

СВОБОДНАЯ КОСТНАЯ ПЛАСТИКА ДИСТРАКЦИОННОГО РЕГЕНЕРАТА ПРИ ЗАМЕДЛЕННОМ КОСТЕОБРАЗОВАНИИ

А.А. Барабаш

Институт травматологии и ортопедии Научного центра реконструктивной и восстановительной хирургии Сибирского отделения РАМН, Иркутск

В экспериментах на 60 кроликах исследовались процессы регенерации при замедленном костеобразовании и свободной костной аутопластике дистракционного регенерата. Всем животным накладывался аппарат Илизарова и производилось удлинение голени на 10 мм. В I серии опытов дистракция осуществлялась по 1 мм в сутки, во II серии темп ее был увеличен до 2 мм в сутки. В III серии удлинение проводилось так же, как во II, но в начале периода фиксации в середину дистракционного регенерата помещался костный аутотрансплантат. Применялись рентгенологический, морфологический, электронно-микроскопический и электронно-зондовый методы исследования. Выявлено, что дистракция оказывает формообразующее влияние на организацию регенерирующей костной ткани с преобладанием периостального источника костеобразования. При увеличении темпа удлинения образование и органотипическая перестройка дистракционного регенерата замедляются на фоне сниженного содержания в нем кальцифицированной костной ткани. При аутопластике перестройка дистракционного регенерата ускоряется на 10–15 дней, а содержание в нем кальцифицированной ткани превышает на 30% показатель II серии и на 28% — I серии опытов.

The bone regeneration and effect of free osseous autoplasty into distractive regenerate were studied in experimental model of delayed bone formation. Sixty rabbits were used. In all animals the shin lengthening was performed using Ilizarov device. There were 3 groups of animals: I-st group (control) - distraction rate was 1 mm/day; II-nd group - 2 mm/day distraction; III-rd group - 2 mm/day distraction + bone autografting into the middle of distractive regenerate. The animals were euthanased on 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 55 day after operation. Roentgenologic, morphologic, electronic microscopic, electronic probe examinations were used. Distraction was shown to influence the organization of regenerating bone tissue with prevailing periostal origin of bone formation. In acceleration of distraction rate the formation and remodeling of bone regenerate was delayed and bone tissue calcium was decreased. In autoplasty the remodelling of distractive regenerate was more intensive by 10-15 day and calcium content in bone tissue was 30% higher as compared with data of II-nd group and 28% as compared with data of I-st group.

По данным областной травматологической МСЭК, травмы и заболевания костно-мышечной системы с 1993 г. прочно занимают второе место в структуре причин инвалидности по Иркутской области. В 46% случаев отмечено замедленное сращение переломов конечностей, в 4,9% — формирование ложных суставов [6]. Такая частота неудовлетворительных результатов лечения закономерно побуждает к выявлению их причин и поиску на этой основе новых путей решения проблемы.

Одна из главных причин неудовлетворительных результатов хирургического лечения повреждений и заболеваний опорно-двигательного аппарата состоит в недооценке клиницистами современных оперативных технологий, обеспечивающих оптимальные, научно обоснованные условия для репаративной регенерации опорных органов и тканей. Другой причиной является ограниченная возможность органотипической перестройки крупных ауто-, алло-, ксенотранс-

плантатов и неспособность организма к замене их на новую кость [13, 16].

За 50 лет применения системы управляемого чрескостного остеосинтеза в эксперименте и клинике вскрыта и по-новому оценена роль биологии кости, доказано важное значение берегательной тактики в отношении кости как органа, сохранения кровоснабжения остеогенных тканей с обеспечением статодинамической нагрузки. Исходы лечения больных с ортопедической патологией за эти годы улучшились, и при дифференцированном отборе пациентов для операции процент благоприятных результатов приближается к 100. Однако переоценка дистракции как фактора, стимулирующего остеогенез, механический перенос метода на тяжелую патологию — последствия травм с нарушением кровоснабжения, осложнением гнойной инфекцией, а также удлинение конечностей на большие величины приводят к увеличению сроков реабилитации, при этом неудовлетворительные

результаты лечения составляют от 5 до 28%, включая замедленное образование регенерата [2, 5, 9, 10].

В настоящее время в клинической практике применяются различные способы активизации репаративной регенерации костной ткани: от терапевтического воздействия на организменном уровне до местных ортопедических воздействий, в число которых входят различные варианты костной пластики. Пластика в дистракционный регенерат в ортопедии явление новое и малоизученное [1, 4, 11, 12]. Исследования по оптимизации биомеханического комплекса условий для заживления костной раны и поиск путей биологической стимуляции продолжаются и сегодня [8, 14, 15].

