

**ОСИПОВА
ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА**

**ОСОБЕННОСТИ МИНЕРАЛИЗАЦИИ И ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ РЕГЕНЕРАТА БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ НА РАЗЛИЧНЫХ
ЭТАПАХ УДЛИНЕНИЯ ГОЛЕНИ МЕТОДОМ ДИСТРАКЦИОННОГО
ОСТЕОСИНТЕЗА
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Ирьянов Юрий Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Ильинских Николай Николаевич

кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник

Фомина Татьяна Ивановна

Ведущая организация:

ГОУ ВПО Новосибирская государственная медицинская академия Росздрава

Защита диссертации состоится « 16 » декабря 9⁰⁰ 2005г. на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр-кт Ленина, 107)

Автореферат разослан « 11 » ноября 2005г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Герасимов А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Удлинение нижних конечностей является одним из основных разделов проблемы ортопедического лечения как врожденных, так и приобретенных заболеваний. Удельный вес инвалидности от заболеваний и деформаций опорно-двигательной системы в общем числе инвалидов от всех заболеваний не имеет тенденции к снижению [Журавлев С.М. и соавт. 1980; Волков В.М., 1985]. По данным Л.А. Поповой [1993], среди пациентов, обратившихся в поликлинику Курганского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия», 50,3 % составляли больные, которым требовалось удлинение конечностей, причем первое место среди них занимали лица с укорочением бедра или голени.

Морфологические исследования репаративного костеобразования, в том числе и в условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза, весьма многочисленны [Илизаров Г.А., 1984; Имерлишвили И.А. и соавт. 1984; Бахлыков Ю.Н. и соавт. 1985; Aronson J. et al., 1990; Giebel G., 1995; Лаврищева Г.И. и соавт. 1996; Hamdy R. C. et al., 1997; Ирьянов Ю.М., 1998]. В то же время остаются малоизученными морфологические аспекты процесса минерализации и особенности минерального состава новообразованной костной ткани, что связано с техническими трудностями получения срезов из такого твердого материала, каким является недекальцинированная кость.

Проведенные ранее биохимические и электронно-микроскопические исследования направлены в основном на изучение метаболизма остеотропных макроэлементов: кальция, фосфора, магния, серы [Ролевич И.В. и соавт., 1974; Камерин В.К. и соавт., 1977; Илизаров Г.А. и соавт., 1982; Матвиенко В.М. и соавт., 1983; Шевцов В.И. и соавт., 1995; Ирьянов Ю.М., 1996; Барабаш А.П. и соавт. 2000; Десятниченко К.С. и соавт., 2000]. Значительную роль в процессе минерализации костной ткани играет содержание и обмен микроэлементов. Данные о количественном содержании микроэлементов в костях человека и животных сравнительно многочисленны [Белоус А.П. и соавт., 1968; Корж А.А. и соавт., 1972; Авцын А.П. и соавт., 1991; Скальный А.В., 2004]. Однако в доступной нам литературе не удалось найти работ, посвященных изучению содержания микроэлементов в костной ткани регенератов, формирующихся при удлинении конечности по методу Илизарова. Косвенное определение содержания макро- и микроэлементов в периферической крови у больных на этапах чрескостного дистракционного остеосинтеза не отражает в полной мере течение процесса минерализации непосредственно в регенерате.

Сохраняет актуальность проблема количественной оценки активности репаративного процесса. Гистоморфометрические исследования, посвященные изучению процессов формирования органического матрикса и его минерализации, немногочисленны и отличаются значительной вариабельностью полученных результатов [Lascombes P. et al., 1991; Welch R.D. et al., 1998].

Гистохимическими методами процесс минерализации в регенерате исследован в основном в период distraction на декальцинированном костном материале и имеет описательный характер [Имерлишвили И.А. и соавт., 1984; Бахлыков Ю.Н. и соавт., 1985; Бахлыков Ю.Н., 1988]. В то же время, по данным литературы, только исследование недекальцинированных костных срезов позволяет различать минерализованный и неминерализованный костный матрикс и проводить количественное гистоморфометрическое исследование минерализации и ремоделирования костной ткани [Берченко Г.Н. и соавт., 1993; Ревел П.А., 1993; Саркисов Д.С. и соавт., 1996].

Следовательно, несмотря на многолетнее изучение репаративного костеобразования, морфологические особенности минерализации и минеральный состав новообразованной костной ткани в distractionных регенератах на отдельных этапах его формирования изучены недостаточно, что свидетельствует об актуальности проблемы.

Цель исследования: изучить особенности минерализации и гистоморфометрические характеристики регенерата большеберцовой кости при удлинении голени методом distractionного остеосинтеза.

Задачи исследования

1. Провести гистоморфометрический анализ костной ткани регенерата на различных этапах distractionного остеосинтеза.
2. Разработать новый способ количественной оценки активности процесса минерализации костной ткани.
3. Изучить количественные показатели минерализации регенерата на различных этапах distractionного остеосинтеза с использованием метода компьютерного анализа изображений рентгенограмм и рентгеновского электронно-зондового микроанализа.
4. Провести корреляционный анализ результатов исследований минерализации distractionных регенератов, полученных при помощи компьютерного анализа изображений рентгенограмм и рентгеновского электронно-зондового микроанализа.

