверно, при 4-кратном режиме – возрастает в 1,7 раза ($P < 0,01$), что в 3,3 раза больше ($P < 0,01$), чем во II серии.

Доля площади, занимаемая следами митохондрий в площади всего эндотелия, через месяц удлинения в I серии больше в 2,6 раза ($P < 0,001$), чем во II-й, через месяц фиксации значение этого параметра при четырехкратном режиме снижается в 2,0 раза ($P < 0,01$) относительно предыдущего срока, при автодистракции – не изменяется (рис. 10).

Протяженность зон межклеточных контактов в тестовой площади следа эндотелия через месяц автодистракции в 2,0 раза ($P < 0,01$) и через месяц фиксации в 1,6 раза ниже (недостоверно), чем при четырехкратном режиме (рис. 11). Через 30 дней фиксации значение данного параметра в I серии снижается в 1,8 раза ($P < 0,001$) относительно предыдущего срока, во II-й – изменения не достоверны.



а)



б)

Рис. 8. Капилляры эндомизия передней большеберцовой мышцы через месяц дистракции: а) с 60-кратной, б) с 4-кратной дробностью. Э – эндотелиоцит, Пк – просвет капилляра, Эр – эритроцит, Пц – перицит, МК – межклеточный контакт, Мв – микропинноцитозные везикулы. Электронограммы, инструментальное увеличение 11800x

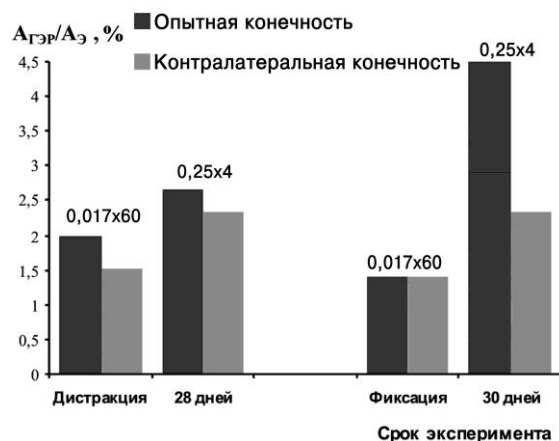


Рис. 9. Доля площади, занимаемая следами цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума в площади следа эндотелия ($A_{ГЭР}/A_Э$)

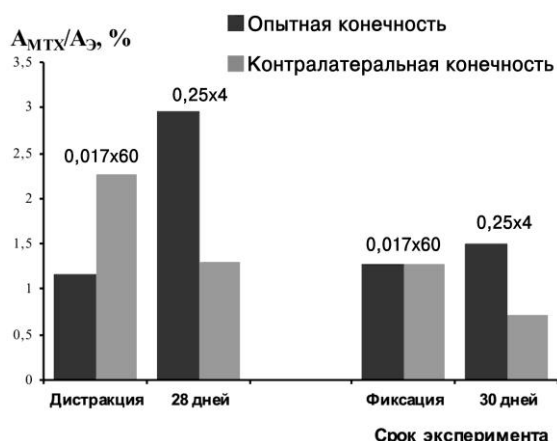


Рис. 10. Доля площади, занимаемая следами митохондрий в площади следа эндотелия ($A_{MTX}/A_Э$)

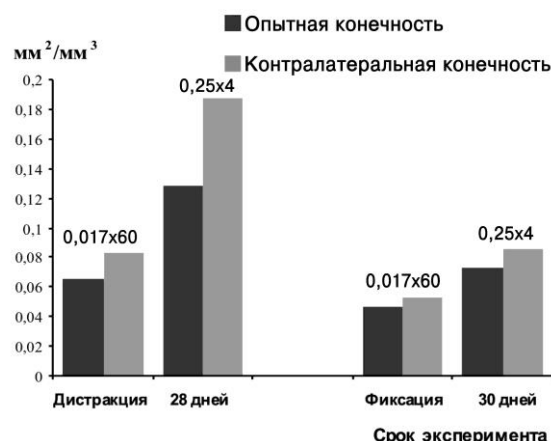


Рис. 11. Протяженность зон межклеточных контактов в тестовой площади следа эндотелия ($T_{МК}/A_Э$)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состояние микрососудов при дистракции является важным фактором. Исследованиями эндотелия макро- и микрососудов в регуляции гомеостаза установлено его полифункциональное значение. Как главный компонент гистогематических барьеров эндотелий осуществляет обмен между кровью и тканями [7, 9], биосинтез разнообразных факторов, участвующих в регуляции фенотипа гладкомышечных клеток [4, 8], в процессах гемокоагуляции [10]. Тот факт, что через 28 дней удлинения в режиме четырехкратной дробности $A_{MTX}/A_Э$ и $T_{МК}/A_Э$ значительно выше, $A_{ГЭР}/A_Э$ так же достоверно выше, чем при автодистракции, согласуется с тем, что на тканевом уровне при меньшем в 1,5 раза числе микрососудов площадь гемато-тканевой диффузии выше в I серии в 1,6 раза. Вероятно, потребность в адгезии эндотелиальных клеток при четырехкратном режиме удлинения гораздо выше, чем при автодистракции, а большая потребность в усиленном энергообеспечении отражена в 2,6 раза большим значением параметра $A_{MTX}/A_Э$. Через 30 дней фиксации последний параметр незначительно, $A_{ГЭР}/A_Э$ и $T_{МК}/A_Э$ существенно больше при четырехкратном режиме также подтверждается стереологией на тканевом уровне: площадь поверхности микрососудов более чем в 2 раза выше при четырехкратном режиме при резком снижении поверхностной плотности микрососудов после автоматической дистракции.