В настоящей работе изучались вопросы создания минерального депо в органическом матрикс формирующейся кости при дистракции, судьба мелких аутотрансплантатов и кальцификация дистракционных регенератов.

Материал и методы

Выполнено 60 экспериментов на животных и проведен анализ лечения 12 больных.

В эксперимент брались животные (кролики) в возрасте от 1 года до 1,5 лет с длиной голени от 11 до 13 см.

В стерильных условиях накладывали экспериментальный аппарат Илизарова, производили остеоперфорацию с остеоклазией в средней трети костей правой голени (рис. 1) и на 5-е сутки после операции начинали дистракцию.

В соответствии с задачами эксперимента животные были разделены на три серии (по 20 кроликов в каждой). В I серии голень удлинляли со скоростью 1 мм в сутки (0,8% от длины сегмента) в течение 10 дней. Дистракцию осуществляли дробно по 0,25 мм 4 раза в день. Во II серии удлинение голени производили за 5 дней, со скоростью 2 мм в сутки (1,6% от длины сегмента) — также дробно по 0,25 мм 8 раз в день. В III серии после удлинения голени за 5 дней на заданную величину (10 мм) выполняли еще одну операцию — трансплантацию в середину дистракционного регенерата участка малоберцовой кости (0,7×0,3×0,2 мм) контралатеральной конечности.

Животных выводили из опыта на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 и 55-е

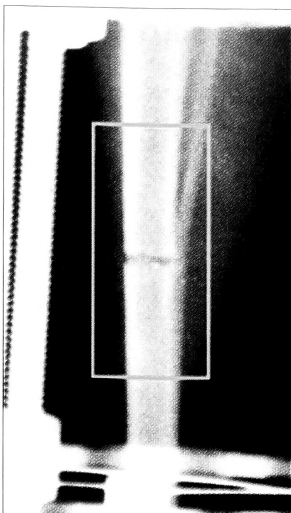


Рис. 1. Рентгенограмма голени кролика после операции.

сутки после операции быстрым внутривенным введением большой дозы тиопентал-натрия. Вырезали образцы тканей и фиксировали их в 10% растворе нейтрального формалина. Затем часть образцов погружали в 1% раствор четырехокси осмия на фосфатном буфере, обезвоживали и заключали в эпон.

Полутонкие и ультратонкие срезы готовили без декальцинации регенератов на ультрамикротоме «LKB Ultratomi III 8800» и «LKB Bromma Ultratomi Nova» с помощью стеклянных и алмазных ножей «LKB JUMDI». Полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм окрашивали толуидиновым синим и метиленовым синим (Уикли Б., 1975), гематоксилином и эозин. Ультратонкие срезы контрастировали растворами уранилацетата и растворами свинца на приборе «LKB Bromma 2168 Ultrastainer» и изучали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100B.

Поверхности блоков, отполированные в процессе изготовления полутонких и ультратонких срезов, и поверхности продольных распилов регенератов и большеберцовых костей интактных животных, отполированные мелкоабразивными материалами, напыляли для создания электро- и теплопроводности тонким слоем меди в вакуумном напылителе JEE-4X/5B. Подготовленные образцы изучали в отраженных электронах при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM-840, что позволяло выявлять участки, обладающие различной плотностью и различающиеся по степени минерализации. При этом получали изображения, аналогичные микрорентгенограммам, но с гораздо большими пространственным разрешением и четкостью.

Заливочную среду с образцов после исследования в отраженных электронах удаляли насыщенным раствором этиолята калия. Для выявления топографии рельефа минерализованных структур (костных трабекул и стенок остеонов) мягкотканые компоненты удаляли путем дозированной мацерации 6% раствором гипохлорита натрия в течение 6–8 ч при температуре 4–5°C. Затем образцы тщательно промывали дистиллированной водой, обрабатывали по методике замораживания—высушивания и изучали в сканирующем электронном микроскопе во вторичных электронах.

Исследования проводили на рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе LINK 860-500, смонтированном на сканирующем электронном микроскопе JSM-840, при ускоряющем напряжении 20 кэВ и токе пучка, обеспечивающем скорость счета 2000–3000 имп/с.

С помощью качественного микроанализа по программе «X-Ray Analyser» выявляли присутствующие в образце элементы, идентифицируя на рентгеновском спектре характеристические пики для каждого элемента. По набору программ «ZAF-4/FLS» определяли концентрацию кальция. По набору программ «MAP» и «DIGIMAP» получали изображения анализируемых участков в характерис-

тическом рентгеновском излучении кальция, которые визуализировали концентрацию изучаемого элемента в тест-объемах различных участков регенератов.

