

УДК 636.7:616.748.53-001.5-089.227-092.9

СТЕРЕОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИКРОНОЖНОЙ МЫШЦЫ ВЗРОСЛЫХ СОБАК В УСЛОВИЯХ ЧРЕСКОСТНОГО ДИСТРАКЦИОННОГО ОСТЕОСИНТЕЗА ГОЛЕНИ С РАЗЛИЧНОЙ ДРОБНОСТЬЮ

Филимонова Г.Н.

Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. академика Г.А. Илизарова, Курган, e-mail: galnik.kurgan@yandex.ru

Проведено морфологическое исследование икроножной мышцы взрослых беспородных собак. Дозированное удлинение голени осуществляли по 1,0 мм в сутки через 5 дней после закрытой флекссионной остеоклазии большеберцовой кости: в I экспериментальной группе (n = 16) дистракция проводилась по 0,25 мм за 4 приема в день, в группе II (n = 16) – методом круглосуточной автодистракции по 0,017 мм за 60 приемов, исследованы интактные животные (n = 3). Животных выводили из опыта передозировкой барбитуратов на 14 и 28 сутки дистракции, через месяц фиксации и через 1,5 года после снятия аппарата. Гистохимические препараты (активность АТФ-азы, рН 9,0) послужили для стереометрического анализа, рассчитывали: объемную плотность мышечных волокон (VV_{mf}), микрососудов (VV_{mv}), эндомизия (VV_{end}); численную плотность мышечных волокон и микрососудов (NA_{mf} , NA_{mv}), индекс васкуляризации (NA_{mv}/NA_{mf}). Установлено: при автодистракции в икроножной мышце имеет место усиленная васкуляризация в периоде удлинения, о чем свидетельствуют большая NA_{mv} и индекс васкуляризации. При 4-кратной дробности выявлено постдистракционное увеличение данных параметров лишь к 30 суткам фиксации. То есть автодистракция, приближенная по характеристикам к процессам естественного роста, является стимулирующим фактором для процессов новообразования и/или раскрытия резервных микрососудов в периоде удлинения. При 4-кратной дробности характерна отсроченная реакция сосудистого русла лишь в периоде фиксации со снижением микроциркуляции мышечной ткани в отдаленном периоде опыта. Подобная динамика стереометрических параметров была выявлена для передней большеберцовой мышцы. Таким образом, получена новая информация по миогистогенезу икроножной мышцы при дистракционном остеосинтезе голени, подчеркивается однонаправленность адаптационно-приспособительных реакций мышц голени в различных условиях дистракции, свидетельствующих о преимуществе круглосуточной автодистракции.

Ключевые слова: икроножная мышца, дистракция, дробность, стереометрия

STEREOLOGICAL ANALYSIS OF THE CANINE M. GASTROCNEMIUS UNDER THE LEG TRANSOSSEOUS DISTRACTION OSTEOSYNTHESIS OF VARIOUS DIVISION

Filimonova G.N.

National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Orthopaedics of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: galnik.kurgan@yandex.ru

A morphological study of m. gastrocnemius of adult mongrel dogs was performed. Graduated lengthening of the leg was made by 1.0 mm per day five days after closed flexion osteoclasia of the tibia: in experimental group I (n = 16) distraction was performed by 0.25 mm for four times daily, in group II (n = 16) – by the method of round-the-clock autodistraktion by 0.017 mm for 60 times, intact animals were examined (n = 3). The animals were taken out of the experiment on Day 14 and Day 28 of distraction using an overdose of barbiturates, after one month of fixation, on Day 180 after the fixator removal. Histochemical preparations (ATP-ase activity, pH 9.0) served for stereometric analysis, the following was calculated: volumetric density of muscle fibers (VV_{mf}), microvessels (VV_{mv}), endomysium (VV_{end}); number density of muscle fibers, microvessels (NA_{mf} , NA_{mv}), vascularization index (NA_{mv}/NA_{mf}). It was found that autodistraktion in the gastrocnemius muscle was accompanied by increased vascularization in the period of lengthening, as evidenced by large NA_{mv} and vascularization index. When using 4-fold division, the post-distraktion increase in these parameters was revealed only by Day 30 of fixation. Namely, autodistraktion which is close in characteristics to the processes of natural growth, is a stimulating factor for the processes of neoformation and/or the opening of reserve microvessels in the period of lengthening. In case of 4-fold division, a delayed response of the vascular bed is characteristic with a decrease in microcirculation in the long-term period of the experiment. The similar dynamics of stereometric parameters was revealed for the anterior tibial muscle. Thus, new information was obtained on m. gastrocnemius myohistogenesis, thereby emphasizing the unidirectionality of the adaptive responses of the leg muscles under various distraktion osteosynthesis conditions, indicating the advantage of round-the-clock autodistraktion.

