

Изменения структуры и механической прочности кости после пункционной криодеструкции в эксперименте

А.М. Беляев¹, Г.Г. Прохоров¹, В.А. Сушников², А.С. Артемьева¹,
А.А. Архипская¹, Д.А. Чуглова¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Реферат

Цель исследования — выявление возможных последствий криогенной обработки здоровой части кости и вероятных причин возникновения послеоперационных переломов. **Материал и методы.** Материалом для экспериментального исследования послужили бедренные кости 8 взрослых кроликов породы советская шиншилла. В бедренную кость через перфорационное отверстие вводили азотный криозонд диаметром 1,5 мм. Кость полностью промораживали до -180°C в двух циклах с непрерывной термометрией. Через 7 и 55 дней выполняли патоморфологические исследования и определяли твердость кости. Подготовка препаратов включала распиливание кости в месте перелома вдоль оси. Одна половина направлялась на гистологическое исследование, вторая подвергалась измерению механической прочности путем локального вдавливания алмазного индентора в кость под действием определенной силы. Расстояние между точками измерения вдоль кости составляло 250 мкм. Статистическая обработка включала вариационный анализ с использованием критерия Стьюдента для определения значимости различий. **Результаты.** У всех животных через неделю возникли переломы кости в месте криодеструкции. Статистический анализ результатов измерений и гистологическое исследование показал, что охлаждение до -180°C с замораживанием всего диаметра кости вызывает ее полное разрушение. Снижение прочности вокруг места перелома соответствовало зоне температурного распределения в диапазоне от -9°C до -15°C . Однако при этом в зоне охлаждения ниже -40°C выявлялись участки кости с нормальной твердостью. Мозаичность снижения прочности объяснялась нарушением микроциркуляции. Гистологические исследования выявили тромбоз внутрикостных кровеносных сосудов в зоне криовоздействия. Первые очаговые признаки остеомаляции появлялись к концу первой недели после криоабляции. В дальнейшем кость сохраняла способность к регенерации, но к концу второго месяца гистонез еще не завершился, кость не восстанавливала свою прочность. **Заключение.** Ограниченное число наблюдений, видовые особенности ангиоархитектоники кости животных и их способность к образованию мощной периостальной реакции не позволяют переносить количественные результаты исследования на клинические ситуации. Однако образование перелома оказывается неизбежным в случае полного промораживания всего диаметра кости.

Ключевые слова: криохирургия, криотерапия, опухоли костей, малоинвазивные технологии, прочность кости.

Беляев А.М., Прохоров Г.Г., Сушников В.А., Артемьева А.С., Архипская А.А., Чуглова Д.А. Изменения структуры и механической прочности кости после пункционной криодеструкции в эксперименте. *Травматология и ортопедия России*. 2019;25(2):123-133. DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-2-123-133.

Cite as: Belyaev A.M., Prokhorov G.G., Sushnikov V.A., Artemyeva A.S., Arkhitskaya A.A., Chuglova D.A. [Changes in the Structure and Mechanical Properties of the Bone after Puncture Cryoablation: Experimental Study]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2019;25(2):123-133. (In Russian). DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-2-123-133.

✉ Прохоров Георгий Георгиевич / Georgiy G. Prokhorov; e-mail: gprokhorov@mail.ru

Рукопись поступила/Received: 18.01.2019. Принята в печать/Accepted for publication: 27.02.2019.

Changes in the Structure and Mechanical Properties of the Bone after Puncture Cryoablation: Experimental Study

A.M. Belyaev¹, G.G. Prokhorov¹, V.A. Sushnikov², A.S. Artemyeva¹,
A.A. Arkhitskaya¹, D.A. Chuglova¹

¹ *Petrov National Medical Research Center (Petrov's Institute of Oncology), St. Petersburg, Russian Federation*

² *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract

Purpose of the study — to evaluate possible impact of cryoablation on a healthy bone and to identify probable causes of postoperative fractures. **Materials and Methods.** The authors performed cryoablation of the femur in the experiment on 8 mature rabbits of Soviet Chinchilla (SC) breed with a follow up for up to two months. A nitrogenous cryoprobe of 1.5 mm in diameter was introduced into the femur through a perforation hole. The bone was completely frozen up to -180°C in two cycles with continuous thermometry. Pathomorphological examinations were performed after 7 and 55 days along with assessment of bone hardness. Preparation of material stipulated sawing the bone at the fracture site along the bone axis. One half-bone was used for histological examination, and another one — for measuring mechanical properties by local pressing of a diamond indenter onto the bone at certain applied force. The distance between measurement points along the bone was $250\ \mu\text{m}$. Statistical processing included variance significance analysis using t-test. **Results.** The authors reported bone fractures at the site of cryodestruction in all animals in one week after the procedure. Statistical analysis of the measurements and histological examination demonstrated that freezing of the entire bone diameter up to -180°C results in its complete destruction. Strength reduction around the fracture site corresponded to the temperature distribution area in the range from -9°C to -15°C . However, areas of cooling below -40°C exhibited some bone segments with normal hardness. Mosaic pattern of strength reduction is explained by microcirculation disorders. Histology confirmed thrombosis of intraosseous blood vessels in the area of cryotherapy. The first focal signs of osteomalacia emerged by the end of the first week after cryoablation. Subsequently, the bone preserved its regenerative properties, but by the end of the second month after the procedure the histogenesis was still not completed and the bone did not regain its strength. **Conclusion.** The authors believe that a limited number of cases, the specific features of the angioarchitecture of animal bones and their ability to produce a heavy periosteal response do not allow to apply obtained quantitative outcomes of the present study to clinical situations. However, complete freezing of the entire bone diameter inevitably results in fracture formation.