Для анализа изображений использовали гистограммы. Измеряли содержание кальцифицированных в различной степени компонентов и их долю в общем объеме костной ткани. Получали также многоэлементные карты, которые строили посредством компьютерного назначения различных цветов разным элементам (рис. 2). Эти карты не содержали информации о концентрации элементов, но были полезны для определения наличия связи различных химических элементов друг с другом. Количественные данные обрабатывали статистически. Достоверность отличий определяли по параметрическому критерию Стьюдента и непараметрическому критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

Результаты

На основании рентгенологических, морфологических данных и результатов рентгеновского сканирования в I серии опытов выявлено, что при дозированном удлинении голени на 10 мм между отломками формируется дистракционный регенерат с четкой зональной структурой на 10-е сутки периода дистракции (рис. 3, а). К 45-му дню опыта (30 дней фиксации) регенерат имеет замыкательную пластинку и начинает формироваться костномозговой канал (рис. 3, б). На 30-е сутки фиксации клинически подвиж-

ности в зоне дистракционного регенерата не определялось и аппарат демонтировали.

Во II серии опытов — при большей скорости удлинения (2 мм в сутки) животные хуже переносят период дистракции. Формирование регенерата затягивалось во времени, структурная организация его проявлялась только к 10–20-м суткам периода фиксации при сниженном по сравнению с I серией содержании кальция на протяжении опыта на 10–12% (рис. 4).

При исследовании недекальцинированных полутонких срезов дистракционных регенератов отмечалась та же тенденция к нарастанию минерализации срединной прослойки к 25-м суткам фиксации, что и в I серии эксперимента, однако процентное содержание кальцифицированной ткани было значительно ниже (рис. 5).

При демонтаже аппарата на 30-е сутки фиксации (40 дней опыта) полного формирования кортикальной пластинки не происходило, отмечалась амортизирующая подвижность в зоне регенерата.

В III серии опытов после 5 дней удлинения голени производили трансплантацию аутокости в дистракционный регенерат. При сниженном темпе формирования регенерата и его структурной организации в периоде дистракции в данной серии на 10-е сутки фиксации остеогенез опережал течение этого процесса в преды-



Рис. 2.

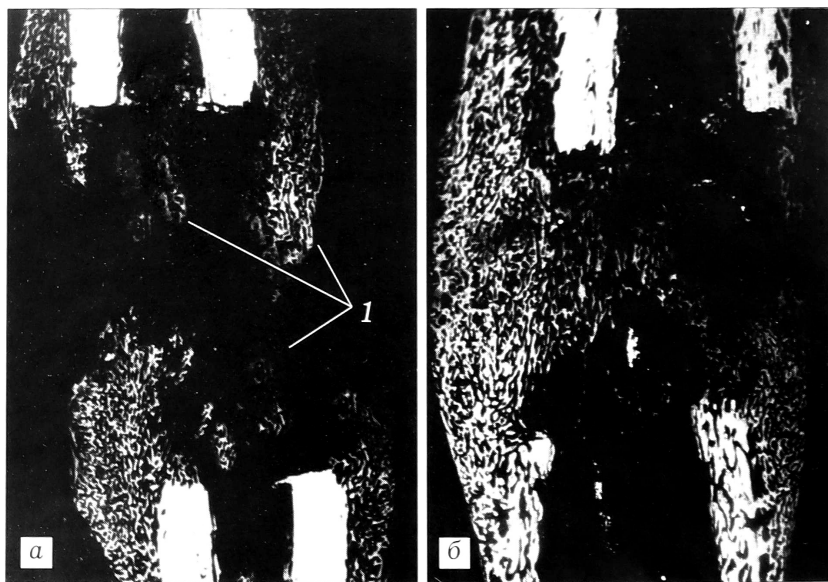


Рис. 3.

Рис. 2. Карта рентгеновского электронно-зондового микроанализа гистотопографического блока большеберцовой кости после 10 дней удлинения. Проксимальная часть регенерата. Ув. 12.

1 — костная ткань (корковый слой большеберцовой кости); 2 — новообразованные костные трабекулы слабоминерализованной консистенции, врастающие в диастаз и ориентированные по вектору силы растяжения; 3 — более минерализованные трабекулы.

Рис. 3. I серия опытов. Гистотопограммы: а — 10 дней дистракции (1 — периостальная часть регенерата); б — 30 дней фиксации.

тическом рентгеновском излучении кальция, которые визуализировали концентрацию изучаемого элемента в тест-объемах различных участков регенератов.

