

В.Ю. Лебединский³, М.Э. Пусева^{1,2}, Е.С. Нетесин², И.Н. Михайлов¹**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИСТРАКЦИОННОГО РЕГЕНЕРАТА КОСТЕЙ ПРЕДПЛЕЧЬЯ КРОЛИКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**¹ ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, Россия² ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Иркутск, Россия³ ФГБОУ ВПО «Иркутский национальный исследовательский технический университет», Иркутск, Россия

При изучении особенностей репаративного костеобразования в условиях эксперимента, отмечено, что в современной литературе по изучению структуры костного регенерата в основном описаны качественные характеристики его изменений. В то же время количественные параметры оценки регенераторных процессов при заживлении переломов костей предплечья в доступной литературе практически отсутствуют, что не позволяет объективно оценить особенности их течения.

Цель исследования – разработка и проведение количественной оценки регенераторного процесса при удлинении костей предплечья в эксперименте с использованием морфометрических методов исследования. В выполненном исследовании проведена не только качественная, но и количественная оценка структуры при перестройке дистракционного регенерата костей предплечья кролика с использованием морфометрии. Динамика процесса формирования и ремоделирования дистракционного костного регенерата в эксперименте еще полностью не завершается в сроки проведенного эксперимента – к 20-м суткам фиксации. Так относительный объем сосудов в регенерате увеличивается на 70 %, а количество клеток возрастает на 60 %, при этом относительный объем тканевых структур в регенерате ниже, чем в интактной кости. По этим показателям можно судить о незавершившемся в нем процессе костеобразования.

Ключевые слова: костный дистракционный регенерат, морфология

QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF DISTRACTION FORELIMB BONE GRAFT IN RABBITS IN EXPERIMENTV.Yu. Lebedinskiy³, M.E. Puseva^{1,2}, E.S. Netyosin², I.N. Mikhailov¹¹ Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk² Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk³ Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk

The study involved using morphometry in quantitative and qualitative evaluation of reconstruction of rabbit forelimb distracted bone graft. The dynamics of bone graft remodeling process revealed during the experiment showed that relative vascular volume in the bone graft was 70 % increased, cell number was 60 % higher, meanwhile relative volume of tissue structures in the bone graft was lower than in the noninvolved bone. All those parameters can indicate that there is an ongoing process of osteogenesis in the graft.

Key words: distraction bone graft, morphology

В современной литературе по изучению структуры костного регенерата в основном описаны качественные характеристики его изменений [5, 6, 7, 8]. В то же время количественные параметры оценки регенераторных процессов при заживлении переломов костей предплечья в доступной литературе практически отсутствуют, что не позволяет объективно оценить особенности их течения.

В связи с этим, **целью** выполненной работы явились разработка и проведение преимущественно количественной оценки регенераторного процесса при заживлении переломов костей предплечья с использованием морфометрических методов исследования.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

Содержание животных, оперативные вмешательства и их эвтаназию осуществляли согласно требованиям приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г., а также руководствуясь требованиями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в

иных научных целях» с соблюдением этических норм и гуманного отношения к объектам изучения.

Критериями включения животных (кролики – *Oryctolagus cuniculus*; класс млекопитающих – *Mammalia*; отряд грызунов – *Rodentia*; семейство заячьих – *Leporidae*; порода – Шиншилла) в эксперимент были их стандартизация: по полу (мужской), возрасту (6–7 мес.), весу – 3,0 (2,895–3,000) кг и длине костей предплечья – 7,15 (7,0–7,2) см. Из особенностей строения костей предплечья у кроликов следует отметить то, что лучевая и локтевая кости у них между собой соединены межкостной мембраной, которая по плотности близка к костному веществу, а их движений относительно друг друга в сочленениях нет [12].

По методу Г.А. Илизарова прооперировано 14 животных. Дистракцию начинали выполнять на 5-е сутки со дня операции с темпом 1 мм в сутки, (дискретно во времени 0,25 мм × 4 раза в сутки). Продолжительность дистракции составляла 10 суток.

Всем животным были выполнены на разных сроках эксперимента (до операции, после операции, 10-е сутки дистракции, 10 и 20 суток фиксации в АВФ)

рентгенографическое исследование передней конечности, мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ), гаммасцинтиграфия. Анализ полученных при этом результатов проведен и обсужден в более ранних публикациях [9, 10, 11, 12].

Также на материале от всех экспериментальных животных проводили морфологическое исследование костного регенерата с использованием количественных методов оценки его морфофункционального состояния. Сроки изучения регенерата (10 и 20 суток) выбраны в соответствии с данными литературы [3, 4, 6].