Keywords: cryosurgery, cryoablation, cryotherapy, bone tumors, minimally invasive technique, bone strength.

Введение

Оперативные вмешательства при опухолевых поражениях костей составляют важнейшую часть комплексного лечения онкологических больных. Криодеструкция стенок юретажной полости после экссколеации или криогенная обработкой концов резецируемой кости в случаях ограничения объема операции повышает радикальность и улучшает отдаленные результаты [1–4]. Однако само низкотемпературное воздействие может приводить к снижению механической прочности кости и на фоне имеющейся опухолевой деструкции увеличивать опасность патологических переломов [5, 6].

Современные представления о механизмах обеспечения механических характеристик кости дополняют традиционные знания о морфологических и биомеханических факторах прочности кости новыми фактами о субмикроскопических, физико-химических и молекулярных свойствах,

показывают роль структурированной воды в формировании прочной связи между кристаллитами гидроксиапатита [7, 8]. Императивное вовлечение молекул связанной воды в процесс кристаллизации при крайне низкой температуре не может не сказаться на механической прочности кости [9]. По наблюдениям клиницистов, открытые инсталляции жидкого азота во время 25 операций по поводу гигантоклеточной опухоли кости стали в последующем причиной патологических переломов у 7 пациентов [10]. Аналогичные данные приводят и другие авторы [11]. Частота такого осложнения может достигать 30% и зависит от объема поражения кости.

Первые экспериментальные работы были посвящены изучению гистологической перестройки остецитов в условиях низкой температуры [12, 13], патоморфологии кости в зоне охлаждения [14], особенностям микроциркуляции и регенерации [15], изменению прочности поврежденной кости [16].

Изменение прочности кости после криовоздействия изучали немногие исследователи, и как правило, в интересах хирургической практики. Клинический случай перелома нижней челюсти у пациента через 2 мес. после обработки кюретажной полости челюсти жидким азотом послужил поводом для специальных исследований. В хронических опытах на крысах авторы описали наблюдавшиеся изменения в виде в трех перекрывающихся фаз: первая — некроз, который завершается в течение суток; вторая — интенсивная регенерация со стороны субпериостального слоя над девитализированной компактной пластинкой; третья — длительная фаза ремоделирования, при которой некротическая кость заменяется жизненно важной пластинчатой костью [17].

Другие исследователи выполняли тотальное промораживание бедренной кости в опытах на козах, после которого наблюдали появление переломов у некоторых животных, возникавших обычно к исходу третьего месяца. Изучение гистологических препаратов выявило связь причины переломов с аномальным преобладанием резорбтивных явлений и замедлением репаративных процессов в субпериостальной части кости [18].

L.C. Keijser с соавторами изучали на кроликах температурные поля вокруг закрытого азотного криозонда диаметром 2 мм, связь глубины охлаждения с развитием некроза кости и процессом регенерации. В гистологических препаратах через неделю на фоне внешнего сохранения целостности кости наблюдали признаки остеонекроза, а в период от 3 до 5 нед. — активную реконструкцию кости с выраженным периостальным наложением [19].

F. Rorpen с соавторами проверяли в опытах на животных риск развития газовой эмболии после замораживания эпифиза большеберцовой кости с применением новых для того времени криозондов закрытого типа. Стабильность гемодинамики, легочной вентиляции и кислотно-основного баланса свидетельствует о безопасности криогенной технологии и возможности ее применения как альтернативы или дополнения к обычной резекции аномальной костной ткани [20].

В настоящее время в клинической практике прямая инсталляция азота применяется редко, появились безопасные способы криовоздействия [21, 22, 23]. Использование современных малоинвазивных систем иногда позволяет отказаться от традиционных операций, минимизировать травматичность лечения [24, 25]. Однако это не исключает холодового повреждения здоровой части кости. При этом в литературе нет сведений о возможных последствиях применения пункционных криотерапевтических систем, что предопределило необходимость продолжения исследований и до-

полнения их экспериментами с использованием малоинвазивных криозондов.

Цель исследования — оценка механической прочности трубчатых костей конечности после локального криовоздействия малоинвазивными игольчатыми криозондами новых криотерапевтических систем.

Материал и методы

Материалом для экспериментального исследования послужили бедренные кости 8 взрослых кроликов породы советская шиншилла, срок наблюдения после операции составил 7 и 55 суток.

Техника эксперимента. В условиях внутривенного наркоза тиопенталом натрия животным обнажали передне-латеральную поверхность левой бедренной кости на уровне средней трети и наносили перфорационное отверстие сверлом 1,5 мм до костномозгового канала. В это отверстие вводили криозонд диаметром 1,5 мм медицинской криотерапевтической системы (МКС) (производство Международного института криомедицины, Россия) (рис. 1).

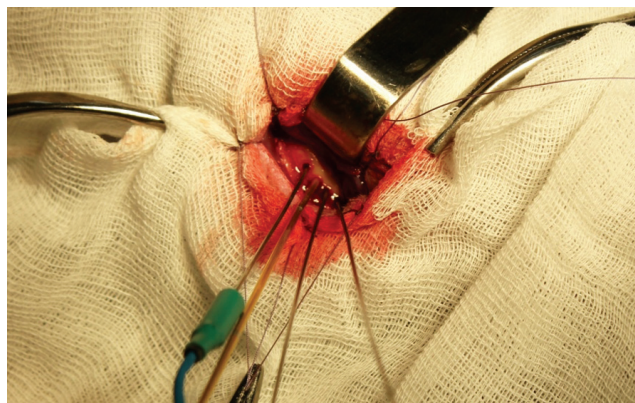


Рис. 1. Введение криозонда и термопар в просвет перфорационных отверстий

Fig. 1. Introduction of cryoprobe and thermocouples into the perforation holes

По оси кости наносили еще три перфорационных отверстия диаметром 0,8 мм до вскрытия костномозгового канала, в который вводили игольчатые термопары многоканального измерительного комплекса (ООО «МЕТИЗ», г. Томск) для динамической регистрации температуры тканей. Расстояние между перфорационными отверстиями для термометрии в первом остром опыте составляло 5 мм, во втором — 3 мм, что позволяло более точно определять конечное расположение изотерм на момент окончания охлаждения. Длительность охлаждения составляла 5 мин, максимальная скорость падения температуры криозонда в первые 30 сек во время захолаживания составляла 6,7 град./сек, затем постепенно сни-