Таким образом, анализ стереологических характеристик передней большеберцовой мышцы и клинические наблюдения за функциональным

состоянием удлиняемой конечности в сравниваемых сериях эксперимента характеризуют различные течения адаптационных процессов в мышце в зависимости от дробности дистракции. При автоматическом удлинении голени клиническая картина значительно лучше, чем при 4-кратной дробности дистракции. Это объясняется лучшим кровоснабжением мышечной ткани при высокособной дистракции, о котором свидетельствуют такие показатели, как численная плотность микрососудов и параметр, отражающий степень васкуляризации мышцы (N_{AMC}/N_{AMB}). При четырехкратной дробности удлинения голени меньшее значение численной плотности микрососудов и параметра, отражающего васкуляризацию мышцы, скомпенсированы большей площадью гемато-тканевой диффузии. На ультраструктурном уровне получены результаты, подтверждающие различные проявления адаптации сосудистого эндотелия к дозированному растяжению в различных условиях. Большая протяженность зон межклеточных контактов в площади следа эндотелия при дистракции голени с четырехкратной дробностью может свидетельствовать о повышении адгезивных свойств эндотелиоцитов [3]. Доли площадей, занимаемые следами цистерн ГЭР и МТХ, в площади следа эндотелия при 4-кратном режиме удлинения характеризуют высокую метаболическую активность и интенсификацию окислительно-восстановительных процессов эндотелиоцитов по сравнению с автодистракцией.

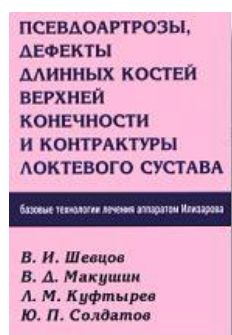
ЛИТЕРАТУРА

1. Королев, В.В. Количественное сравнение ультраструктур кровеносных капилляров и мышечных волокон на стадиях облитерирующего эндартериита / В.В. Королев, В.И. Ахматов, С.Б. Стефанов // Архив патологии. - 1980. - Т.62, №7. - С. 58-63.
2. Лойда, З. Гистохимия ферментов / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер. - М.: Мир, 1982. - С. 87-88.
3. Морфометрический и стереологический анализ миокарда. Тканевая и ультраструктурная организация: Метод. рекомендации / Сост.: Л.И. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Л.В. Колесникова и др. - Новосибирск, 1984. - 159 с.
4. Сагач, В.Ф. О роли эндотелия в реакции реактивной гиперемии коронарных сосудов / В.Ф. Сагач, М.Н. Ткаченко, А.В. Дмит-

- риев // Докл. АН СССР. - 1989. - №3. - С. 765-767.
5. Состояние сосудистого бассейна мышц конечности при разных режимах удлинения (морфо- функциональные исследования) / В.И.Шевцов, С.Н.Асонова, А.Д.Наумов и др. // Гений ортопедии. - 1997. - № 2. - С. 5-11.
 6. Стереологический анализ, характеризующий процессы адаптации передней большеберцовой мышцы при различных режимах удлинения голени по Илизарову / Г.Н. Филимонова, С.А. Ерофеев, А.А. Шрейнер, С.В. Баранова // Гений ортопедии. - 1999. - №3. - С.14-19.
 7. Чернух, А.М. Микроциркуляция /А.М. Чернух, П.Н. Александров, О.В. Алексеев. - М.: Медицина, 1984. - 432 с.
 8. Busse, R. Control of vascular tone by the endothelium / R. Russe // Haemostasis. - 1988. - Vol. 18, Suppl. 2. - P. 50.
 9. Grant, G.A. Understanding the physiology of the blood-brain barrier: In vitro models / G.A. Grant, N.J. Abbott, D. Janigro // News Physiol. Sci. - 1998. - N 13. - P. 287-293.
 10. Thrombin in enhances the release of endothelium from cultured porcine aortic endothelial cells / V.B. Schini, H. Hendrickson, D. M. Heublein et al. // Eur. J. Pharmacol. - 1989. - Vol. 165, N 2-3. - P. 333-334.

Рукопись поступила 18.02.03.

Предлагаем вашему вниманию



В.И. Шевцов, В.Д. Макушин, Л.М. Куфтырев, Ю.П. Солдатов

ПСЕВДОАРТРОЗЫ, ДЕФЕКТЫ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ ВЕРХНЕЙ КОНЕЧНОСТИ И КОНТРАКТУРЫ ЛОКТЕВОГО СУСТАВА

(базовые технологии лечения аппаратом Илизарова)

Курган: Зауралье, 2001. - 406 с.

ISBN 5-8.7247-072-X

В книге обобщен опыт лечения больных с псевдоартрозами, дефектами длинных костей верхней конечности и контрактурами локтевого сустава. Приводятся рациональные компоновки аппарата Илизарова при различных анатомо-функциональных нарушениях. Представлены приемы расчета величины дефекта кости и классификации патологии.

Описываются не имеющие аналогов в практике ортопедии тактико-технологические варианты реконструкции костей верхней конечности. Приведенные сведения помогут ортопеду в выработке альтернативных решений анатомо-функциональной реабилитации больных. Анализ возможных технических ошибок и лечебных осложнений имеет важное значение для практикующего врача.

Приведенные результаты лечения дают возможность оценить его эффективность в сравнении с традиционными хирургическими подходами в решении данной проблемы. Книга иллюстрирована схемами остеосинтеза, клиническими примерами, способствующими усвоению представленного материала.

Монография рассчитана на широкий круг хирургов, ортопедов и врачей, использующих метод чрескостного остеосинтеза аппаратами наружной фиксации.