Научная новизна. Впервые изучены гистоморфометрические параметры костной ткани в костных отделах и прослойке регенерата в периоды distraction, фиксации и новообразованном участке диафиза после снятия аппарата.

Впервые с помощью метода рентгеновского электронно-зондового микроанализа проведено исследование содержания микроэлементов (меди, марганца, алюминия, ванадия) непосредственно в distractionном регенерате. Изучена динамика содержания микроэлементов и их соотношений в прослойке и костных отделах distractionного регенерата.

Впервые разработан способ оценки минерализации костного регенерата по изображениям рентгенограмм (Заявка на изобретение № 2005100257 от 11.01.2005), подтвержденный данными рентгеновского электронно-зондового микроанализа.

Впервые проведен сопоставительный анализ результатов исследований минерализации костной ткани, полученных при помощи компьютерного анализа изображений рентгенограмм и рентгеновского электронно-зондового микроанализа, позволяющий по концентрации кальция определять степень минерализации костной ткани на изображениях рентгенограмм.

Практическая значимость. Данные гистоморфометрического исследования и рентгеновского электронно-зондового микроанализа существенно дополняют представления об интенсивности процессов костеобразования, резорбции и минерализации дистракционных регенератов.

Разработанный способ оценки минерализации костного регенерата, подтвержденный результатами рентгеновского электронно-зондового микроанализа, позволяет расширить возможности интерпретации рентгенологического исследования и может быть использован в научно-исследовательской и клинической практике для определения степени минерализации костной ткани в норме и при патологии по изображениям рентгенограмм.

Материал данного исследования может быть рекомендован для включения в план преподавания курса гистологии в университетах и медицинских академиях, а также в учебные пособия и руководства по темам: «Остеогенез» и «Регенерация».

Положения, выносимые на защиту

1. В дистракционном регенерате кости процессы репаративного костеобразования и резорбции происходят одновременно в пределах базисной структурной единицы (трабекулы или остеона) с преобладанием в период дистракции процессов костеобразования над резорбцией, в период фиксации и после снятия аппарата - процессов резорбции над костеобразованием.
2. Закономерные изменения микроэлементного состава дистракционного регенерата кости определяются этапами его формирования.
3. Концентрация кальция является одним из основных факторов, определяющих значения оптических плотностей на изображениях рентгенограмм.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на Международной научно-практической конференции молодых ученых «Медицина в XXI: эстафета поколений» (Курган, 2001); IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных» (Троицк, 2001); Международной конференции (Днепропетровск, 2003).

Публикации. Результаты исследований по теме диссертации опубликованы в 9 печатных работах.

Объем и структура работы. Рукопись диссертации состоит из введения, 6 глав содержания, заключения, выводов, списка литературы, приложения и изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 46 рисунками, 5 таблицами. Список литературы включает 159 источников, из них отечественных - 92, зарубежных - 67.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе эксперименты выполнены на 38 беспородных взрослых собаках, в том числе четырех интактных в возрасте 1-3 года, с массой тела $12,63 \pm 0,61$ кг и длиной голени $14,39 \pm 0,55$ см. Животным в условиях операционной под наркозом накладывали на голень аппарат Илизарова, после чего производили закрытую флексионную остеоклазию в средней трети диафиза большеберцовой кости. Через 5 суток после операции начинали distraction с суточным темпом 0,75-1 мм за 4 приема. Заканчивали эксперимент через 7, 14, 21, 28 суток distraction, через 1-2 месяца последующей фиксации оперированной конечности в аппарате и через 1, 3 и 6 месяцев после снятия аппарата. Из опыта животных выводили медленным внутривенным введением летальных доз 5 % тиопентала натрия или гексенала. Содержание и эвтаназию животных осуществляли согласно приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организованных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Исследовали: 1) недекальцинированные срезы, толщиной 1-2 мкм, из различных зон регенерата. Без удаления смолы срезы окрашивали метиленовым синим, реактивом Шиффа (после окисления йодной кислотой и докраски метиленовым синим), а также по методу Косса с дополнительной окраской по Ван-Гизону; 2) продольные распилы залитых в аралдит distractionных регенератов большеберцовых костей на различных этапах удлинения голени по методу Илизарова; 3) продольные распилы залитых в аралдит диафизов неповрежденных большеберцовых костей интактных взрослых собак; 4) изображения рентгенограмм на этапах эксперимента.