жалась. Стабилизация температуры криозонда на уровне от -180°C до -190°C происходила к окончанию второй минуты. При этом продолжалось медленное расширение ледяной сферы. Длительность пассивного отогревания ограничивали 10 мин, при этом ледяная сфера полностью оттаивала, температура криозонда повышалась до $14-17^{\circ}\text{C}$. На этом фоне повторяли охлаждение с последующим пассивным оттаиванием, моделируя этим стандартный двухцикловой режим криодеструкции. Аналогичное криовоздействие с термометрией выполняли на бедре второй конечности.

В двух опытах после завершения термофизических исследований операцию завершали углублением наркоза, бедренные кости направляли на патоморфологическое исследование. В шести хронических опытах после извлечения криозонда рану зашивали послойно и помещали животных в виварий.

Животных выводили из опытов путем внутривенного введения тиопентала натрия на 7-е и 55-е сутки после операции. Первый срок гарантировал отсутствие перелома, а второй — завершение консолидации и полное восстановление функции конечности животного. Во время препаровки бедренные кости обеих конечностей иссекали с прилежащими мышцами и помещали для фиксации в 10% раствор нейтрального формалина.

Препараты костей после фиксации распиливали мини-пилой в продольном направлении по линии трепанационных отверстий на две равнозначные части. Одну часть оставляли для контрольного патоморфологического изучения, второй фрагмент подлежал исследованиям на механическую прочность.

Для оценки механической прочности на 7-е сутки после криодеструкции мы имели четыре образца: два образца с криогенным и два без криогенного воздействия, на 55-е сутки — также четыре образца: два после криодеструкции и два контрольных. При этом участок без криогенного воздействия служил «реперной точкой» в оценке степени повреждения костной ткани.

Методика оценки механической прочности заключалась в исследовании зависимости глубины проникновения алмазной пирамидки (индентора) в исследуемый фрагмент бедренной кости от величины усилия.

После снятия усилия на поверхности образца оставался отпечаток, соответствующий глубине погружения индентора. Ввиду того, что геометрические размеры индентора известны и строго регламентированы, непосредственно вычислять значения глубины погружения не требовалось, достаточно было знать только длину его диагонали. При вдавливании индентора в такой хрупкий материал, как кость возникала опасность образо-

вания трещин в точке приложения нагрузки, поэтому при измерении микротвердости прикладываемая нагрузка была ограничена небольшой величиной — 1 Н .

Исследование подготовленных образцов на механическую прочность осуществлялось на микротвердомере ПМТ-3. Наблюдение изображения осуществлялось при освещении в поляризованном (желтом) свете. Измерение значений диагоналей отпечатков производилось с помощью винтового окулярного микрометра МОВ-1-16х. Перемещаемый предметный столик (разрешающая способность перемещения по двум осям — 1 мкм) микротвердомера ПМТ-3 позволил провести многократные измерения по длине образцов с заданным шагом 250 мкм .

Статистический анализ

Статистический анализ включал вариационный анализ с использованием критерия Стьюдента для определения статистической значимости различий. Данный способ анализа применен для того, чтобы определить, случайны или достоверны, т.е. обусловлены какой-то причиной различия между измерениями. А также для того, чтобы выяснить, насколько значимо отличаются показатели одной измерительной выборки от другой. Уровень статистической значимости, принятый в статье, численно равен $0,05$. Обработка результатов экспериментов проведена в системе компьютерной алгебры MathCAD, которая была задумана и первоначально написана Алленом Раздовом из Массачусетского технологического института.

Патоморфологические исследования костных фрагментов выполняли после деминерализации материала, окраски срезов гематоксилином-эозином и изучения микроскопической картины. При этом оценивали сохранность остецитов, структурность костных балок, состояние кровеносных сосудов.

Результаты

После подачи в криозонд жидкого азота вокруг криозонда в течение 5 мин формировалась ледяная сфера диаметром от 19 до 20 мм. Результаты прямой термометрии с использованием многоканального термоизмерительного комплекса показали, что температура криозонда достигала -190°C , край ледяной сферы охлаждался до уровня -6°C . Девитализирующая изотерма уровня -40°C располагалась на границе между внутренней и средней третями радиуса ледяного эллипса на расстоянии 6–7 мм от поверхности криокамеры зонда.

У всех животных через 2–3 нед. после операции возникали переломы бедренной кости в зоне операции. При этом животные продолжали поль-

зваться конечностью, оставались активными и практически не щадили пораженную конечность. К исходу второго месяца патологическая подвижность исчезала. В контрольные сроки животных выводили из опытов. При макропрепаровке бедренная кость имела диаметр от 7 до 9 мм, толщину кортикального слоя — 1,5–2,1 мм. Кость в зоне перелома оказывалась деформированной, имела порочное положение периферической части, которая соединялась с проксимальным концом прочной костной мозолью.