Для анализа изображений использовали гистограммы. Измеряли содержание кальцифицированных в различной степени компонентов и их долю в общем объеме костной ткани. Получали также многоэлементные карты, которые строили посредством компьютерного назначения различных цветов разным элементам (рис. 2). Эти карты не содержали информации о концентрации элементов, но были полезны для определения наличия связи различных химических элементов друг с другом. Количественные данные обрабатывали статистически. Достоверность отличий определяли по параметрическому критерию Стьюдента и непараметрическому критерию Вилкоксона—Манна—Уитни.

Результаты

На основании рентгенологических, морфологических данных и результатов рентгеновского сканирования в I серии опытов выявлено, что при дозированном удлинении голени на 10 мм между отломками формируется дистракционный регенерат с четкой зональной структурой на 10-е сутки периода дистракции (рис. 3, а). К 45-му дню опыта (30 дней фиксации) регенерат имеет замыкательную пластинку и начинает формироваться костномозговой канал (рис. 3, б). На 30-е сутки фиксации клинически подвиж-

ности в зоне дистракционного регенерата не определялось и аппарат демонтировали.

Во II серии опытов — при большей скорости удлинения (2 мм в сутки) животные хуже переносят период дистракции. Формирование регенерата затягивалось во времени, структурная организация его проявлялась только к 10–20-м суткам периода фиксации при сниженном по сравнению с I серией содержании кальция на протяжении опыта на 10–12% (рис. 4).

При исследовании недекальцинированных полутонких срезов дистракционных регенератов отмечалась та же тенденция к нарастанию минерализации срединной прослойки к 25-м суткам фиксации, что и в I серии эксперимента, однако процентное содержание кальцифицированной ткани было значительно ниже (рис. 5).

При демонтаже аппарата на 30-е сутки фиксации (40 дней опыта) полного формирования кортикальной пластинки не происходило, отмечалась амортизирующая подвижность в зоне регенерата.

В III серии опытов после 5 дней удлинения голени производили трансплантацию аутокости в дистракционный регенерат. При сниженном темпе формирования регенерата и его структурной организации в периоде дистракции в данной серии на 10-е сутки фиксации остеогенез опережал течение этого процесса в преды-

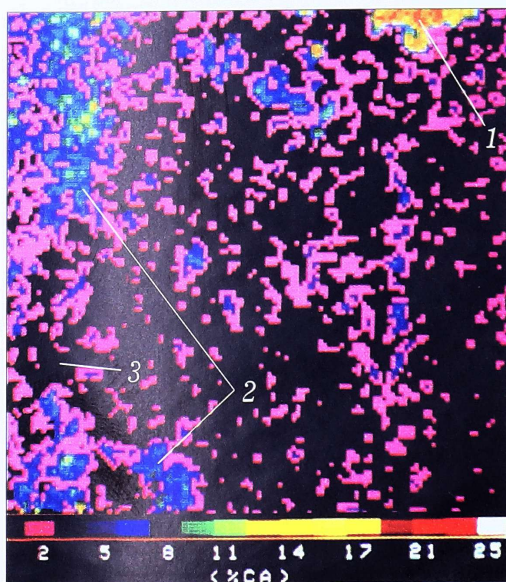


Рис. 2.

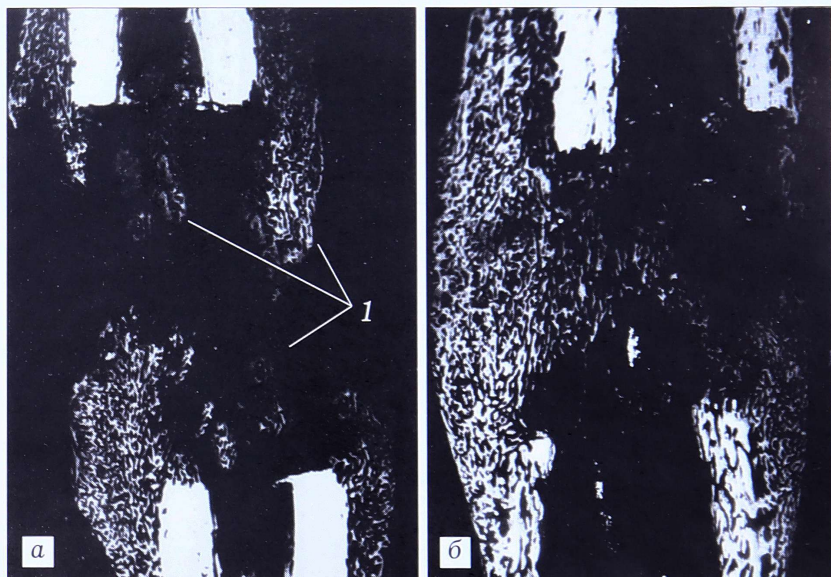


Рис. 3.