Гистоморфометрический метод использовали для количественной оценки динамики формирования и перестройки distractionных регенератов. С помощью аппаратно-программного комплекса «ДиаМорф» (Россия, г. Москва), программного обеспечения «ВидеоТест 4,0 – Мастер» (Россия, г. Санкт-Петербург), аппаратно-вычислительного комплекса «MOR-VIDEOPLAN» (Германия) определяли статические показатели костеобразования и резорбции [Parfitt A. M. et al., 1987; Ревел П.А., 1993]:

- объем трабекулярной кости - процент объема губчатой кости, занятый минерализованной и остеоидной костной тканью, исключая медуллярные и васкулярные пространства;
- объем остеоида - часть (в процентном отношении) остеоидной ткани от объема трабекулярной кости;
- поверхность остеоида - часть (в процентном отношении) общего периметра губчатой костной ткани, которая покрыта остеоидом;

–индекс толщины пласта остеоида - отношение объема остеоида к поверхности остеоида (%);

–индекс остеокластов - число остеокластов на квадратный миллиметр среза кости.

Рассчитывали соотношение минерализованной костной ткани и остеоида в трабекулах регенерата.

Исследования проводили при увеличении 400 (об. 40, ок. 10). Для получения абсолютных величин выполняли калибровку по объект-микрометру.

Рентгеновский электронно-зондовый микроанализ. Для изучения особенностей минерализации регенерата, формирующегося в условиях дистракционного остеосинтеза, определяли содержание некоторых остеотропных макро- (кальций, фосфор, сера) и микроэлементов (медь, марганец, алюминий, ванадий).

Исследования выполняли на электронно-зондовом микроанализаторе «INCA» (фирма OXFORD INSTRUMENTS, Англия), смонтированном на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840» (фирма JEOL, Япония). Для сбора рентгеновских спектров использовали сканирующий режим по плоскости. В микроскопе-анализаторе на поверхности шлифов регенератов и неповрежденных диафизов случайным образом выбирали статистически значимое количество участков (не меньше 10). В каждом участке измеряли интенсивность характеристического рентгеновского излучения кальция (Ca), фосфора (P), серы (S), меди (Cu), марганца (Mn), алюминия (Al), ванадия (V). Полученные выборки цифровых значений интенсивностей усреднялись отдельно для каждого элемента и нормировались на единицу площади участка. Дополнительно измеряли интенсивность характеристического излучения «фона» (заливочной среды - аралдита), значения которого необходимо учитывать при анализе следов элементов, т.е. элементов, область концентраций которых ниже 0,1 % [Гоулдстейн Дж. и соавт., 1978]. Абсолютные значения концентраций элементов выражали в вес. %.

Учитывая, что костная ткань характеризуется не только количественным содержанием химических элементов, но и изменением их соотношений, рассчитывали следующие сравнительные коэффициенты [Скоблин А.П., Белоус А.М., 1968; Ирьянов Ю.М., 1991]:

- Ca/P - характеризует степень кристаллизации минерала;
- Cu/V, Mn/V, Al/V - характеризуют степень минерализации;
- Cu/Mn - отображает соотношение окислительно-восстановительных ферментов;
- Mn/Al - отображает соотношение метаболически активных клеточных элементов, содержащих марганец, и синтеза межклеточного вещества, катализируемого алюминием.

Исследование динамики изучаемых элементов и их соотношений проводили в регенератах через 28 суток дистракции и 30 суток фиксации, в новообразованном участке диафиза - через 30 суток после снятия аппарата и в неповрежденных диафизах большеберцовых костей интактных животных.

Кроме того, на рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе «LINK 860-500» (фирма LINK, Англия), смонтированном на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840» (фирма JEOL, Япония), по набору программ «MAP» и «DIGIMAP» (Link systems, 1984) получали изображения анализируемых участков в характеристическом рентгеновском излучении кальция, которые визуализировали концентрацию анализируемого элемента в различных участках регенератов.

Полученные изображения регенератов, показывающие распределение концентрации кальция (от 0 % до 26 %), анализировали на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф». На изображениях измеряли площади участков, соответствующих определенной концентрации кальция (до 5 %, 6-10 %, 11-15 %, 16-20 %, выше 20 %). Затем в программе «Microsoft Excel-97» определяли доли, занимаемые структурами с заданной концентрацией кальция в площади регенерата.

Оцифровку и компьютерный анализ изображений рентгенограмм выполняли на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф». На изображениях рентгенограмм интерактивно оконтуривали тени distractionного регенерата, на рентгенограммах, выполненных до операции - участок в средней трети диафиза, включающий корковую пластинку и костномозговую полость, высотой 1 см. Получали оверлейный контур, который копировали на исходное изображение, затем удаляли изображение, находящееся вне контура. Таким образом, на экране оставался участок, подлежащий анализу. Измеряли интенсивность каждого пикселя выделенного участка. Дополнительно измеряли среднюю интенсивность теней мягких тканей и фона изображения рентгенограммы на уровне distractionного регенерата, значения которых использовали для расчета оптической плотности по формуле¹:

$$OD_i = \lg ((I_i - I_m) / I_o), \text{ где}$$

OD_i - оптическая плотность i -го элемента изображения;

I_i - интенсивность i -го элемента изображения;

I_m - средняя интенсивность тени мягких тканей;

I_o - средняя интенсивность фона.