Фрагменты опытных образцов кости исследовали на микротвердомере. На рисунке 2 представлены результаты измерений диагонали отпечатка d на образцах без криогенного воздействия, взятых на 7-е (точки в виде круга) и 55-е сутки (точки в виде треугольника). Видно, что наблюдается разброс показаний в зависимости от точки наблюдения L . Он вызван несколькими причинами: случайной погрешностью самих результатов измерений, особенностями строения костной ткани (измерение могло быть выполнено в точках с повышенной или пониженной ее плотностью). Для получения достоверных заключений оказалось необходимым адаптировать методы вариационного анализа к конкретным результатам измерений.

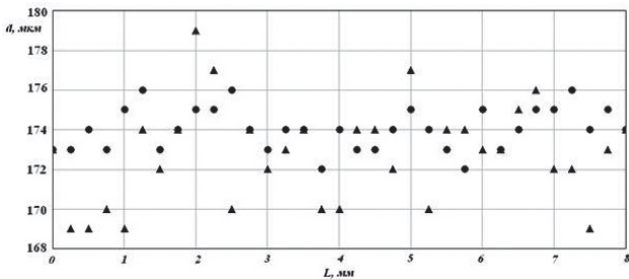


Рис. 2. Значения диаметра отпечатка индентора на фрагменте без криогенного воздействия на 7-е и 55-е сутки

Fig. 2. Values of indenter footprint at the bone site without cryogenic exposure at days 7 and 55 after procedure

Контролем послужили данные, полученные на здоровой кости. Здесь участки измерений являются образцовыми: костная ткань интактна, повреждений нет, поэтому можно оценить допустимый разброс в показаниях, который не свидетельствует об изменении прочности ткани вследствие ее повреждений при криогенных процедурах на двух фрагментах костной ткани (7-е и 55-е сутки). Для оценки этого разброса имеющиеся результаты измерений на фрагменте костной ткани контрольной конечности, взятой на 7-е сутки (таких значений набралось $n = 33$), обозначенные как d_1, d_2, \dots, d_n в виде выборки, необходимо проверить на однородность, воспользовавшись v -критерием:

$$v = \frac{d_{\max} - \bar{d}}{\sqrt{\frac{n-1}{n} \cdot s}},$$

где d_{\max} — наибольшее значение в ряду d_1, d_2, \dots, d_n ;

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n d_i \quad \text{— среднее значение;}$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2} \quad \text{—}$$

оценка среднеквадратического отклонения среди значений d_1, d_2, \dots, d_n .

Расчеты показывают, что $\bar{d} = 173,03$ мкм, $s = 1,06$ мкм и значение v составляет 2,81. Для того чтобы определить однородность выборки, следует сравнить значение v со справочным значением $v_{\text{крит}}$ по таблицам математической статистики. Значение $v_{\text{крит}}$ зависит от величины n и назначенного уровня значимости α (вероятности принять неверное решение). Как правило, α выбирают равным 0,05. Следовательно, $v_{\text{крит}} = 2,832$. Поскольку v ниже значения $v_{\text{крит}}$, можно говорить об однородности результатов измерений.

Теперь после завершения предварительной подготовки выборки можно вычислить значение d_0 . Метод наименьших квадратов указывает, что значение d_0 совпадает со средним значением

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n d_i$$

и, следовательно, составляет 173,03 мкм.

Аналогичная методика оценки однородности полученных результатов была проведена для образца интактной конечности, взятого на 55-е сутки. Проверка выборки показала, что среднее значение диаметра отпечатка $\bar{d} = d_0 = 172,76$ мкм, среднеквадратическое отклонение $s = 2,47$ мкм и значение v составляет 2,57. Поскольку полученное v также существенно ниже значения $v_{\text{крит}} = 2,832$, можно говорить об однородности результатов измерений и на контрольном образце, взятом на 55-е сутки.

После того как были получены достаточные основания считать, что сформированная выборка является однородной (для образцов без криогенного воздействия, взятых на 7-е и 55-е сутки), можно оценить пределы возможных отклонений отдельных значений d_i от среднего значения

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n d_i.$$

Их можно вычислить как границы интервала:

$$J = [\bar{d} - s \cdot k(n, P, Q), \bar{d} + s \cdot k(n, P, Q)],$$

где s — оценка среднеквадратического отклонения среди значений d_1, d_2, \dots, d_n .

Коэффициент $k(n, P, Q)$ является справочной величиной и выбирается исходя из количества значений n , величины вероятности случайного разброса P и величины вероятности Q перекрытия доверительным интервалом действительного интервала (обычно равны 0,80; 0,90 или 0,95).

Согласно «Таблицам математической статистики»*, для $n = 33$ и $P = Q = 0,95$ получаем $k \approx 2,6$. Следовательно, границы интервала для 7-суточного образца составляют $J_7 = [170,27; 175,79]$ мкм, а для 55-суточного — $J_{55} = [166,34; 179,18]$ мкм. Предел возможных отклонений равен 2,76 мкм и 6,42 мкм соответственно.

Для дальнейших действий потребовалась оценка погрешности вычисленного значения d_0 . Для этого рассчитан доверительный интервал для математического ожидания:

$$I = \left[d_0 - \frac{s}{\sqrt{n}} \cdot t, \quad d_0 + \frac{s}{\sqrt{n}} \cdot t \right],$$

где s – оценка среднеквадратического отклонения среди значений d_1, d_2, \dots, d_n , равная 1,06 и 2,47 соответственно для двух фрагментов костной ткани без криогенного воздействия; t – коэффициент Стьюдента для заданного значения доверительной вероятности P для выборки размером n . Значение t при $P = 0,95$ и $n = 33$ составляет 2,04.