Рис. 2. Карта рентгеновского электронно-зондового микроанализа гистотопографического блока большеберцовой кости после 10 дней удлинения. Проксимальная часть регенерата. Ув. 12.

1 — костная ткань (корковый слой большеберцовой кости); 2 — новообразованные костные трабекулы слабоминерализованной консистенции, врастающие в диастаз и ориентированные по вектору силы растяжения; 3 — более минерализованные трабекулы.

Рис. 3. I серия опытов. Гистотопограммы: а — 10 дней дистракции (1 — периостальная часть регенерата); б — 30 дней фиксации.

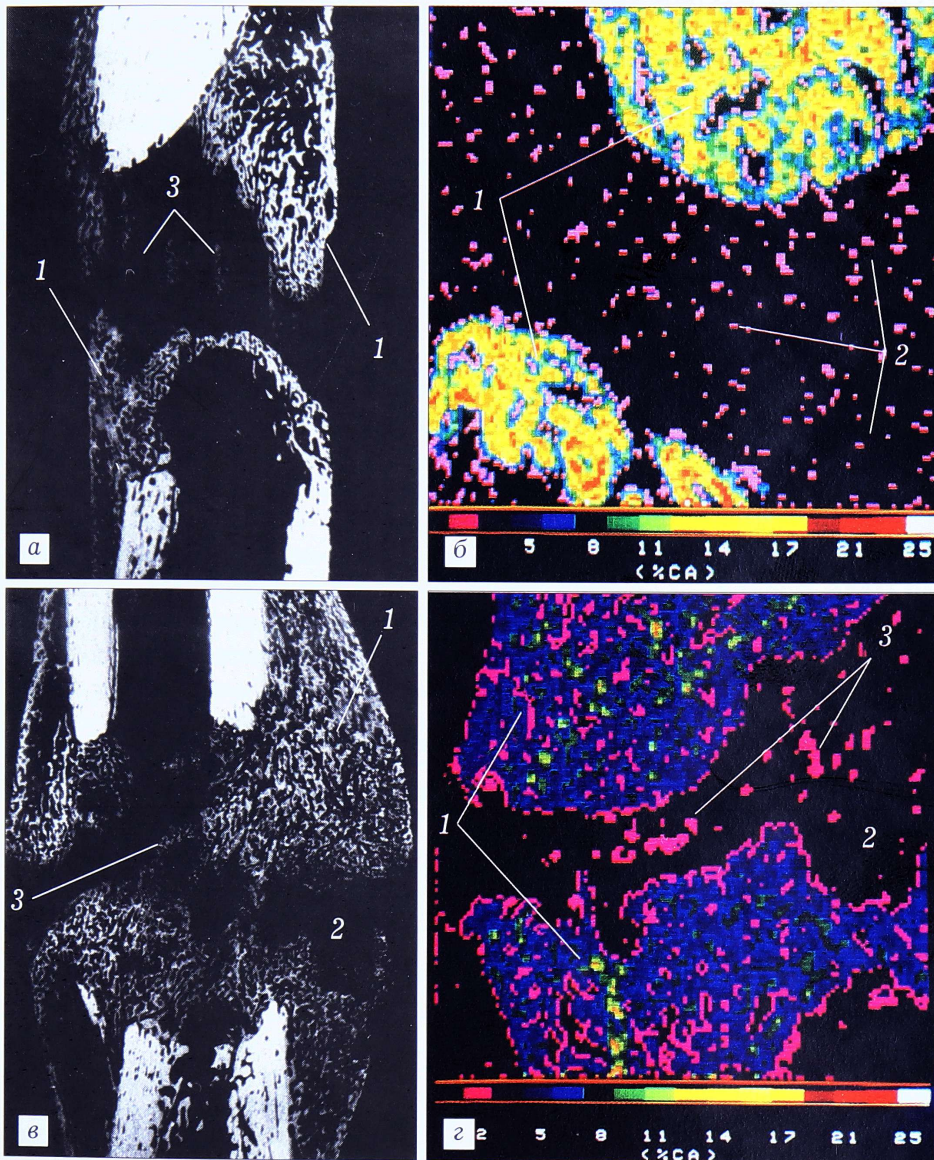


Рис. 4. II серия опытов. Гистотопограммы (а, в) и карты рентгеновского электронно-зондового микроанализа гистотопографического блока большеберцовой кости (б, г).