Также рассчитывали среднюю оптическую плотность теней distractionных регенератов. Результаты выражали в процентах к дооперационным значениям оптической плотности диафиза.

Статистическую обработку данных исследования выполняли с помощью табличного редактора «Microsoft Excel-97», в частности его модулей «Анализ данных» и «Мастер диаграмм», и программы «AtteStat» Версия 1.0 [Гайдышев И.П., 2004]. Статистическая обработка данных включала расчет среднего арифметического значения, его стандартной ошибки, стандартного отклонения, медианы, минимального и максимального значения, 25 % нижнего и 75 % верхнего квартилей; проверку гипотезы о

¹Гореванов Э.А., Осипова Е.В. «Способ определения на оцифрованном изображении оптической плотности выделенного объекта при затенении его другим объектом»

Удостоверение на рац. предложение № 26/2000, выданное РНЦ "ВТО" соответствии эмпирического распределения закону нормального распределения при помощи одновыборочного теста Колмогорова-Смирнова; проверку статистической гипотезы о равенстве генеральных средних нормально распределенных выборок с помощью параметрического критерия Стьюдента для связанных и независимых выборок; проверку статистической гипотезы о равенстве медиан с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для независимых выборок.

Для оценки тесноты и направления связи между концентрацией кальция в образцах и оптическими плотностями на изображениях рентгенограмм рассчитывали линейный коэффициент корреляции r_{xy} . С помощью t-критерия Стьюдента проверяли его значимость. При этом выдвигали и проверяли гипотезу о равенстве коэффициента корреляции нулю. Для определения вариации результативного признака - оптическая плотность на изображениях рентгенограмм, объясняемой его связью с вариацией фактора (концентрация кальция), рассчитывали коэффициент детерминации. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Данные представлены, в случае нормального распределения, в виде $M \pm SD$ (среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение). Если распределение отличалось от нормального, результаты выражали в виде $A (L, H)$, где A - медиана, L - 25 % нижний квартиль, H - 75 % верхний квартиль.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистоморфометрическая оценка костеобразования и резорбции костной ткани дистракционных регенератов показала высокую интенсивность обоих процессов. Так, объем остеоида в прослойке и костных отделах регенерата в период дистракции в 4-12 раз превышал значения нормы, составляющей, по данным литературы, 2-4 % [Берченко Г.Н. и соавт., 1993; Родионова С.С., 2003].

Во время фиксации и после снятия аппарата в костных отделах регенерата данный показатель не отличался от нормы. В прослойке, после ее замещения костной тканью, объем остеоида, хотя и имел тенденцию к снижению, к 30-м суткам после снятия аппарата оставался в 2,3 раза выше нормы.

Значения параметра поверхности остеоида в регенерате на этапах эксперимента в 3-4 раза превышали нормальные значения, составляющие 15-20 % [Берченко Г.Н. и соавт., 1993; Родионова С.С., 2003]. К концу периода наблюдения (30 суток после снятия аппарата) данный показатель достигал $26,83 \pm 9,42$ % ($p > 0,05$). Изменения значений поверхности остеоида были наиболее выражены в прослойке, где в период дистракции поверхность трабекул, занятая остеоидом, колебалась от 100 % через 7 суток дистракции до $52,63 \pm 3,34$ % ($p < 0,001$) через 28 суток дистракции.

Индекс остеокластов в регенерате уже через 14 суток distraction существенно увеличивался и до конца периода наблюдения (30 суток после снятия аппарата) существенно отличался от нормы (рис. 1). При этом в прослойке значимые отличия данного показателя от нормы наблюдали только к концу distraction (28 суток).