После эвтаназии, из оперированной конечности кроликов выпиливался участок кости высотой 1,5 см, в центре которого находился дистракционный регенерат размером 1 см. После фиксации и проводки из него изготавливались срезы толщиной 10–12 мкм, окраска которых производилась гематоксилин-эозином и по методике Ван Гизона. Изготовление и окраска срезов проводились по общепринятым методикам [1].

Морфометрические исследования выполнялись с использованием окулярной сетки и системы анализа изображений [1, 2]. В регенерате определялся относительный объем сосудов и тканевых структур. В последних выявляли количество клеток и межклеточного вещества. Кроме того, в межклеточном веществе были определены оссифицированные и неоссифицированные структуры.

При анализе полученного морфометрического материала в регенерате рассчитывались три группы индексов: сосудисто-тканевые отношения, клеточно-тканевые взаимоотношения, индекс оссификации, который определяли путем деления количества оссифицированных элементов на количество неоссифицированных структур.

Сосудисто-тканевые отношения и клеточно-тканевые взаимоотношения рассчитывались путем деления относительного объема сосудов и клеток на количество соответствующих тканевых структур.

На основании полученных результатов можно отметить, что относительный объем сосудов в интактной кости в среднем составил $7,2 \pm 0,4$ %, а количество тканевых структур было равно $92,8 \pm 2,6$ %. Среди них в интактной кости $10,4 \pm 1,64$ % их относительного объема занимали клетки, а $89,6 \pm 2,8$ % – межклеточное вещество (табл. 1).

На основании полученных результатов, можно отметить, что относительный объем сосудов в интактной кости в среднем составил $7,2 \pm 0,4$ %, а количество тканевых структур было равно $92,8 \pm 2,6$ %. Среди них в интактной кости $10,4 \pm 1,64$ % относительного объема занимали клетки, а $89,6 \pm 4,8$ % – межклеточное вещество.

При анализе динамики изменений количественных характеристик структурной перестройки регенерата были получены следующие результаты.

На 10-е сутки фиксации в аппарате внешней фиксации в регенерате отмечается увеличение относительного объема сосудов до $11 \pm 1,07$ %, а количество тканевых элементов соответственно снижалось до $89 \pm 3,21$ %. Среди них относительный объем клеток был равен $12,4 \pm 0,79$ %, а межклеточное вещество уменьшилось до $87,6 \pm 2,37$ %. Из этого его объема $33,50 \pm 1,49$ % составили оссифицированные структуры костного регенерата, а $66,50 \pm 3,35$ % – неоссифицированные элементы. Вероятно, этот эффект можно объяснить развитием воспалительного процесса, сопровождающегося сосудистыми и клеточными реакциями.

На 20-е сутки фиксации в АВФ в регенерате отмечается незначительное увеличение относительного объема сосудов по сравнению с предыдущим сроком на 13 %, и он в среднем стал равен $12,48 \pm 1,38$ %. В то же время количество тканевых структур в нем соответственно уменьшилось до $87,52 \pm 3,14$ %. Также изменились количественные характеристики тканевых структур регенерата. Так количество клеток в нем незначительно увеличилось и составило $16,4 \pm 1,64$ %, а межклеточное вещество уменьшилось до $83,6 \pm 3,92$ %, в то же время относительный объем оссифицированных структур от общего объема межклеточного вещества составил $38,37 \pm 2,15$ %, а объем не оссифицированных элементов на данном сроке эксперимента снизился до $61,63 \pm 3,73$ %.

С целью объективизации оценки динамики формирования костного регенерата использовалась индексная оценка его морфофункциональных изменений (табл. 2).

Оценка динамики сосудисто-тканевых отношений показала, что на 10-е сутки фиксации в АВФ соотношение сосудов и ткани в регенерате составило 0,136 (0,087–0,163). На 20-е сутки фиксации они также были равны 0,136 (0,087–0,190). Достоверных отличий в значениях исследуемых параметров между

Таблица 1
Количественная характеристика структурных элементов костного регенерата (%)

Сроки наблюдения	Количество					
	сосудов	тканевых структур	клеток	межклеточного вещества	оссифицированных структур	неоссифицированных структур
			(тканевые структуры)		(межклеточное вещество)	
10 суток	$11 \pm 1,07$	$89 \pm 3,21$	$12,4 \pm 0,79$	$87,6 \pm 2,37$	$33,50 \pm 1,49$	$66,50 \pm 3,35$
20 суток	$12,48 \pm 1,38$	$87,52 \pm 3,14$	$16,4 \pm 1,64$	$83,6 \pm 3,92$	$38,37 \pm 2,15$	$61,63 \pm 3,73$
Интактная кость	$7,2 \pm 0,4$	$92,8 \pm 2,6$	$10,4 \pm 1,64$	$89,6 \pm 2,8$	≈ 100 %	≈ 0 %