С назначенной доверительной вероятностью $P = 0,95$ действительное значение средней длины диагонали отпечатка здоровой костной ткани не выйдет за пределы интервала. Следовательно, получаем, что для 7-суточного образца $I_7 = [172,65; 173,41]$ мкм, а для 55-суточного — $I_{55} = [171,88; 173,64]$ мкм.

Теперь, когда получены статистические сведения о возможных колебаниях результатов измерений длины диагонали отпечатка здоровой костной

ткани, можно выполнить анализ образцов, подвергшихся криовоздействию.

Для того чтобы признать тот или иной участок ткани поврежденным, следует результаты измерений сравнить со значением d_0 , вычисленным ранее, и учесть полученные сведения о характеристиках погрешности.

На рисунках 3 и 4 представлены данные, содержащиеся в сериях измерений на фрагментах костной ткани на 7-е (обозначены кружками) и 55-е сутки (обозначены треугольниками) после криогенного воздействия. Каждый результат измерения сопровождается интервалом его возможной случайной погрешности, вычисленным ранее: $\pm 2,76$ мкм и $\pm 6,42$ мкм соответственно для 7- и 55-суточных образцов (нанесен вертикальной линией на рисунки). Данные значения сравниваются со значением d_0 (диагонали отпечатков без криогенного воздействия) с учетом погрешности последнего (на рисунках 3 и 4 нанесены интервалы I_7 и I_{55} в виде двух горизонтальных линий).

Очевидно, что часть интервалов возможных значений длины диагоналей после криогенного воздействия пересекает интервал возможных значений d_0 . Данное обстоятельство свидетельствует о том, что данные результаты измерений нельзя считать значимо отличающимися от значений микротвердости здоровой костной ткани. Значит, нет оснований считать, что в соответствующих координатах наблюдались значимые повреждения костной ткани (уплотнение или разрушение). Данные результаты измерений на рисунках 3 и 4 очерчены черными прямоугольниками. Также на этих рисунках четко виден выход из зоны криогенного воздействия ($L \geq 7$ мм) — длина диагонали отпечатка индентора принимает значение, срав-

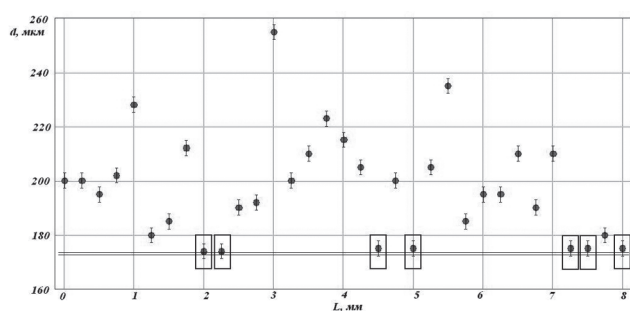


Рис. 3. Значения длины диагонали отпечатка индентора после криогенного воздействия в сравнении со значением длины диагонали отпечатка до криотерапии (7-е сутки)

Fig. 3. Diagonal values of indenter footprint at the bone site after cryogenic exposure as compared to values prior to cryotherapy (day 7)

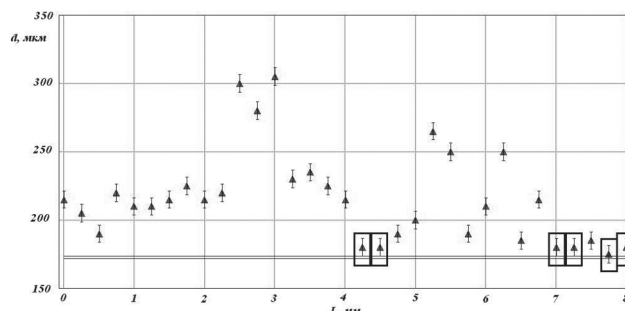


Рис. 4. Значения длины диагонали отпечатка индентора после криогенного воздействия в сравнении со значением длины диагонали отпечатка до криотерапии (55-е сутки)

Fig. 4. Diagonal values of indenter footprint at the bone site after cryogenic exposure as compared to values prior to cryotherapy (day 55)

* Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. М.: Наука. Главная редакция физико-математической литературы, 1983. С. 283.

нимое с длиной диагонали отпечатка образца без криогенного воздействия. На рисунке 5 показаны результаты относительного изменения прочности кости γ после криодеструкции (кружками — на 7-е, треугольником — на 55-е сутки). Становится очевидным, что криогенное воздействие на костную ткань приводит к ее частичному разрушению. Причем и степень разрушения костной ткани, и локализация повреждений кости по отношению к точке криовоздействия носят хаотичный характер.

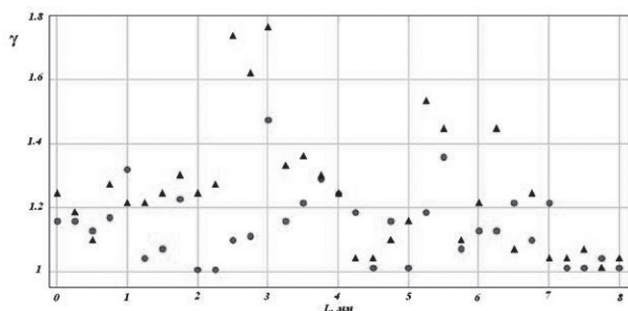


Рис. 5. Относительное изменение прочности кости после криодеструкции

Fig. 5. Relative changes in bone strength after cryodestruction

В области, прилегающей к зоне криодеструкции, присутствуют как участки с практически неповрежденной структурой (механическая прочность уменьшается в 1,0–1,2 раза), так и участки со значительной степенью разрушения (механическая прочность уменьшается в 1,5–2,0 раза).