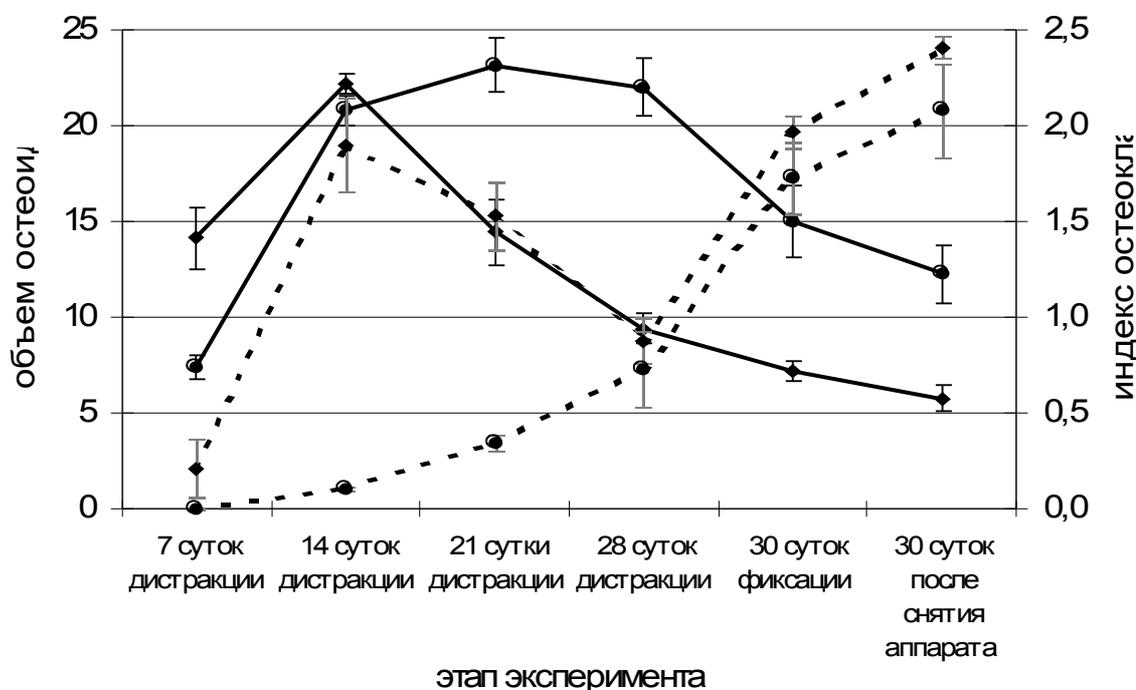


Рис. 1. Динамика объема остеоида и индекса остеокластов в прослойке и костных отделах регенерата на этапах эксперимента:

- - объем остеоида в прослойке;
- ◆—◆ - объем остеоида в костных отделах;
- - ● - индекс остеокластов в прослойке;
- ◆- - ◆ - индекс остеокластов в костных отделах.

Вертикальные отрезки - значения стандартной ошибки.

Высокие значения объема остеоида и появление первых остеокластов в регенерате мы наблюдали уже через 7 суток distraction в отличие от P. Lascombes et al. [1991], который при исследовании биоптатов регенерата кости после удлинения конечности по методу Илизарова данные изменения отмечал только с третьей недели distraction.

Интенсивность процесса минерализации в зонах distractionного регенерата была выражена по-разному. Так, через 7 суток distraction доля минерализованных структур в трабекулах прослойки, состоящих в основном из остеоида, составляла менее 1 %. С 14-х по 28-е сутки distraction она увеличивалась до 6-15 %. В период фиксации доля минерализованной костной ткани в прослойке достигала $55,85 \pm 1,70$ % ($p < 0,001$). Низкая доля минерализованных структур в прослойке на протяжении всего периода distraction и значимое увеличение ее во время фиксации подтверждают

данные Ю.М. Ирьянова [1996] о том, что дистракция тормозит темп минерализации срединной прослойки. В костных отделах регенерата через 21 и 28 суток дистракции фазы образования органического матрикса и его минерализации находились в относительном равновесии с незначительным превалированием в ту или иную сторону.

Результаты рентгеновского электронно-зондового микроанализа, согласно которым в период дистракции 91,9-99,4 % площади прослойки приходилось на структуры с очень слабой (до 1 %) и слабой (до 5 %) степенью кальцификации, подтверждают ранее полученные данные Ю.М. Ирьянова [1996] и К.С. Десятниченко [1998] о тормозящем влиянии дистракции на минерализацию прослойки и о слабой кальцификации срединной прослойки в период дистракции.

В целом, в регенерате в период дистракции преобладали костные структуры с очень слабой и слабой степенью кальцификации. Во время фиксации доли высоко и максимально кальцифицированных структур в сумме составляли $52,2 \pm 1,5$ % от площади регенерата. После снятия аппарата 74,8-82,6 % площади новообразованного участка диафиза занимали структуры с очень слабой и максимальной степенью кальцификации, представляющие соответственно костномозговую полость и корковую пластинку.

Аналогичные изменения были установлены и при анализе изображений рентгенограмм. Результаты показали, что в период дистракции в регенерате преобладали минерализованные структуры с низкой оптической плотностью, до 0,4 усл. ед.. Они занимали от 99 % (86 %; 100 %) через 7 суток до $61,4 \pm 10,7$ % ($p > 0,05$) через 28 суток дистракции площади регенерата. Доля структур с оптической плотностью от 0,6 до 0,8 усл. ед., соответствующая средней и высокой степени минерализации, составляла $13,8 \pm 3,9$ %. Через 30 суток фиксации она увеличивалась почти в 3 раза и достигала $31,7 \pm 11,9$ %, а через 180 суток после снятия аппарата - $45,6 \pm 12,8$ %. Необходимо отметить, что на изображениях рентгенограмм, выполненных после снятия аппарата, в тенях новообразованного участка диафиза отсутствовали структуры с оптической плотностью до 0,2 усл. ед., что, по данным рентгеновского электронно-зондового микроанализа, соответствовало концентрации кальция менее 1 %.