Keywords: m. gastrocnemius, distraktion, division, stereometry

Проблема регенерации длинных трубчатых костей и взаимодействие их с прилежащими мышцами является актуальной в биологии и медицине. Это обусловлено частым травматизмом конечностей и необходимостью коррекции врожденных укорочений. Знание морфологических

особенностей окружающих кость тканей при различных воздействиях, может существенно сократить время лечения пациентов. Исследованиями передней большеберцовой мышцы в экспериментах по дистракционному остеосинтезу голени с темпом 1,0 мм в сутки с различной дроб-

ностью методами гистохимии, морфологии и стереометрии, электромиографии, информационного и статистического анализа установлено преимущество высокодетальной круглосуточной автодистракции либо автодистракции лишь в дневное время суток [1, 2]. Определены параллели количественных характеристик процессов естественного роста в раннем постнатальном периоде и индуцированных дозированным растяжением процессов при дистракции [3]. Исследованы капилляры эндомизия передней большеберцовой мышцы при дистракции с 4-кратной и 60-кратной дробностью методом ультраструктурно-стереологического анализа с применением математического аппарата теории информации [2]. Установлено, что в условиях 4-кратной дробности для эндотелия капилляров характерны признаки повышенной метаболической активности и интенсификации окислительно-восстановительных процессов, при этом отмечены минимальные значения коэффициента избыточности и абсолютной организации – показатели надежности системы, а также максимальные значения информационной и относительной энтропии. Продемонстрировано преимущество автодистракции, где коэффициент избыточности и абсолютная организация выше в 2,4 раза по сравнению с методом 4-кратной дробности в конце периода удлинения, значения информационной и относительной энтропии минимальны при автодистракции [2]. При удлинении голени по 0,5 мм в день за 2 приема выявлена нейрогенная атрофия волокон II типа в конце периода дистракции, что отражает бездействие мышц в этом периоде и атрофию всех волокон в конце периода фиксации; волокна различных типов группировались в кластеры [4]. Также денервационные изменения были выявлены в большеберцовой мышце при замещении пострезекционного дефекта голени аппаратом Илизарова в комбинации с цементным спейсером, такие как уменьшение диаметра волокон, рост числа дегенерировавших миоцитов (32,5%), жировая дистрофия [5]. Проанализирована реакция мышц голени на удлинение в различных ритмах, в том числе при автоматической дистракции с высоким темпом, особенности амплитуды М-ответов [6]. При автодистракции по 1,0 мм на 30 день фиксации в большеберцовой и икроножной мышцах была снижена амплитуда М-ответа по сравнению с исходным уровнем на 53,6% и 62,8% соответственно. При высокой скорости автодистракции по 3,0 мм отмечались более выраженные реактивные изменения, такие как застойное полнокровие, околососуди-

стые кровоизлияния, мукоидное набухание эндомизия, утолщение листков капсулы в мышечных веретенах, пикноз ядер интрафузальных мышечных волокон. Амплитуда М-ответа передней большеберцовой и икроножной мышц была снижена соответственно на 79,4% и 77,9% [6]. При автодистракции с высоким темпом в сочетании с интрамедуллярным армированием большеберцовой кости титановым стержнем с гидроксипатитным покрытием были созданы благоприятные условия не только для остеогенеза, а также для адаптации и роста прилежащих тканей [7]. Консолидация регенерата происходила на 14 сутки, в ходе эксперимента сохранялась опорная функция конечности, осложнений инфекционного и неврологического характера не отмечали. Объем и длина мышечного брюшка оперированной конечности были увеличены, цвет соответствовал контралатеральной мышце, не наблюдалось необратимых деструктивных изменений, фиброз ткани фактически отсутствовал, сохранялась полигональность профилей миоцитов, отмечались признаки активации ангио- и неомиогенеза [7]. Очевидно, что преобладают исследования большеберцовой мышцы, особенности икроножной мышцы, также подвергающейся дистракционной нагрузке, освещены недостаточно, что послужило поводом для настоящего исследования.

Цель исследования: гисто- и стереометрический анализ икроножной мышцы взрослых беспородных собак в различных условиях дозированного удлинения голени.

Материалы и методы исследования

Исследованы икроножные мышцы взрослых беспородных собак ($n = 32$) в различных условиях дистракционного остеосинтеза (экспериментатор д.м.н. С.А. Ерофеев). Для сравнительного анализа использованы две экспериментальные группы: I – дистракция в режиме 1,0 мм в сутки за 4 приема ($n = 16$), II – 1,0 мм методом круглосуточной 60-кратной автодистракции по 0,017 мм ($n = 16$); также исследованы интактные животные ($n = 3$). Животных выводили из опыта передозировкой тиопентала натрия через 14 и 28 суток дистракции, на 30 сутки фиксации и через 180 суток после снятия аппарата. Опыты проводились в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (2003–2004 гг.) и были одобрены этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ТО им. акад. Г.А. Илизарова». Фрагменты икроножной мышцы помещали в жидкий азот, изготав-

ливали поперечные криостатные срезы, выявляли активность миозиновой АТФ-азы (рН 9,0) по Paducula, Herman; препараты использовали для стереометрии. Определяли: объемную плотность ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$) мышечных волокон (VV_{mf}), микрососудов (VV_{mv}), эндомизия (VV_{end}); численную плотность (мм^{-2}) мышечных волокон и микрососудов (NA_{mf} , NA_{mv}) [8]. Рассчитывали параметр, оценивающий васкуляризацию мышцы и, косвенно, ее оксигенацию как отношение NA_{mv}/NA_{mf} – индекс васкуляризации, видовая константа. Достоверность различий оценивали на основании непараметрического W-критерия Вилкоксона для независимых выборок, различия считали значимыми при $p < 0,05$, статистическую обработку осуществляли в программе AtteStat версия 10.8.8, встроенной в Microsoft Excel [9]. Часть мышц полимекризовали в эпоксидных смолах, полутонкие срезы окрашивали по М. Ontell, исследовали с помощью стереомикроскопа «AxioScope.A1» и цифровой камеры «AxioCam» (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия).

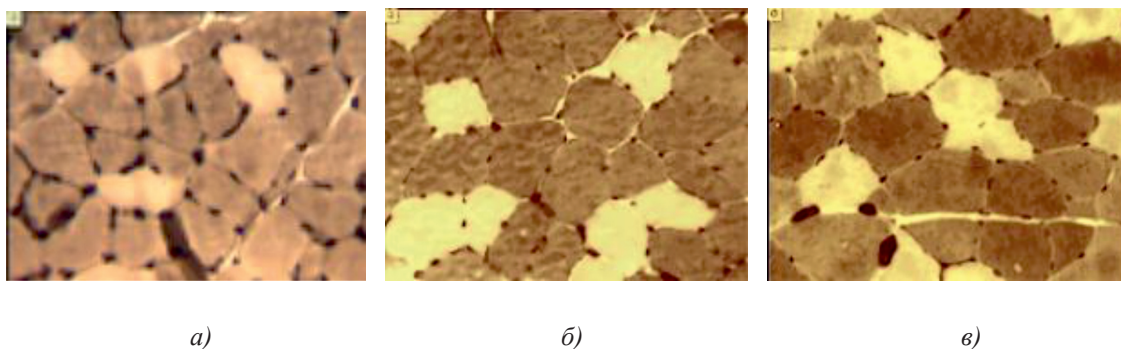
Результаты исследования и их обсуждение

Для икроножной мышцы интактных животных характерны полигональные профили мышечных волокон, минимальные прослойки эндо- и перимизия (рисунок, а). В условиях 4-кратной дробности на поперечных срезах отмечены более крупные диаметры мышечных волокон по сравнению как с интактной мышцей, так и с мышцей группы II (рисунок, б), для последней характерны наиболее многочисленные мелкие микрососуды и миоциты, сохраняющие полигональность профилей (рисунок, в).

По данным стереологического анализа (таблица) VV_{mf} икроножной мышцы через 14 и 28 суток при 4-кратной дробности достоверно выше, чем при автодистрак-

кции, что составляет 101 % и 104 % соответственно ($P < 0,05$). Через месяц фиксации параметры не различались существенно, к 6 месяцам VV_{mf} в I группе составила 103 % ($P < 0,05$) от значения во II-й. При этом NA_{mf} при автодистракции выше в 2,6 раза, чем при 4-кратной дробности к 14 суткам дистракции и в 1,6 раза выше – к 28 суткам ($P < 0,05$). Через месяц фиксации параметр несколько снижался в группе II, но достоверно увеличивался в группе I. Данные факты, вероятно, объясняются гипертрофией предсуществующих мышечных волокон в условиях 4-кратной дробности и новообразованием волокон в условиях автодистракции.

На 180 сутки в I группе NA_{mf} существенно уменьшалась относительно предыдущего срока опыта, а во II – несколько возрастала, что значительно и достоверно было выше по сравнению с параметром в I группе ($P < 0,05$). VV_{mv} к 14 суткам автодистракции была существенно выше по сравнению с 4-кратной дробностью, составив 181 % ($P < 0,05$). К 28 суткам удлинения и через месяц фиксации достоверных различий не выявлено, через 6 месяцев VV_{mv} в условиях автодистракции была почти в 3 раза выше, чем в I группе, составив 257 % ($P < 0,05$). NA_{mv} к 14 суткам в режиме автодистракции составила 258 %, а к 28 суткам – 199 % от значения параметров в I группе. Через месяц фиксации параметр возрос в 2 раза в I группе относительно предыдущего срока ($P < 0,05$), но снижался во II-й. При этом в отдаленном периоде NA_{mv} сохранялась неизменной в условиях автодистракции, в то время как при 4-кратной дробности параметр уменьшался более чем в 3 раза относительно предыдущего срока и становился в 2 раза меньшим, чем при автодистракции ($P < 0,05$). NA_{mv}/NA_{mf} в группе II был выше в 1,6 и в 1,2 раза по сравнению с параметрами группы I со-



Гистоструктура икроножной мышцы: а – взрослых интактных собак; б, в – на 28 сутки дистракции; б – в режиме 0,25х4; в – 0,017х60. Поперечные криостатные срезы с активностью миозиновой АТФ-азы по Paducula, German. Увеличение – $\times 200$

ответственно на 14 и 28 сутки удлинения. Затем параметр в условиях автодистракции снижался в 1,4 раза к 30 суткам фиксации (аналогично большеберцовой мышце), в условиях 4-кратной дробности возрастал в 1,2 раза. Через 6 месяцев NA_{mv}/NA_{mf} икроножной мышцы в группе I уменьшался относительно предыдущего срока в 1,9 раза, в группе II изменялся недостоверно, составив 119% от значения параметра в I группе. VV_{end} на 14 сутки дистракции достоверно не различалась в двух группах, на 28 сутки параметр возрастал достоверно в обеих группах и был выше в группе II, составив 160% от параметра в I группе ($P < 0,05$). Через месяц фиксации параметр был несколько выше при автодистракции и через 6 месяцев достоверно выше, чем в I группе ($P < 0,05$).

Динамика численной плотности мышечных волокон и микрососудов, выявленная для икроножной мышцы, наблюдалась и для передней большеберцовой мышцы [1], где также отмечалась усиленная васкуляризация в периоде удлинения при автодистракции и постдистракционное увеличение численности микрососудов по окончании периода фиксации в условиях 4-кратной дробности. То есть в условиях автодистракции, приближенной по характеристикам к процессам есте-

ственного роста, имеет место ранняя стимуляция процессов новообразования либо раскрытия резервных микрососудов уже в периоде удлинения голени. Дистракционный остеосинтез является ростстимулирующим и формообразующим фактором для всех прилежащих тканей [2, 3]. В мышцах миосателлиты переходят в состояние регенерационной активности с увеличением ядерно-цитоплазматического индекса, выходят из ниши базальной мембраны волокон, митотически делятся, дифференцируются в миобласты, которые, сливаясь, формируют миотубы. Признаки дегенеративных изменений, выявленные в большеберцовой мышце при дистракции, как контрактуры мышечных волокон различной степени, картины вакуолизации миоцитов, клеточной инфильтрации, склеротизации интерстициального пространства, жировой дистрофии [1, 3], были характерны и для икроножной мышцы.

Обсуждаются ключевые вопросы, касающиеся продольного роста скелетных мышц во время дистракционного остеогенеза: характер саркомерогенеза при дозированном удлинении; измененная экспрессия саркомерных и несаркомерных генов; гипотеза сателлитных клеток; митогенные факторы; новые подходы к изучению продольного роста скелетных мышц [10].

Стереометрические параметры икроножной мышцы взрослых собак при дистракции голени в различных ритмах

Параметры Группа Срок опыта	VV_{mf} (mm^3/mm^3)	NA_{mf} (mm^{-2})	VV_{mv} (mm^3/mm^3)	NA_{mv} (mm^{-2})	VV_{end} (mm^3/mm^3)	I_{vasc}
0,25x4 Д14	0,9702 $\pm 0,0035$ *	299,3 $\pm 13,1$ *	0,0099 $\pm 0,0026$ *	259,9 $\pm 13,9$ *	0,0208 $\pm 0,0031$	0,868
0,017x60 Д14	0,9583 $\pm 0,0048$	771,8 $\pm 24,4$	0,0179 $\pm 0,0029$	1081,5 $\pm 42,6$	0,0238 $\pm 0,0039$	1,401
0,25x4 Д28	0,9444 $\pm 0,0044$ *	523 $\pm 13,1$ *	0,031 $\pm 0,0047$	828,3 $\pm 22,2$ *	0,0331 $\pm 0,0049$ *	1,584
0,017x60 Д28	0,9121 $\pm 0,005$	827,2 $\pm 28,1$	0,0364 $\pm 0,0046$	1532,8 $\pm 105,1$	0,0515 $\pm 0,0036$	1,853
0,25x4 Д28Ф30	0,9187 $\pm 0,008$	939,2 $\pm 41,6$ *	0,0308 $\pm 0,0033$	1771,9 $\pm 120,6$ *	0,0556 $\pm 0,0071$ *	1,887
0,017x60 Д28Ф30	0,9239 $\pm 0,0041$	735,1 $\pm 13,6$	0,0319 $\pm 0,0029$	974,6 $\pm 27,4$	0,0422 $\pm 0,0043$	1,326
0,25x4 БА180	0,9486 $\pm 0,0057$ *	552,6 $\pm 20,9$ *	0,0062 $\pm 0,0022$ *	544,4 $\pm 16,3$ *	0,0473 $\pm 0,0055$	0,985
0,017x60 БА180	0,9256 $\pm 0,0059$	813,8 $\pm 22,9$	0,0159 $\pm 0,003$	955,5 $\pm 33,4$	0,0595 $\pm 0,0042$	1,174

Примечание. * – Различия достоверно значимы между двумя группами опыта, $P < 0,05$.

Анализ генных чипов приводит к парадоксальной точке зрения, показывая, что дистракция вызывает усиление активности гена GADD45, участвующего в остановке роста и разрушении дезоксирибонуклеиновой кислоты [10]. Инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) играет важную роль в миогенезе и влияет на развитие мышечной силы или процессы дегенерации, увеличивает пролиферативную активность миосателлитов и миогенную дифференцировку при повреждениях мышц [11]. Саркомерогенез при дистракции определяется эластичным механическим растяжением и возвращает мышцу в оптимальный рабочий режим, предлагается математическая модель, призванная предотвратить перерастяжение мышечной ткани и найти обоснованные решения по оптимальной дробности дистракции и времени удлинения [12]. Во время дистракции применяется ботулинический токсин-A (BtX-A) для уменьшения числа дегенеративно-дистрофических изменений в большеберцовой мышце, а также для уменьшения боли в икроножной мышце и увеличения подвижности суставов [13]. Например, в результате двойного рандомизированного исследования у детей, которым удлиняли нижнюю конечность при коррекции деформаций, доказана безопасность и эффективность BtX-A, как уменьшение болевого синдрома и снижение количества инфекций большеберцовой кости [14]. Исследуются молекулярные механизмы *in vitro/in vivo*, контролирующие активацию миосателлитов в ответ на потребление аминокислот с разветвленной цепью в поддержке миофибриллярной и митохондриальной адаптации мышц к механическому стрессу (тренировки на выносливость/сопротивление) с целью глубже понять механизмы, управляющие ремоделированием скелетных мышц при различных воздействиях [15].

Заключение

В результате экспериментально-морфологического исследования получена новая информация по миогистогенезу икроножной мышцы в условиях дистракционного остеосинтеза голени в темпе 1,0 мм в сутки в условиях 4-кратной дробности и высокодробной круглосуточной автодистракции. Выявлена однонаправленность адаптационно-приспособительных реакций двух исследованных мышц в различных условиях дистракционного остеосинтеза, свидетельствующих о преимуществе круглосуточной автодистракции.

Список литературы

1. Шевцов В.И., Филимонова Г.Н., Ерофеев С.А. Стеологический анализ передней большеберцовой мышцы и капилляров эндомизия в эксперименте с дозированным удлинением голени при четырехкратной и автоматической дробности // Гений ортопедии. 2004. № 1. С. 17–24.
2. Филимонова Г.Н. Математический аппарат теории информации в интегральной оценке капилляров эндомизия передней большеберцовой мышцы при дистракции голени в различных ритмах // Гений ортопедии. 2010. № 2. С. 15–19.
3. Шевцов В.И., Филимонова Г.Н. Передняя большеберцовая мышца собак на этапах постнатального и дистракционного морфогенеза // Гений ортопедии. 2008. № 1. С. 74–80.
4. Fink B., Neuen-Jacob E., Madej M., Lienert A., Rüter W. J Orthop Res. 2000. Vol. 18. No. 4. P. 620–628. Morphometric analysis of canine skeletal muscles following experimental callus distraction according to the Ilizarov method. DOI: 10.1002/jor.1100180415.
5. Моховиков Д.С., Ступина Т.А., Варсегова Т.Н., Дюрягина О.В., Еманов А.А., Борзунов Д.Ю. Гистоморфометрические характеристики передней большеберцовой мышцы и малоберцового нерва при экспериментальном замещении пострезекционного дефекта голени аппаратом Илизарова в комбинации с методом Masquelet // Гений ортопедии. 2020. Т. 26. № 2. С. 216–221. DOI: 10.18019/1028-4427-2020-26-2-216-221.
6. Ерофеев С.А., Чикорина Н.К., Сайфутдинов М.С. Реакция мышц голени на ее удлинение с высоким темпом в условиях автоматической дистракции в эксперименте // Гений ортопедии. 2004. № 4. С. 18–22.
7. Попков А.В., Филимонова Г.Н., Кононович Н.А., Попков Д.А. Морфологическая характеристика передней большеберцовой мышцы при комбинированном автоматическом удлинении голени повышенным темпом // Новости хирургии. 2018. Т. 26. № 4. С. 421–430.
8. Schneider J.P., Ochs M. Stereology of the lung. Cell Biol. 2013. Vol. 113. P. 257–294. DOI: 10.1016/B978-0-12-407239-8.00012-4.
9. Гайдышев И.П. Моделирование стохастических и детерминированных систем: Руководство пользователя программы AtteStat. Курган, 2015.
10. Caiozzo V.J., Utkan A., Chou R., Khalafi A., Chandra H., Baker M., Rourke B., Adams G., Baldwin K., Green S. Effects of distraction on muscle length: mechanisms involved in sarcomerogenesis. Clin Orthop Relat Res. 2002. (403 Suppl). P. 133–145. DOI: 10.1097/00003086-200210001-00016.
11. Ahmad S.S., Ahmad K., Lee E.J., Lee Y.-Ho, Choi I. Implications of Insulin-Like Growth Factor-1 in Skeletal Muscle and Various Diseases. Cells. 2020. Vol. 9. No. 8. P. 1773. DOI: 10.3390/cells9081773.
12. Zöllner A.M., Abilez O.J., Böhl M., Kuhl E. Stretching skeletal muscle: chronic muscle lengthening through sarcomerogenesis. PLoS One. 2012. Vol. 7. No. 10. P. e45661. DOI: 10.1371/journal.pone.0045661.
13. Lee D.H., Ryu K.J., Shin D.E., Kim H.W. Botulinum toxin a does not decrease calf pain or improve ROM during limb lengthening: a randomized trial. Clin Orthop Relat Res. 2014. Vol. 472. No. 12. P. 3835–3841. DOI: 10.1007/s11999-014-3546-5.
14. Hamdy R.C., Montpetit K., Aiona M.D., MacKenzie W.G., van Bosse H.J.P., Narayanan U. et al. Safety and Efficacy of Botulinum Toxin A in Children Undergoing Lower Limb Lengthening and Deformity Correction: Results of a Double-blind, Multicenter, Randomized Controlled Trial. J. Pediatr Orthop. 2016. Vol. 36. No. 1. P. 48–55. DOI: 10.1097/BPO.0000000000000398.
15. Shamim B., Hawley J.A., Camera D.M. Protein Availability and Satellite Cell Dynamics in Skeletal Muscle. Sports Med. 2018. Vol. 48. No. 6. P. 1329–1343. DOI: 10.1007/s40279-018-0883-7.