Для подтверждения полученных результатов дополнительно были проведены патоморфологические исследования. Результаты этих исследований показывают, что криогенное воздействие сопровождается повреждением микроциркуляторного русла костной ткани с тромбозом микрососудов и формированием участков крионекроза. Несмотря на сохранность отдельных участков костной ткани, целостность кости оказывается нарушенной. Со временем, к окончанию второго месяца, в зоне крионекроза происходят регенеративные процессы, которые, однако, к этому сроку носят незавершенный характер.

На 7-е сутки после криодеструкции в зоне воздействия отмечалось замещение гемопоэтического костного мозга фиброзно-жировым, наличие кровоизлияний. Эта зона отграничивалась лимфо-гистиоцитарным валом от сохраненных структур костного мозга (рис. 6). Балочная структура — абсолютно сохраняемая, непосредственно в зоне заморозки выявлены резко выраженные дистрофические изменения и некроз остеоцитов, без признаков деструкции костных структур (рис. 7).

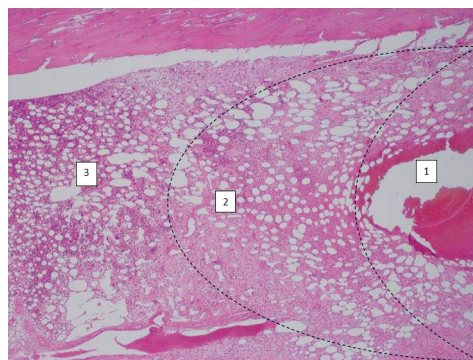


Рис. 6. Бедренная кость кролика, 7-е сутки после криодеструкции:

- 1 — область установки криодеструктора — кровоизлияние в костном мозге;
- 2 — зона сосудистых изменений и снижения количества элементов гемопоэза;
- 3 — сохранившийся костный мозг.

Окраска гематоксилином-эозином, ув. $\times 40$

Fig. 6. Femur of rabbit, day 7 after cryodestruction:

- 1 — area of cryodestructor introduction — marrow hemorrhage;
- 2 — area of vascular changes and reduced volume hemopoiesis substance;
- 3 — intact marrow.

Hematoxylin and eosin stain, mag. $\times 40$

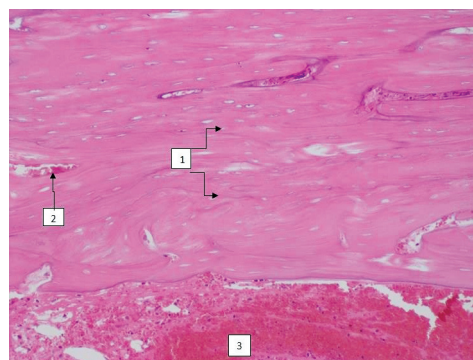


Рис. 7. Бедренная кость кролика, 7-е сутки после криодеструкции. Сохранная структура пластинчатой кости:

- 1 — некротизированные остеоциты;
- 2 — стаз в сосудах гаверсовых каналов;
- 3 — кровоизлияние в костном мозге.

Окраска гематоксилином-эозином, ув. $\times 200$

Fig. 7. Femur of rabbit, day 7 after cryodestruction. Intact structure of lamellar bone:

- 1 — necrotic osteocytes;
- 2 — vascular stasis in Haversian canals;
- 3 — marrow hemorrhage.

Hematoxylin and eosin stain, mag. $\times 200$

К 55-м суткам определялась очаговая пролиферация остеобластов и созревание грануляционной ткани, формирование новых костных балок (рис. 8). За счет этих процессов реализуется ремоделирование костной ткани в зоне криодеструкции.

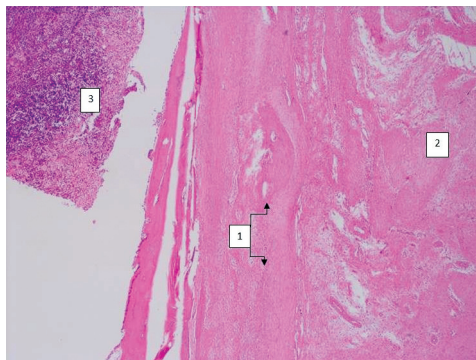


Рис. 8. Бедренная кость кролика, 55-е сутки после криодеструкции:
1 — новообразованные костные балки;
2 — созревающая грануляционная и фиброзная ткань;
3 — гемопоэтический костный мозг.
Окраска гематоксилином-эозином, ув. $\times 40$

Fig. 8. Femur of rabbit, day 55 after cryodestruction:
1 — newly formed bone trabecules;
2 — maturing granulation and fibrous tissues;
3 — hematopoietic marrow.
Hematoxylin and eosin stain, mag. $\times 40$

Описанная картина соответствует процессу ремоделирования костных структур.

Обсуждение

Изначально мы полагали, что промораживание кости до уровня температуры жидкого азота приведет к кристаллизации эндогенной воды, пучению льда и ее механическому повреждению. Прежде чем начинать экспериментальные исследования на животных, мы провели лабораторные поисковые опыты. При этом мы вводили криозонд в костномозговой канал нативной свиной бедренной кости и выполняли два типичных цикла криодеструкции. Оказалось, что после полного промораживания кость не теряла своей прочности. Сложилось впечатление, что криогенное охлаждение не оказывает воздействие на уже девитализированную ткань. Далее были поставлены эксперименты на кроликах, представленные в данной работе.