Индексная оценка морфофункционального состояния костного регенерата

Динамика показателей	Интakтная кость	Длительность наблюдения		Значимость различий
		10 суток	20 суток	
Сосудисто-тканевые отношения (количество сосудов / ткань)	0,078 (0,065–0,191)	0,136 (0,087–0,163)	0,136 (0,087–0,190)	$p > 0,05$
Клеточно-тканевые структуры (количество клеток / межклеточное вещество)	0,116 (0,103–0,124)	0,136 (0,112–0,190)	0,190 (0,136–0,250)	$p < 0,05$
Индекс оссификации	–	0,51 (0,46–0,54)	0,62 (0,55–0,72)	$p < 0,05$

выборками (10-е и 20-е сутки фиксации) в эксперименте не обнаружено ($p = 0,362$)

Оценка динамики значений индекса соотношения клеточно-тканевых взаимоотношений показала, что на 10-е сутки фиксации в АВФ он составил 0,136 (0,112–0,190), а на 20-е сутки фиксации – 0,190 (0,136–0,250). Отмечаются достоверные отличия в значениях исследуемых параметров между выборками, которые указаны в таблице 2.

Таким образом, динамика процесса формирования и ремоделирования дистракционного костного регенерата костей предплечья в эксперименте еще полностью не завершается в сроки проведенного эксперимента – к 20-м суткам фиксации. Это объясняется тем, что имеются выраженные достоверные отличия от их характеристик в интактной кости. Так, относительный объем сосудов в регенерате увеличивается на 70 %, а количество клеток возрастает на 60 %, при этом относительный объем тканевых структур ниже, чем в интактной кости. По этим параметрам можно судить о незавершившемся процессе костеобразования в зоне регенерата и его эффективности.

При анализе изменений абсолютных характеристик морфофункциональной перестройки регенерата в сравнении с интактной костью были выявлены достоверные их различия. В то же время при их сравнении по разным срокам фиксации имеются лишь незначительные достоверные отличия только по одному параметру.

Так, если в срок 10 суток значений индекс оссификации составил 0,51 (0,46–0,54), то на 20-е сутки наблюдений он вырос только на 20 % и составил 0,62 (0,55–0,72). Анализ динамики изменения значений этого индекса в зависимости от длительности наблюдения показывает, что его увеличение происходит при $p < 0,05$, что свидетельствует об интенсивности регенераторного процесса.

Используемые индексные оценки эффективности регенераторных процессов имеют значительно большие достоверные различия полученных результатов не только по сравнению с интактной костью, чем в динамике (10, 20 суток) эксперимента.

Следовательно, использование индексной оценки регенераторных процессов при заживлении переломов костей предплечья позволяет объективизировать его в большей степени, чем при использовании количественной оценки и, тем более, чем при изучении качественных параметров.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. – М.: Медицина, 1980. – 382 с.
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
3. Автандилов Г.Г. (1990). Medical morphometry: guidelines [Medicinskaja morfometrija: rukovodstvo], 384.
4. Барабаш А.П. Чрескостный остеосинтез при замещении дефектов длинных костей. – Иркутск, 1995. – 208 с.
5. Барабаш А.П., Соломин Л.Н. «Эсперанто» проведения чрескостных элементов при остеосинтезе аппаратом Илизарова. – Новосибирск: Наука, Сибирское предприятие, 1997. – 188 с.
6. Барабаш А.П., Соломин Л.Н. (1997). Esperanto of transosseous elements insertion in osteosynthesis by Ilizarov device [«Jesperanto» provedenija chreskostnyh jelementov pri osteosinteze apparatom Ilizarova], 188.
7. Илизаров Г.А. Основные принципы остеосинтеза компрессионного и дистракционного // Ортопедия, травматология и протезирование. – 1971. – № 1. – С. 7–11.
8. Илизаров Г.А. (1971). Basic principles of compressive and distractive osteosynthesis [Osnovnye principy osteosinteza kompressionnogo i distrakcionnogo]. *Ortopediya, travmatologiya i protezirovaniye*, 1, 7–11.
9. Ковалева А.В. Количественная и качественная оценка дистракционного регенерата при удлинении конечностей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Курган, 2007. – 24 с.
10. Ковалиова А.В. (2007). Quantitative and qualitative evaluation of distraction bone graft in bone lengthening: Abstract of dissertation of candidate of medical science [Kolichestvennaja i kachestvennaja ocenka distrakcionnogo regenerata pri udlinenii konechnostej: avtoref. dis. ... kand. med. nauk], 24.
11. Михайлов И.Н. Способ стимуляции перестройки дистракционного регенерата при удлинении костей предплечья по Илизарову // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 2. – С. 93–94.