При анализе оцифрованных изображений рентгенограмм на разных этапах эксперимента нами установлено, что средняя оптическая плотность теней костного регенерата изменялась в диапазоне от 0 до 1,1 усл. ед.¹. Для проведения корреляционного анализа и характеристики степени кальцификации костных структур данный диапазон оптических плотностей разбивали на пять интервалов с шагом 0,2 усл. ед. и сопоставляли с концентрацией кальция в образцах, также разделенной на пять групп

1Заявка № 2005100257 РФ, МПК7 А 61 В 6/00

Способ оценки минерализации костного регенерата по изображениям рентгенограмм / Осипова Е.В. (РФ), Петровская Н.В. (РФ), Ерофеев С.А. (РФ), ФГУН «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росздрава» (РФ). – Заяв. 13.01.2005

(табл. 1). Результаты корреляционного анализа показали на существование взаимосвязи (прямой - в период distraction и обратной - во время фиксации и после снятия аппарата) между оптической плотностью на изображениях рентгенограмм и концентрацией кальция.

Таблица 1

Сопоставление концентрации кальция в образцах и оптической плотности на изображениях рентгенограмм

Концентрация кальция %	Оптическая плотность усл. ед.	Степень кальцификации
меньше 1	до 0,2	очень слабая
5	0,4	слабая
10	0,6	средняя
15	0,8	высокая
20 и выше	1,0 - 1,1	очень высокая

Приобретение коэффициентом корреляции отрицательных значений в период фиксации и после снятия аппарата, возможно, связано с формированием корковой пластинки и наложением ее тени в проекции костномозговой полости, в связи с чем на изображениях рентгенограмм не выявлялись структуры с низкой степенью минерализации (до 0,2 усл. ед.).

Расчитанный коэффициент детерминации показал, что от 54,3 % до 98,5 % значений оптических плотностей на изображениях рентгенограмм определялись концентрацией кальция.

Известно, что активное участие в энзиматических процессах минерализации принимают микроэлементы [Скоблин А.П. и Белоус А.М., 1968; Корж А.А. и соавт, 1972; Бородин И.Ф., 1979; Барабаш А.П. и соавт., 2000]. Содержание микроэлементов, а следовательно, и их соотношения в прослойке и костных отделах регенерата на разных этапах эксперимента были неодинаковыми.

К концу периода distraction (28 суток) значимое, по сравнению с неповрежденным диафизом, преобладание содержания меди, а также повышенное содержание алюминия в регенерате обуславливало увеличение соотношений Cu/V, Al/V, Cu/Mn. При этом в костных отделах регенерата более значительно были выражены соотношения, характеризующие степень минерализации (Mn/V, Al/V) (рис. 2).

Медь, марганец и алюминий принимают участие не только в процессах минерализации, но и в пролиферации клеточных элементов и образовании волокнистых структур (коллагеновой стромы) [Скоблин А.П. и Белоус А.М., 1968]. Полученные нами результаты подтверждают данные литературы. Довольно высокие значения соотношений Cu/Mn и Mn/Al в прослойке

совпадали по срокам с сохраняющейся пролиферацией и дифференцировкой клеточных элементов, процессами образования коллагеновых волокон и остеонидной ткани (рис. 3).

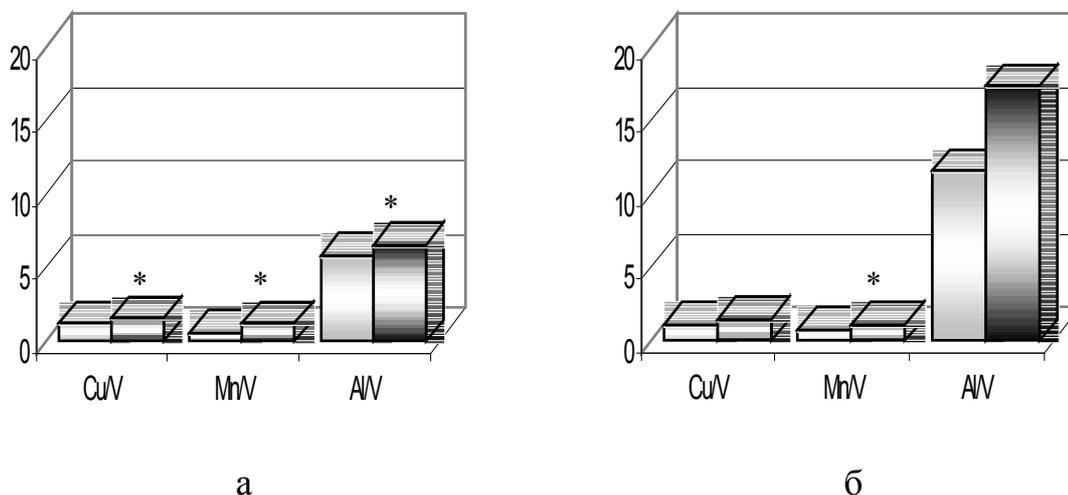


Рис. 2. Динамика соотношений, характеризующих степень минерализации в прослойке и костных отделах дистракционного регенерата: а - прослойка; б - костные отделы.