Сопоставление результатов патоморфологических исследований и данных определения микротвердости показывают очаговость криогенного поражения кости, внешним проявлением которой оказывается снижение прочности. Эти данные не соответствуют пространственному расположению зон изотерм вокруг точки охлаждения, известным

из термофизики. Более того, нарушения зарегистрированы на уровне изотермы -10°C , которая не обладает прямым цитодеструктивным действием, а на уровне деструктивной изотермы (-40°C) можно обнаружить фрагменты сохранной кости. Следовательно, природа повреждения имеет более сложные механизмы, чем прямое температурное повреждение механической структуры кости. Тем не менее представленный выше материал о низкой устойчивости кости к охлаждению может иметь объяснение.

Теплофизические свойства разных тканей человека и животных изучены достаточно, чтобы отметить существенные отличия кости в сравнении с мягкоткаными структурами. Известно, что костная ткань обладает относительно высокой плотностью ($1,92 \cdot 10^3 \text{ кг/м}^3$), высокой теплопроводностью ($0,79 \text{ Вт/(м}\cdot\text{К)}$) и низкой удельной теплоемкостью ($1,30 \cdot 10^3 \text{ Дж/(кг}\cdot\text{К)}$). Прилежащие кости мягкие мышцы имеют иные теплофизические характеристики, обладая двукратно меньшей плотностью ($1,05 \cdot 10^3 \text{ кг/м}^3$), относительно низкой теплопроводностью ($0,50 \text{ Вт/(м}\cdot\text{К)}$) при большой удельной теплоемкости ($3,46 \cdot 10^3 \text{ Дж/(кг}\cdot\text{К)}$) [9]. Это позволяет тепловым изменениям распространяться в кости с высокой скоростью, захватывать значительные объемы, поэтому любые перепады температуры всегда будут иметь для кости более опасные последствия, чем для окружающих тканей.

К сказанному необходимо добавить известные из нормальной анатомии особенности внутриорганного кровотока. Артериальное русло трубчатой кости имеет преимущественно магистральное строение, практически полное отсутствие коллатеральных путей и крайне низкую степень васкуляризации кортикального слоя, обеспечивающего в значительной мере механическую прочность. Поэтому криогенное повреждение в месте вхождения питающей артерии может иметь катастрофические последствия, в то время как локально ограниченное поверхностное охлаждение со стороны надкостницы представляется малоопасным и не повлечет заметного снижения прочности кости. Нарушение кровоснабжения, вероятно, имеет и отдаленные последствия, поскольку ухудшает условия для регенерации.

Мозаичность изменений твердости кости в совокупности с выявляемым на гистологических препаратах тромбозом кровеносных сосудов позволяет говорить о ведущей роли нарушений микроциркуляции в кости после охлаждения. Для костной ткани этот уровень охлаждения с учетом погрешности в термометрии, по нашим данным, находится в диапазоне от -8°C до -15°C . Изотерма с такими значениями располагалась на $1,0\text{--}1,5 \text{ мм}$ внутри от края оледенения с изотермой -6°C . Криорезистентность злокачественных клеток,

как уже отмечено выше, определяется порогом на уровне -40°C [26]. Даже с учетом того, что в развитии крионекроза злокачественной опухоли ишемия имеет не меньшее значение, избыточное разрушение здоровой кости неизбежно, поскольку опухоль обладает теплофизическими свойствами мягких тканей. При использовании стандартного режима криодеструкции опухолевого очага зона повреждения кости может достигать глубины до 8 мм от края кюретажной полости или точки размещения криозонда. Это всегда будет приводить к снижению прочности кости, имеющему ишемический генез вследствие тромбоза внутрикостных кровеносных сосудов.

Данные о различии теплофизических свойств кости в сравнении с опухолевыми тканями подсказывают возможный способ защиты ее от переохлаждения. Например, активное прогревание зоны криовоздействия на этапе экспозиции сформировавшегося в опухоли ледяного фронта током высокой частоты может препятствовать чрезмерному охлаждению здоровой кости. Однако такой вариант профилактики осложнений требует специального изучения.

При окончательной оценке результатов необходимо учитывать видовые отличия лабораторных животных. Отличительные особенности регенеративных процессов костей кроликов в виде избыточной периостальной реакции известны [27]. Авторы отметили, что в отдаленные сроки после криовоздействия, включая 16 нед., прочность кости в месте криоаппликации превышала нормальные значения, полученные на интактных образцах, а зона регенерации оказывалась богато васкуляризованной. Известно также, что стволовые клетки обладают высокой криорезистентностью, что обеспечивает гистотипичность регенерации: то есть кость, как и все другие здоровые ткани, после криодеструкции восстанавливается с формированием прежней гистологической структуры [28, 29].

Оценивая ограничения при интерпретации экспериментов, отметим, что из практики известно, что для консолидации переломов у человека необходимо большее время в сравнении с экспериментальными данными, полученными на животных. Поэтому совпадения в сроках снижения прочности у разных объектов скорее носят случайный характер и в большей степени зависят от объема повреждения. К тому же заметно, что режимы охлаждения в каждом экспериментальном исследовании не сопоставимы со всеми иными опытами, поэтому невозможно сравнивать и конкретные характеристики наблюдавшихся изменений. Количественные показатели также содержат в себе не только видовые особенности, но и погрешности измерения, что не позволяет адаптировать циф-

ровые значения к иным биологическим объектам или возможным клиническим ситуациям.

Другим важным ограничением результатов исследования служит малое число животных. При этом заключение о том, что малоинвазивное вмешательство может привести к критическому повреждению кости, считаем доказанным, поскольку переломы кости возникли у всех животных.