а, б — 20-е сутки,
в, г — 30-е сутки фиксации.
1 — периостальные трабекулярные структуры;
2 — срединная прослойка;
3 — эндостальные трабекулы, переходящие в «мостики», соединяющие отделы регенератов.

На 10-е сутки фиксации аутотрансплантат был окружен мелкопетлистой ячеистой губчатой костью так, что было трудно определить его границы (рис. 6). На 20-е сутки периода фиксации клинически подвижности в зоне регенерата не отмечалось. Аппарат демонтировали. На гистотопограммах определялась сформированная кортикальная пластинка, а при рентгеносканировании — зрелая костная ткань по всему поперечнику регенерата, что опережало подобные результаты в I серии опытов на 15, а во II серии на 20 дней.

дущих группах и по структурной характеристике соответствовал 30-м суткам фиксации во II серии.

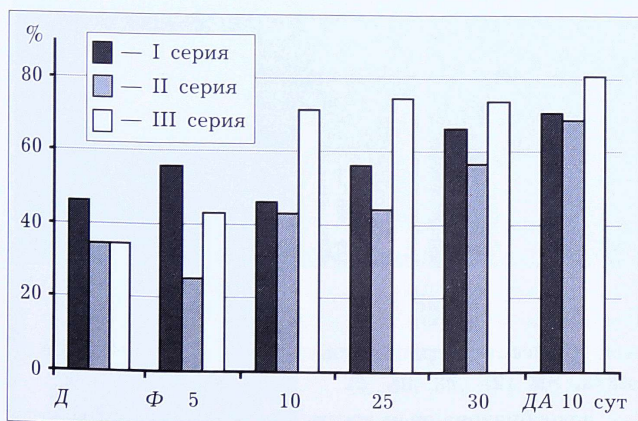


Рис. 5. Содержание кальцифицированной ткани (в %) в средней зоне distraction регенератов.
Д — distraction; Ф — fixation; ДА — демонтаж аппарата.

Обсуждение

Особенностью формирования новообразованной кости являлось то, что ведущим источником костеобразования был периост, кость в зоне удлинения увеличивалась в половину диаметра. В процессе формирования новой кости во всех сериях опытов происходила последовательная смена клеточных элементов от мало дифференцированных фибробластоподобных клеток до остеоцитов. В начальном периоде distraction (10-е сутки опыта) остеобласты были функционально неоднородны. Наиболее активные синтезировали белок, шли процессы образования волокон и их минерализации с участием остеоцитов, особенно во второй половине периода distraction (13–17-е сутки опыта) и в начале фиксации, когда в регенерате еще сохранялись очаги мягкотканной прослойки и слабоминерализованных костных трабекул.

Для дистракционных регенератов были характерны зональное строение и продольная ориентация трабекул. Середину регенерата занимала коллагеново-волоконистая прослойка со слабо кальцифицированной тканью, особенно во II серии опытов (см. рис. 4, б, г).

При исследовании недекальцинированных полутонких срезов дистракционных регенератов выявлялась интенсификация процессов биосинтеза сульфатированных гликозаминогликанов клетками срединной прослойки с накоплением их в межклеточных пространствах.

Степень минерализации в середине регенерата, по данным рентгеносканирования, в I серии опытов нарастала от 46,3% в конце периода дистракции до 66,2% к концу периода фиксации и снятию аппарата. Во II серии отмечалась та же тенденция к нарастанию минерализации срединной прослойки к 25-м суткам фиксации, но процентное содержание кальцифицированной ткани было снижено по сравнению с I серией (см. рис. 5).

Изменение темпа дистракции (2 мм в сутки) и проведенное комплексное исследование в динамике позволили выделить критерии компрометированного костеобразования по рентгеноморфологическим признакам (широкая прослойка, биосинтетическая деятельность остеобластов, активность фибробластов) и по микроэлементному составу новообразованной ткани в диастазе и в плазме крови.

Однотипные признаки компрометированного костеобразования в диастазе у 20 кроликов II серии послужили основой для выполнения III серии опытов с помещением в срединную зону регенерата костного ауто трансплантата, рассматриваемого главным образом как депо минералов. В перестройке ауто трансплантата наблюдалась

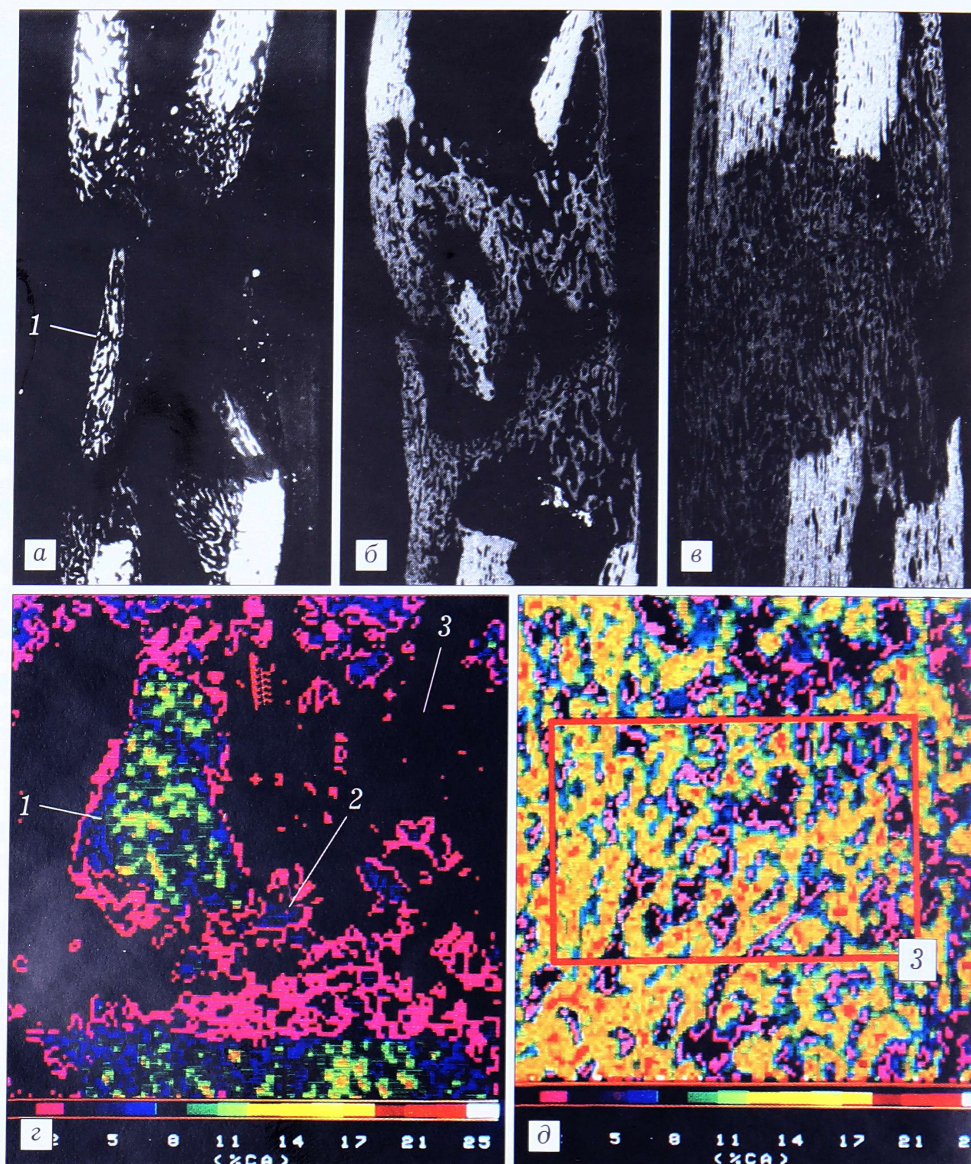


Рис. 6. III серия опытов. Гистотопограммы (а–в) и карты рентгеновского электронно-зондового микроанализа гистотопографического блока большеберцовой кости (г, д).

а — после пластики; б — 10-е сутки, в, г — 20-е сутки, д — 30-е сутки фиксации.

1 — ауто трансплантат; 2 — неминерализованные трабекулы; 3 — срединная прослойка.

синхронизация деструктивных и репаративных процессов, отмеченная ранее [3] при дистракции частично васкуляризованного трансплантата в дефекте. На 7–12-е сутки фиксации по периметру трансплантата встречались остеокласты, погибшие остеобласты и микрососуды. Содержание кальция в III серии опытов на 10-й день фиксации превышало показатель II серии на 28,2% и I серии на 25,3%, а на 25-е сутки фиксации — соответственно на 30,2 и 28,3%.

Динамика увеличения содержания кальция и ускорение процесса минерализации при компрометированном остеогенезе после трансплан-

тации в дистракционный регенерат аутокости свидетельствуют о стимулирующем действии последней. Конечный результат в этой серии опытов достигнут на 10–15 дней раньше, чем в других сериях.