Mikhailov IN (2008). Method of stimulation of reconstruction of distraction bone graft in forearm bones lengthening by Ilizarov method [Sposob stimuljacji perestrojki distrakcionnogo regenerata pri udlinenii kostej predplech'ja po Ilizarov]. *Bjull. VSNC SO RAMN*, 2, 93-94.

8. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л., Федин А.Н. Анатомия кролика. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2009. – 356 с.

Nozdrachiov AD, Polyakov EL, Fedin AN (2009). Rabbit anatomy [Anatomija krolika], 356.

9. Пусева М.Э., Лебединский В.Ю., Михайлов И.Н., Селиверстов П.В. и др. Комплексная характеристика дистракционного регенерата костей предплечья в эксперименте // Гений ортопедии. – 2013. – № 4. – С. 84–90.

Puseva ME, Lebedinskiy VY, Mikhailov IN, Seliverstov PV et al. (2013). Complex characteristic of distraction forelimb bone graft in experiment [Kompleksnaja harakteristika distrakcionnogo regenerata kostej predplech'ja v eksperimente]. *Genij ortopedii*, 4, 84-90.

10. Пусева М.Э., Лебединский В.Ю., Селиверстов П.В., Михайлов И.Н. и др. Влияние стимуляции БАТ на состояние дистракционного регенерата костей предплечья в эксперименте // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2013. – № 8. – С. 60–67.

Puseva ME, Lebedinskiy VY, Seliverstov PV, Mikhailov IN et al. (2013). Influence of biologically active points stimulation on the state of distraction forelimb bone graft in experiment [Vlijanie stimuljacji BAT na sostojanie

distrakcionnogo regenerata kostej predplech'ja v eksperimente]. *Sibirskiy meditsinskiy jurnal (Irkutsk)*, 8, 60-67.

11. Пусева М.Э., Михайлов И.Н., Лебединский В.Ю., Верхозина Т.К. и др. Изучение костной регенерации при проведении чрескостных элементов через акупунктурные точки методом гаммасцинтиграфии в эксперименте // Гений ортопедии. – 2015. – № 2. – С. 57–64.

Puseva ME, Mikhailov IN, Lebedinskiy VY, Verkhozina TK et al. (2015). Study of bone regeneration in insertion of transosseous elements through acupuncture points by gammascintigraphy in experiment [Izuchenie kostnoj regeneracii pri provedenii chreskostnyh jelementov cherez akupunkturnye tochki metodom gammascintigrafii v jeksperimente]. *Genij ortopedii*, 2, 57-64.

12. Пусева М.Э., Михайлов И.Н., Лебединский В.Ю., Верхозина Т.К. и др. Особенности дистракционного костного регенерата в эксперименте при хроническом раздражении биологически активных точек // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 2, Ч. 2. – С. 152–160.

Puseva ME, Mikhailov IN, Lebedinskiy VY, Verkhozina TK et al. (2013). Peculiarities of distraction bone graft in experiment in chronic irritation of biologically active points [Osobennosti distrakcionnogo kostnogo regenerata v jeksperimente pri hronicheskom razdrazhenii biologicheski aktivnyh toček]. *Bjull. VSNC SO RAMN*, 2 (2), 152-160.

Сведения об авторах

Information about the authors

Лебединский Владислав Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель научно-исследовательской лаборатории мониторинга физического здоровья ФГБОУ ВПО «Иркутский национальный исследовательский технический университет»

Lebedinskiy Vladislav Yuryevich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Research Supervisor of Scientific-Research Laboratory of Physical Health Monitoring at Irkutsk National Research Technical University

Пусева Марина Эдуардовна – кандидат медицинских наук, доцент, заведующая травматолого-ортопедическим отделением ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», доцент кафедры травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: (3952) 29-03-65; e-mail: scrrs.irk@gmail.com)

Puseva Marina Eduardovna – Candidate of Medical Science, Docent, Head of the Department of Traumatology and Orthopedics of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Assistant Professor of the Department of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education (664003, Irkutsk, ul. Bortsov Revolutsii, 1; tel.: +7 (3952) 29-03-65; e-mail: scrrs.irk@gmail.com)

Нетесин Евгений Станиславович – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России

Netiosin Yevgeniy Stanislavovich – Candidate of Medical Science, Senior Lecturer at the Department of Anesthesiology and Resuscitation of Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education

Михайлов Иван Николаевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Mikhailov Ivan Nikolayevich – Candidate of Medical Science, Senior Scientific Officer of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology