

УДК 611.161:616.748.41–001.5–089.227.84–092.9

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАПИЛЛЯРОВ
ЭНДОМИЗИЯ ПЕРЕДНЕЙ БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ МЫШЦЫ ПРИ
ДИСТРАКЦИОННОМ ОСТЕОСИНТЕЗЕ ПО ИЛИЗАРОВУ****Филимонова Г.Н.**

*ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»
им. академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Курган, e-mail: mailto:galnik.kurgan@mail.ru*

В экспериментах на 8 взрослых беспородных собаках осуществляли удлинение голени по 1,0 мм в день с 4-кратной дробностью. В результате ультраструктурно-стереологического анализа капилляров эндомизия передней большеберцовой мышцы установлено, что повышенная нагрузка на контралатеральную конечность в периоде distraction обуславливает значительно большую потребность в адгезии эндотелиоцитов и активизацию транспортной системы микропиноцитозных везикул лишь в периоде фиксации. В условиях distraction конечности параметры капилляров свидетельствуют об интенсификации окислительно-восстановительных процессов в сосудистом эндотелии в двух исследованных сроках эксперимента.

Ключевые слова: distraction, капилляры эндомизия, ультраструктура, стереометрия

**MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF THE CAPILLARIES
OF THE ANTERIOR TIBIAL MUSCLE ENDOMYSIUM UNDER DISTRACTION
OSTEOSYNTHESIS ACCORDING TO ILIZAROV****Filimonova G.N.**

*Federal State Budgetary Institution «Russian Ilizarov Scientific Center
«Restorative Traumatology and Orthopaedics» (FSBI «RISC RTO») of the RF Ministry of Health,
Kurgan, e-mail: mailto:galnik.kurgan@mail.ru*

Leg lengthening performed experimentally in eight adult mongrel dogs by 1,0 mm for 4 times daily. The results of ultrastructural-and-stereological analysis of the capillaries of the anterior tibial muscle endomysium have demonstrated that the increased loading of the contralateral limb in the period of distraction leads to significantly greater need for endotheliocyte adhesion and activation of the transport system of micropinocytosis vesicles only in the period of fixation. Under the conditions of limb distraction the stereological parameters of capillaries evidence of intensifying the oxidation-reduction processes in vascular endothelium in the two studied experimental periods.

Keywords: distraction, endomysium capillaries, ultrastructure, stereometry

Общеизвестна закономерность, открытая профессором Г.А. Илизаровым, о стимулирующем влиянии дозированного напряжения растяжения на морфогенез костной и параоссальных тканей [1]. В процессе формирования костного регенерата в нем образуется «зона роста», от которой идет рост тканей в противоположных направлениях. Эта закономерность роста под влиянием distraction характерна для кости, кожи, сосудов, нервов, мышц. Предложенный Г.А. Илизаровым аппарат внешней фиксации позволяет уравнивать значение биологических и механических факторов, создавая оптимальное их сочетание. В результате в кратчайшие сроки нормализуется крово- и лимфообращение в конечности, которая начинает выполнять обычные функциональные нагрузки [4].

Исследования ангиогенеза и поиск факторов, влияющих на него, были начаты J. Folkman в середине 70-х годов XX века, позднее им были выделены белковые ангиогенные факторы, стимулирующие рост кровеносных сосудов различного калибра. Известно несколько десятков таких факторов,

из которых наиболее обсуждаемыми являются фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF) и ангиогенин (ANG). В ряде исследований показана роль этих факторов в неоангиогенезе, возникающем в ответ на гипоксию тканей [1, 17, 29]. Наиболее интересным представляется комплексное применение реконструктивных сосудистых операций, направленных на восстановление магистрального кровотока с генно-инженерными методами стимуляции ангиогенеза, направленных на развитие микроциркуляторного русла и улучшения перфузии дистальных отделов тканей [2, 6, 28]. Установлено, что в условиях distraction усиливается ангиогенез за счёт напряжения растяжения в костной ткани [30], новообразование микрососудов необходимо для формирования костных трабекул в процессе distractionного остеосинтеза [16]. Показано, что остеогенез при distraction стимулирует ангиогенез в прилежащих мышцах [24], развитие сосудов в процессе дозированного удлинения идёт путём последовательного внутримышечного ангиогенеза вслед за внутрикостным ангиогенезом [21]. В раз-

личных адаптационных и патологических процессах морфологические и количественные изменения сосудов отмечены многими исследователями [3, 22, 20]. Работами, проведенными в РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова, выявлены морфофункциональные изменения в тканях при удлинении конечностей в эксперименте [4, 5]. Вместе с тем, ультраструктурно-стереометрические исследования эндотелия капилляров мышц немногочисленны [7]. Выявлены ультраструктурные особенности кровеносных капилляров большеберцовой мышцы удлиняемой голени, свидетельствующие о различных механизмах адаптации сосудистого эндотелия к дистракции в различных ритмах [11]. Сравнительный анализ капилляров эндомизия опытной и противоположной конечностей при дистракции в классическом режиме не проведен, что послужило поводом для данной работы.

Цель работы – морфологический и ультраструктурно-стереометрический анализ капилляров эндомизия передней большеберцовой мышцы голени в условиях дистракционного остеосинтеза с 4-кратной дробностью.

Материалы и методы исследования

В опытах на 8 взрослых беспородных собаках исследовали капилляры эндомизия передней большеберцовой мышцы обеих конечностей. Через 5 дней после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей начинали дозированное удлинение правой голени по 1,0 мм в день с 4-кратной дробностью, эксперименты выполнил д.м.н. С.А. Ерофеев. Все манипуляции на животных, их содержание и выведение из опыта проводили согласно приказу № 755 от 12.08.77 г. МЗ СССР: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Эвтаназию осуществляли передозировкой барбитуратов через 28 дней дистракции и месяц фиксации. Фрагменты передней большеберцовой мышцы оперированной и контралатеральной (условный контроль) конечностей иссекали в проекции костного регенерата, фиксировали в 2% растворе глутарового параформальдегида (рН 7,4) с добавлением 0,1% пикриновой кислоты, постфиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия, после обезвоживания и пропитки заключали в эпоксидные смолы. Используя ультратом "Nova" (Швеция), изготавливали поперечные ультратонкие срезы, которые контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по R. Reynolds [10]. Исследовали посредством трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100B при стандартном увеличении $\times 11800$. Изображения капилляров посредством фотоувеличителя совмещали с тестовой решеткой коротких отрезков, получая стандартное увеличение 44840, определяли: 1) число пересечений тестовой линии с контуром люминальной поверхности эндотелия капилляров (число единиц площади люминальной поверхности капилляра, T_p , усл. ед.); 1) долю объема, занимаемую цистернами гра-