На основании проведенных исследований был предложен способ лечения (приоритетная справка по заявке № 98104055 от 18.02.98), примененный нами у 12 пациентов в периоде фиксации. После трансплантации в дистракционный регенерат величиной 6–8 см аутокости фиксация прекращена через 30 дней у 4 больных, через 60 дней у 6 и через 90 дней у 2. После снятия аппарата иммобилизация конечности не проводилась.

Выводы

1. Дистракция оказывает формообразующее влияние на объемно-пространственную организацию регенерирующей костной ткани с преобладающим источником костеобразования у кролика со стороны периоста.

2. Увеличение темпа удлинения более чем до 1% от длины сегмента в сутки ведет к замедлению образования и органотипической перестройки дистракционного регенерата.

3. Клеточный состав срединной прослойки дистракционного регенерата меняется по мере его «созревания» от фибробластоподобных клеток, фибробластов, разной степени активности остеобластов (период дистракции) до остеоцитов (период фиксации).

4. Перестройка аутоотрансплантата в коллагеново-волокнистой прослойке регенерата начинается с гибели остеоцитов трансплантата, врастания в него капилляров и микроразрушений минерализованных структур остеокластами. Деструктивно-репаративный процесс протекает синхронно.

5. Содержание кальция в средней зоне регенерата по периодам удлинения конечности изменяется с разной скоростью и неоднозначно. Дистракция с ежедневным приростом в 1,6% от длины сегмента сопровождается уменьшением содержания кальция на 10–12%.

6. После удлинения голени у кроликов на 10 мм содержание кальция в регенерате составляет при темпе дистракции 1 мм в сутки 66,2%, 2 мм в сутки — 56,8%, при трансплантации аутокости — 73,7%.

7. Органотипическая перестройка дистракционного регенерата после костной аутопластики

ускоряется в эксперименте на 10–15 дней; в клинической практике после аутоотрансплантации возможно прекращение фиксации через 1–2 мес.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.с. 1507358 СССР. Способ удлинения истонченной с укорочением кости /Хавико Т.И., Андрианов В.Л., Поздеев А.П. //Бюл. изобрет. — 1989. — N 34.
2. Барабаш А.А. Свободная костная пластика дистракционного регенерата при ортопедической патологии (экспериментально-клиническое исследование): Дис. ... канд. мед. наук. — Иркутск, 1999.
3. Барабаш А.П. Замещение дефектов длинных трубчатых костей по Илизарову (экспериментальное исследование): Дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1985.
4. Барабаш А.П., Ирьянов Ю.М., Барабаш А.А. //Пленум правления Ассоциации ортопедов и травматологов России, 3-й: Материалы. — СПб; Уфа, 1998. — С. 351–354.
5. Барабаш Ю.А. Ортопедическая реабилитация больных с дефектами длинных костей нижней конечности: Дис. ... канд. мед. наук. — Иркутск, 1997.
6. Барабаш Ю.А., Гаркуша Л.Г., Барабаш А.П. //Конгресс травматологов-ортопедов России: Материалы. — Ярославль, 1999. — С. 50–51.
7. Волков М.В., Гришин И.Г., Махсон Н.Е., Лаврищева Г.И. и др. //Всерос. съезд травматологов-ортопедов, 4-й: Тезисы докладов. — Куйбышев, 1984. — С. 183–185.
8. Гюльназарова С.В., Штин В.П. Лечение ложных суставов. Теория и практика метода дистракции. — Екатеринбург, 1992.
9. Ирьянов Ю.М. Репаративное костеобразование в условиях дистракционного остеосинтеза (экспериментально-морфологическое исследование): Дис. ... д-ра биол. наук. — Курган, 1997.
10. Макушин В.Д. Лечение по Илизарову больных с дефектом костей голени: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Пермь, 1987.
11. Моргун В.А., Самков А.С. //Съезд травматологов-ортопедов СССР, 5-й: Труды. — М., 1988. — С. 40.
12. Миразимов Б.М. Компрессионно-дистракционный метод в детской ортопедии. — Ташкент, 1996.
13. Оноприенко Г.А. Васкуляризация костей при переломах и дефектах. — М., 1995.
14. Пат. 94013185 РФ. Способ стимуляции репаративного процесса кости /Шевцов В.И., Попков А.В. //Бюл. изобрет. — 1996. — N 22.
15. Савельев В.И., Корнилов Н.В., Сивков С.Н. //Ортопед. травматол. — 1989. — N 9. — С. 35–36.
16. Стахеев И.А. Реваскуляризация крупных диафизарных костных ауто-, алло и ксенотрансплантатов в условиях стабильного остеосинтеза (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Свердловск, 1977.