■ - 28 суток дистракции;

■ - 30 суток фиксации.

* - различия значимы по сравнению с соответствующим показателем через 28 суток дистракции.

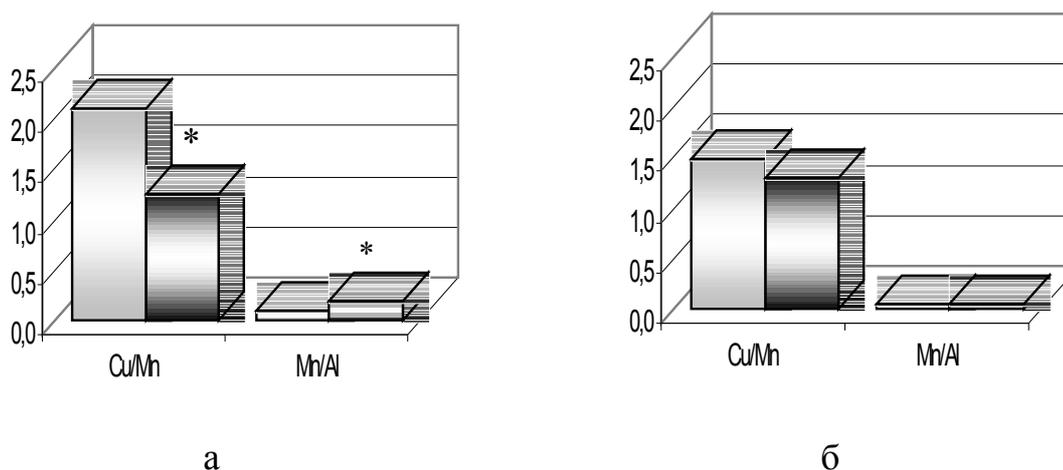


Рис. 3. Динамика соотношений Cu/Mn и Mn/Al в прослойке и костных отделах регенерата: а - прослойка; б - костные отделы.

■ - 28 суток дистракции;

■ - 30 суток фиксации.

* - различия значимы по сравнению с соответствующим показателем через 28 суток дистракции.

Через 30 суток фиксации изменение в содержании микроэлементов, по-видимому, было связано с началом насыщения минеральными солями костных трабекул [Скоблин А.П. и Белоус А.М., 1968], образующихся на месте прослойки, и формированием корковой пластинки. Об усилении процессов минерализации в регенерате, особенно на месте прослойки, свидетельствует увеличение соотношений Cu/V , Al/V , Mn/V .

Через 30 суток после снятия аппарата, несмотря на изменение общего метаболического фона, о чем свидетельствовала нормализация средних значений соотношений Cu/Mn и Mn/Al в новообразованном участке диафиза, содержание меди, марганца и особенно алюминия оставалось на довольно высоком уровне. Изменение содержания микроэлементов и их соотношений происходило на фоне резорбции остатков костных трабекул в костномозговой полости и процессов перестройки вновь образованной костной ткани корковой пластинки.

В отличие от А.П. Скоблина и А.М. Белоуса [1968], И.Ф. Бородина [1979], исследовавших костные регенераты, образующиеся при переломах при формировании и перестройке дистракционного регенерата, нормализации уровня анализируемых микроэлементов после образования корковой пластинки мы не наблюдали, то есть снижение обменных процессов во вновь сформированном участке диафиза происходило медленнее. Полученные результаты подтверждают данные А.П. Барабаша и соавт. [2000], изучавших содержание микроэлементов в периферической крови у больных с переломами костей голени и с дефектами костной ткани в условиях чрескостного остеосинтеза.

Исследование остеотропных макроэлементов показало, что через 28 суток дистракции, 30 суток фиксации и 30 суток после снятия аппарата содержание серы в прослойке и костных отделах регенерата было выше значений неповрежденного диафиза, что указывало на накопление в остеоиде, грубоволокнистой костной ткани и коллагеновых волокнах прослойки сульфатированных гликозаминогликанов. По данным литературы, сульфатированные гликозаминогликаны играют важную роль в регуляции водного и электролитного обменов [Родионова Н.В., 1989].

Неорганический компонент регенерата и новообразованного участка диафиза был представлен двумя основными фазами: кристаллической и аморфной, о чем свидетельствуют значения соотношения Ca/P . Так, через 28 суток дистракции и 30 суток фиксации в исследуемых образцах были обнаружены структуры с соотношением Ca/P от 1,44 до 1,51, что указывает на присутствие аморфной минеральной фазы в регенерате. Средние значения соотношения Ca/P в регенерате изменялись от 1,94 до 2,13 и не имели значимых отличий от показателей неповрежденного диафиза.

Таким образом, результаты исследования показали, что в костных регенератах, формирующихся при удлинении голени с суточным темпом 0,75-1 мм/сутки за 4 приема процесс костеобразования преобладал над процессом резорбции на протяжении всего периода дистракции. Во время фиксации и после снятия аппарата в регенерате превалировали процессы

остеокластической резорбции. Интенсивность процесса минерализации дистракционного регенерата зависела от этапа его формирования и была различна в прослойке и костных отделах. При этом к концу дистракции (28 суток), в период фиксации и после снятия аппарата в регенерате преобладала минерализованная костная ткань.