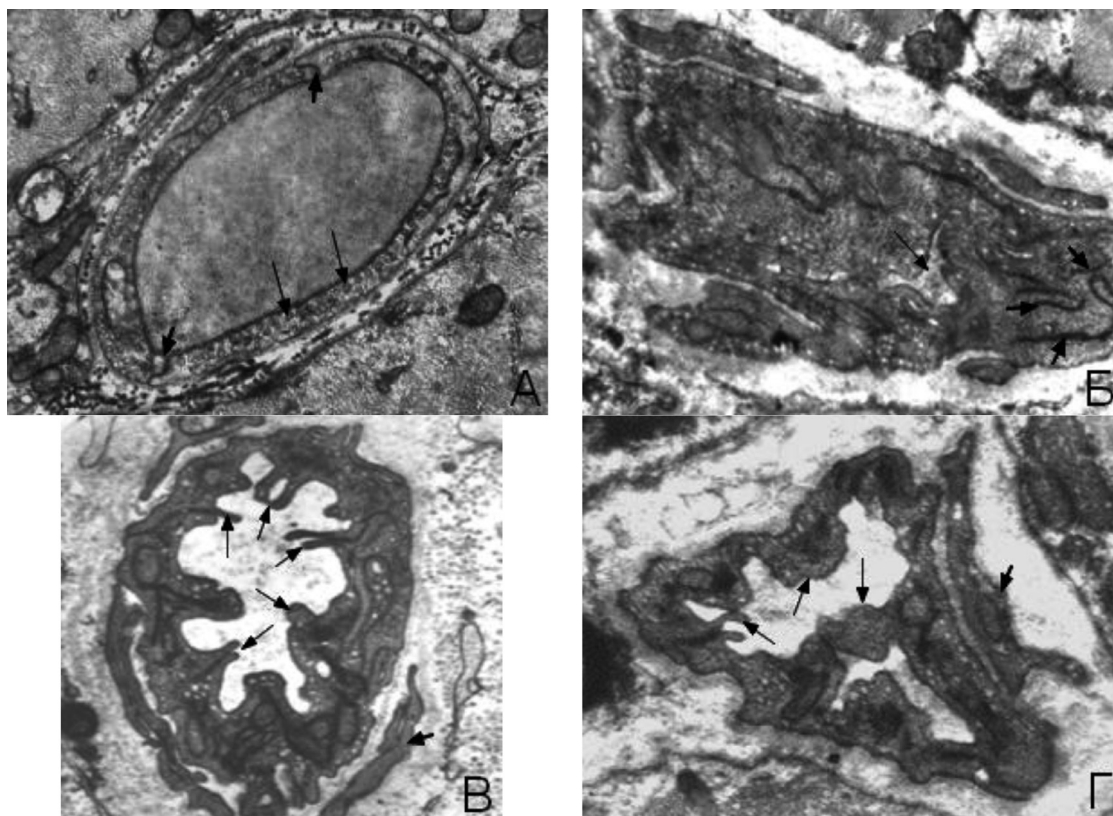
нулярного эндоплазматического ретикулаума (ГЭР) и 2) митохондрий (Мтх) в объеме всего эндотелия (объемная плотность $VV_{гэр}$, $VV_{мтх}$, %); 3) долю объема, приходящуюся на люминальные (люм.), базальные (баз.) и цитоплазматические (цит.) микропиноцитозные везикулы в объеме всего эндотелия (объемная плотность $VV_{люм.}$, $VV_{баз.}$, $VV_{цит.}$ везикул, %); 6) число пересечений тестовой линии с контурами межклеточных контактов (МКК) эндотелиоцитов в объеме всего эндотелия (поверхностная плотность $SV_{мкк}$, усл. ед.) [6]. Достоверность различий определяли на основании критерия Вилкоксона и рандомизации компонент для независимых выборок [8, 9].

Результаты исследования и их обсуждение

Исследованные капилляры соматического типа, эндотелий с непрерывной базальной мембраной [12]. Безъядерные отделы эндотелиоцитов истончены, бедны органеллами. В базальном слое капилляров локализуются 1–3 перицита с цитоплазматическими отростками (рис. В, Г). Наблюдались резервные капилляры с закрытым просветом, немногочисленными микровезикулами и цистернами эндоплазматической сети в цитоплазме (рис. Б). Люминальная поверхность эндотелиальных клеток образует цитоплазматические выросты, выпячивания внутрь просвета, чаще в зоне межклеточных контактов (рис. В, Г), что может свидетельствовать о реактивно измененных, а так же функционально активных капиллярах. Высокий эндотелий, многочисленные цитоплазматические выросты характерны и для растущих капилляров (рис. В) [4, 5]. Микропиноцитозная система эндотелиоцитов выражена хорошо, диаметр везикул варьирует, что может зависеть как от транспортных свойств эндотелия, так и от уровня прохождения среза. Эндотелиоциты капилляров с профилями ядер бобовидной, эллипсоидной, лопастной формы в поле зрения попадали изредка.

Площадь люминальной поверхности эндотелиальных клеток капилляров эндомизия достоверно не отличается в ипсилатеральной и противоположной конечностях, как в конце периода дистракции, так и через месяц фиксации голени в аппарате (таблица). Значения параметра существенно снижаются по окончанию периода фиксации, как в оперированной, так и в контралатеральной конечностях, составляя 58% и 47%, соответственно.

Гранулярный эндоплазматический ретикулум (ГЭР) представлен цистернами различной протяженности, чаще короткими, с тонковолокнистым содержимым средней электронной плотности. В конце периода дистракции относительный объем ГЭР в опыте и контроле не отличается достоверно (таблица).



Капилляры эндомизия передней большеберцовой мышцы: (А), (Б) Капилляры в конце периода дистракции. (В), (Г) Реактивно изменённые капилляры после месяца фиксации голени в аппарате: многочисленные люминальные выросты (стрелки), перicyты (короткие стрелки). (А) Функционирующий капилляр: микропиноцитозные везикулы (стрелки), зоны межклеточных контактов (короткие стрелки). (Б) Резервный капилляр с суженным просветом (стрелка), цистерны эндоплазматического ретикулума (короткие стрелки). Электронограммы, увеличение 11800х

Стереологические параметры капилляров эндомизия передней большеберцовой мышцы

Параметры	0,25x4 = 1,0 мм (I серия)			
	Дистракция 28 дней		Фиксация 30 дней	
	Опытная конечность	К/латеральная конечность	Опытная конечность	К/латеральная конечность
Тл, усл. ед.	20,76	22,59	11,98	10,53
SV _{мкк} ² , усл. ед.	0,1287	<u>0,1870</u>	0,073	0,0859
VV _{гпр} ² , %	0,265	0,234	0,451	<u>0,233</u>
VV _{мгх} ² , %	0,296	<u>0,130</u>	0,150	0,072
VV _{лв} ² , %	0,0799	0,0922	0,0959	<u>0,1485</u>
VV _{бв} ² , %	0,1226	0,1416	0,1245	0,1467
VV _{цв} ² , %	0,2181	0,1974	0,1997	0,1896

Примечание: Жирным шрифтом выделены значения параметров, достоверно отличающихся относительно предыдущего срока исследования; подчеркнуты достоверные различия между опытной и к/латеральной конечностями.

Через месяц фиксации данный параметр в оперированной конечности составляет 194% от значения контралатеральной (P < 0,05), увеличиваясь относительно пре-

дыдущего срока исследования и составив 170% (P < 0,05).

Митохондрии округлые, реже овальные, различных размеров. Объёмная плотность

этих органелл в эндотелиоцитах капилляров через месяц distraction в оперированной конечности составляет 228% от значения в контралатеральной ($P < 0,05$). Через месяц фиксации данный параметр в капиллярах обеих конечностей снижается почти вдвое относительно предыдущего срока опыта, составив, соответственно, 51% и 55% ($P < 0,05$). При этом относительный объем митохондрий опытной конечности составляет 181% от объема условно контрольной ($P < 0,05$).

Зоны межклеточных контактов разнообразной формы – от подковообразных стыков до зигзагоподобных сложных терминальных «засовов». Поверхностная плотность зон межклеточных контактов в эндотелиальных клетках капилляров через месяц distraction в оперированной конечности составляет 69% от значения в контралатеральной ($P < 0,05$). Через месяц фиксации голени в аппарате параметр значительно уменьшается в обеих конечностях, составив 57% и 46%, соответственно, от значений в периоде distraction. При этом в опытной конечности, аналогично предыдущему сроку, $SV_{МКК}$ несколько меньше по сравнению с контролем (85%).

В результате проведенного ультраструктурно-стереологического анализа были выявлены количественные отличия в организации эндотелия кровеносных капилляров эндомиция передней большеберцовой мышцы удлиняемой голени и контралатеральной. Функциональное значение межклеточных контактов – регуляция проницаемости капилляров и повышение адгезивных свойств эндотелиоцитов [13]. Предполагают, что сосудодвигательные реакции передаются путем электротонических потенциалов, формирующихся в области межклеточных контактов гладкомышечных и эндотелиальных клеток [26]. Очевидно, что большая протяженность зон межклеточных контактов эндотелия контралатеральной конечности в периоде distraction объясняется значительно возрастающей нагрузкой, повышая потребность в адгезии эндотелиоцитов, необходимостью усилить вазоконстрикторные (вазодилаторные) реакции микрососудов. Через месяц фиксации голени в аппарате значение параметра на опытной и противоположной конечностях существенно не отличались.

Объемная плотность ГЭР и митохондриального аппарата в эндотелии удлиняемой голени свидетельствовали об интенсивном биосинтезе и ускорении окислительно-восстановительных процессов, что объясняется рядом причин. Наряду с главной функцией – транскапиллярным обменом, эндотелиоци-

ты модулируют рост, метаболизм, функцию гладкомышечных клеток, секретируя вазоактивные вещества, наиболее важные из которых простагландин и эндотелиальный релаксирующий фактор [15]. При этом выделение вазоактивных веществ может стимулироваться как эндогенными веществами (ацетилхолином, аденозинтрифосфатазой, брадикинином), так и биофизическими условиями кровообращения (низкое напряжение кислорода, пульсовое растяжение сосудистой стенки, повышение вязкости крови). Обозначенные биофизические условия с большой вероятностью имеют место при distraction. Эндотелиальные клетки также синтезируют сильнодействующий вазоконстрикторный пептид – эндотеллин, участвуют в образовании тканевых мукополисахаридов, фибринолитических факторов, гистамина [21]. Факторы роста и цитокины, синтезируемые эндотелиоцитами именно капилляров, существенно влияют на другие клетки сосудистой стенки более крупных сосудов, так как представительство эндотелия капилляров значительно выше по сравнению с крупными сосудами: на 1 мм² мышечной ткани у собаки приходится 2630 капилляров [12]. В данной работе не представляется возможным конкретизировать, какие именно факторы синтезируются эндоплазматическим ретикуломом эндотелиоцитов, но можно предположить, что в условиях distraction увеличивается потребность в синтезе выше обозначенных факторов и через месяц фиксации эта потребность не снижается.

В условиях distraction, как известно, активизируются процессы ангиогенеза [4, 5], критическим фактором, влияющим на ангиогенез, является регионарная ишемия тканей организма. При этом возрастает количество специфических рецепторов на поверхности клеток кровеносных сосудов [14, 25], активируется взаимодействие АФР с ними и увеличивается их продукция, что приводит к активации перicyтов, фибробластов и клеток эндотелия, деградирует базальная мембрана сосудов, происходит миграция и пролиферация активированных клеток, формируется просвет нового сосуда и новая базальная мембрана, появляется новая капиллярная петля. Другим биологическим эффектом факторов роста является торможение апоптоза эндотелиальных клеток, приводящее к продлению сроков их функционирования [22, 23]. Скорость неоваскуляризации составляет от 0,23 до 0,8 мм/сут [19].

Таким образом, выявлены количественные отличия в организации эндотелия кровеносных капилляров эндомиция передней большеберцовой мышцы удлиняемой

голении и условно контрольной, свидетельствующие о повышенной нагрузке на контралатеральную конечность в период distraction и активизации гематканевого обмена лишь в периоде фиксации. Опытная конечность в ходе эксперимента отличалась существенным увеличением биосинтетической и метаболической активности эндотелиальных клеток кровеносных капилляров.

Список литературы

1. Авдеева С.В., Воронов Д.А., Хайдарова Н.В. и др. Рекомбинантный аденовирус птиц CELO-ANG, несущий ген ангиогенина человека, индуцирует неоваскуляризацию в передней большеберцовой мышце крысы // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2004. – № 4. – С. 38–40.
2. Давыденко В.В., Мачс В.М. Стимулированный ангиогенез – новое направление в лечении при ишемических состояниях // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2000. – № 1. – С. 117–120.
3. Дворецкий Д.П. и др. Роль эндотелия в локальных сосудистых реакциях скелетных мышц / Д.П. Дворецкий, А.Т. Матчанов, В.П. Недошивин, Н.Я. Шустова, В.Ф. Маликов // Физиологический журнал. – 1994. – № 2. – С. 49–58.
4. Илизаров Г.А. Значение факторов напряжения растяжения в генезе тканей и формообразовательных процессах при чрескостном остеосинтезе / Чрескостный остеосинтез в ортопедии и травматологии // Сб. научн. трудов. Курган, 1984. – № 9. – С. 4–41.
5. Илизаров Г.А., Кузнецова А.Б., Песчанский В.С., Щудло М.М., Ханес Г.С., Мигалкин Н.С. / Кровеносные сосуды при разных режимах distraction конечности // Архив АГЭ. – 1984. – № 5. – С. 49–55.
6. Константинов Б.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. и др. Возможности и перспективы лечения критической ишемии с использованием генно-инженерных технологий // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2003. – № 3. С. 14–17.
7. Королев В.В., Ахматов В.И., Стефанов С.Б. Количественное сравнение ультраструктур кровеносных капилляров и мышечных волокон на стадиях облитерирующего эндартериита // Архив патологии. – 1980. – № 7. – С. 58–63.
8. Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. Таблицы по математической статистике. – М.: Финансы и статистика, 1982. – 271 с.
9. Рунион Р. Справочник по непараметрической статистике. – М.: Финансы и статистика, 1982. – 198 с.
10. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир, 1975. – 325 с.
11. Филимонова Г.Н. Ультраструктурно-стереологический анализ кровеносных капилляров эндомизия передней большеберцовой мышцы при удлинении голени по Илизарову // Гений ортопедии. – 2002. – № 4. – С. 57–63.
12. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция. – М.: Медицина, 1984. – 432 с.
13. Шахламов В.А. Капилляры. – М.: Медицина, 1971. – 200 с.
14. Brogi E., Schatteman G., Tiange W. et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression // J. clin. Invest. – 1996. – № 2. – P. 469–476.
15. Busse R. Control of vascular tone by the endothelium // Haemostasis. – 1988. – № 2. – P. 50.
16. Fang T.D., Salim A., Xia W., Nacamuli R.P., Gucione S., Song H.M. Ired for successful bone induction during distraction osteogenesis // J. Bone Miner Res. – 2005. – № 7. – P. 1114–1124.
17. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. Circulation // 1998. – T. 97. – P. 1108–1110.
18. Gidlof A., Hammersen F., Larsson J. et al. Is Capillary Endotelium in Human Skeletal Muscle an Ischemic chock Tissue? Induced Skeletal Muscle Ischemia in Man // Symp. Linkoping, 1980. – P. 63–79.
19. Inser J.M., Asahara T. Therapeutic angiogenesis // Front. Bioscienc. – 1998. – Vol. 3. – P. 49–69.
20. Lindeboom J.A., Mathura K.R., Milstein D.M., Ince C. Microvascular soft tissue changes in alveolar distraction osteogenesis // Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. – 2008. – № 3. – P. 350–355.
21. Morgan E.F., Hussein A.I., Al-Awadhi B.A., et al. Vascular development during distraction osteogenesis proceeds by sequential intramuscular arteriogenesis followed by intraosteal angiogenesis // J. Bone. – 2012. – № 3. – P. 535–545.
22. Nicol S. Possible uses of gene therapy in reducing coronary stenosis. Editorial // Heart. – 1997. – Vol. – 78. – P. 426–428.
23. Nor J.E., Christensen J., Mooney D.J., Polverini P.J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression // Amer. J. Pathol. – 1999. – Vol. – 154. – P. 375–384.
24. Ohashi S., Ohnishi I., Kageyama T., Imai K. et al. Distraction osteogenesis promotes angiogenesis in the surrounding muscles / Clin. rthop. Relat Res. – 2007. – № 1. – P. 223–229.
25. Salcedo R., Wasserman K., Young H.A. et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells // Amer. Y. Pathol. – 1999. – Vol. 154. – P. 1125–1135.
26. Segal S.S., B.R. Duling. Conduction of vasomotor responses in arterioles: a role for cell-to-cell coupling? // Amer. J. Physiol. – 1989. – № 3. – P. H838–H845.
27. Schiffrin Ernesto L. Role of endothelin-1 in hypertension // Hypertension. – 1999. – № 4. – P. 876–881.
28. Wahlberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia // J. Vascular Surgery. – 2003. – № 1. – P. 198–203.
29. Yia-Hertulla S., Martin J. Cardiovascular gene therapy // Lancet. – 2000. – № 5. – P. 213–222.
30. Zheng L.W., Ma L., Cheung L.K. Angiogenesis is enhanced by continuous traction in rabbit mandibular distraction osteogenesis // J. Craniomaxillofac Surg. – 2009. – № 7. – P. 405–411.