ВЫВОДЫ

1. При удлинении голени у собак методом дистракционного остеосинтеза в эксперименте процесс костеобразования в регенерате достигает максимальных значений к 14-м суткам дистракции и преобладает над процессом резорбции на протяжении всего периода дистракции.
2. Первые признаки остеокластической резорбции отмечены через 7 суток дистракции и достигают максимума к 30-м суткам после снятия аппарата.
3. Увеличение доли минерализованной костной ткани в регенерате в период дистракции происходит за счет костных отделов, а в период фиксации - вследствие замещения соединительнотканной прослойки дистракционного регенерата костной тканью.
4. Высокие значения показателей объема остеоида, поверхности остеоида и слабая степень кальцификации матрикса (до 5 %) на протяжении всего периода дистракции в прослойке подтверждают ее активную роль в процессе костеобразования.
5. Содержание исследуемых микроэлементов (меди, марганца, алюминия, ванадия) и величина соотношений их концентраций в прослойке и костных отделах регенерата отражают биосинтетическую активность остеогенных клеточных элементов и степень зрелости костной ткани в этих зонах на этапах эксперимента.
6. Повышенное содержание меди, марганца и алюминия после снятия аппарата (30 суток) свидетельствует о сохранении высокого уровня обменных процессов в новообразованном участке диафиза по сравнению с неповрежденным.
7. Динамика оптической плотности тени дистракционного регенерата на изображениях рентгенограмм определяется концентрацией кальция в костной ткани.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты, полученные при анализе изображений рентгенограмм и подтвержденные данными рентгеновского электронно-зондового микроанализа, позволяют рекомендовать «Способ оценки минерализации костного регенерата по изображениям рентгенограмм» для получения объективной количественной характеристики и графического представления изменений степени минерализации костной ткани:

- а) регенератов, формирующихся при удлинении конечностей по методу Илизарова;
- б) регенератов, формирующихся в условиях стабильной фиксации при переломах костей;
- в) в рентгенологической диагностике при лечении заболеваний костей и суставов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Функциональная морфология зон роста дистракционных регенератов костей // Гений ортопедии. - 2001. - № 3. - С. 140-141. (соавт. Ирьянов Ю.М., Горбач Е.Н., Ирьянова Т.Ю.)
2. Особенности минерализации костной ткани дистракционных регенератов по данным электронно-зондового микроанализа // Гений ортопедии. - 2001. - № 3. - С. 141-142. (соавт. Ирьянов Ю.М., Ирьянова Т.Ю.)
3. Количественный анализ органотипической перестройки дистракционных регенератов большеберцовых костей при удлинении голени в условиях чрескостного остеосинтеза // Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных : материалы IV Междунар. науч.-практ. конф. - Троицк, 2001. - С.71-73. (соавт. Ирьянов Ю.М., Петровская Н.В., Горбач Е.Н.)
4. Кровоснабжение надкостницы новообразованных участков диафизов большеберцовых костей при удлинении конечностей по Илизарову // Гомеостаз и инфекционный процесс : III общерос. конф. с междунар. участием : тез. докл. - Сочи, 2002. - С. 30. (соавт. Горбач Е.Н.)
5. Алгоритм количественной оценки кровоснабжения периоста новообразованного участка диафиза при оперативном удлинении конечности в условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза // Современные информационные технологии в диагностических исследованиях : сб. докл. междунар. науч.-практ. конф. - Днепропетровск, 2002. - С.106-110. (соавт. Горбач Е.Н.)
6. Применение компьютерных программ для анализа изображений в морфологических исследованиях // Информационные технологии и кибернетика на службе здравоохранения : сб. докл. междунар. науч.-практ. конф. - Днепропетровск, 2003. - С. 55-58. (соавт. Ирьянов Ю.М., Силантьева Т.А., Горбач Е.Н., Ирьянова Т.Ю.)
7. Применение компьютерных программ для обработки и анализа изображений в морфологических исследованиях // Современные методы диагностики : сб. тез. 5-й Межрегион. науч.-практ. конф., посв.10-ю Диагностическому центра Алтайского края. - Барнаул, 2003. - С. 320-321. (соавт. Ирьянов Ю.М., Горбач Е.Н.)
8. Особенности минерализации костной ткани дистракционных регенератов по данным электронно-зондового микроанализа // Реактивность и пластичность гистологических структур в нормальных, экспериментальных и патологических условиях : материалы докл. Всерос.

науч. конф. - Морфология. - 2003. - № 5. - С. 50-51. (соавт. Ирьянов Ю.М.)

9. Изменение минеральной плотности костного регенерата при удлинении голени по методу Г.А. Илизарова // Молодые ученые - медицине : сб. тез. докл. Всерос. конф. - Самара, 2003. - С. 202-204.