Важны и межвидовые различия. Однако механизмы криогенного повреждения биологических объектов на клеточном и тканевом уровнях одинаковы [29]. Поэтому можно полагать, что факты возникновения криогенных переломов и механизмы патогенеза снижения прочности кости отражают общие межвидовые закономерности.

Итак, крионекроз кости носит мозаичный характер, не имеет четкой границы и проявляется локальными провалами прочности уже к концу первой недели. Поэтому ограничительные меры по нагрузке необходимо рекомендовать уже в ближайшем послеоперационном периоде. Степень нарушения прочности и сроки наибольшего снижения зависят от интенсивности криовоздействия, точки приложения криозонда по отношению к питающим сосудам и от объема сохранившейся здоровой кости. Полученные данные позволяют рекомендовать использовать после криодеструкции опухоли меры для иммобилизации зоны операции и ее дополнительное укрепление с целью профилактики возможного послеоперационного патологического перелома. Риск перелома возрастает также при несоблюдении пациентом ограничительного режима, на что в беседах с пациентами мы обращаем особое внимание. Определение показаний к профилактическому остеосинтезу в каждом клиническом случае остается трудным выбором хирурга.

В основе снижения прочности кости после криодеструкции лежит нарушение микроциркуляции вследствие тромбоза внутрикостных кровеносных сосудов. Прочность кости снижается к исходу первой недели после криовоздействия и не восстанавливается в течение двух месяцев. Полное промораживание поперечника кости к условиям естественного поведения пациентов неизбежно приведет к патологическому перелому кости.

Этика публикации

Данное исследование проводилось в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.)

Конфликт интересов: не заявлен.

Источник финансирования: государственное бюджетное финансирование.

Вклад авторов

Беляев А.М. — определение цели и задач исследования.

Прохоров Г.Г. — выполнение криогенного воздействия с использованием криозондов.

Сушников В.А. — все лабораторные исследования прочности и статистическая обработка результатов.

Артемова А.С. — патоморфологические заключения по изучению гистологических препаратов.

Архицкая А.А. — проведение экспериментов, выполнение термометрических исследований.

Чуголова Д.А. — патологоанатомическая работа с животными и макро-препаратами костей.

Литература [References]

1. Демичев Н.П., Дианов С.В. Профилактика рецидивирования доброкачественных опухолей костей методом криодеструкции. *Вопросы онкологии*. 2008;54(5):592-595.
Demichev N.P., Dianov S.V. [Cryodestruction as a means of prophylaxis of benign bone tumor recurrence]. *Voprosy onkologii*. 2008;54(5):592-595. (In Russian).
2. Дианов С.В., Халагуммаев К.М. Криовоздействие в хирургическом лечении доброкачественных опухолей костей стопы. *Травматология и ортопедия России*. 2010;(3):74-78. DOI: 10.21823/2311-2905-2010-0-3-74-78.
Dianov S.V., Halagummaev K.M. [Crio-influence in surgical treatment of benign tumours of foot bones]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2010;(3):74-78. (In Russian). DOI: 10.21823/2311-2905-2010-0-3-74-78.
3. Marcove R.C., Miller T.R., Cahan W.C. The treatment of primary and metastatic bone tumors by repetitive freezing. *Bull N Y Acad Med*. 1968;44(5):532-544.
4. Meller I., Weinbroum A., Bickels J., Dadia S., Nirkin A., Merimsky O. et al. 15 years of bone tumor cryosurgery: a single-centre experience of 440 procedures and long term follow-up. *Eur J Surg Oncol*. 2008;34(8):921-927.
5. Прохоров Г.Г., Беляев А.М., Прохоров Д.Г. Приборы для малоинвазивной пункционной криодеструкции. В кн.: Основы клинической криомедицины. СПб., 2017. P. 565-568. ISBN 978-5-519-50989-3.
Prokhorov G.G., Belyaev A.M., Prokhorov D.G. Devices for miniinvasive puncture cryodestruction. In the book: *Basis of Clinical Cryomedicine*. St. Petersburg, 2017. pp. 565-568.
6. Pritsch T., Bickels J., Wu C.C., Squires H.M., Malawer M.M. The risk for fractures after curettage and cryosurgery around the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;458:159-167.
7. Currey J.D. Three analogies to explain the mechanical properties of bone. *Biorheology*. 1964;2(1):1-10. DOI: 10.3233/BIR-1964-2101.
8. Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Паршин Л.К., Мельников Б.Е., Шубняков И.И. Наноуровневый механизм жесткости и прочности кости. *Травматология и ортопедия России*. 2008;2(48):77-83.
Avrunin A.S., Tikhilov R.M., Parshin L.K., Melnikov B.E., Shubnyakov I.I. [The nanolevel mechanism of bone hardness and strength]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2008;(2);77-83.
9. Zhmakin A.I. *Fundamentals of cryobiology. Physical phenomena and mathematical models*. Springer, 2008. 278 p.
10. Marcove R.C., Weis L.D., Vaghaiwalla M.R., Pearson R., Huvos A.G. Cryosurgery in the treatment of giant cell tumors of bone. A report of 52 consecutive cases. *Cancer*. 1978;41(3):957-969.
11. Veth R.P.H., Schreuder H.W.B., Geest I.C.M. Cryosurgery for bone tumors. *Modern cryosurgery for cancer. World Sciences*; 2012; 40:773-779. ISBN-13/978-981-4329-65-1.
12. Gage A.A., Greene G.W., Neiders M.E., Emmings F.G. Freezing bone without excision. An experimental study of bone cell destruction and manner of regrowth in dogs. *JAMA*. 1966;196(9):770-774.
13. Schargus G., Winckler J., Schröder F., Schöfer B. Cryosurgical devitalization of bone and its regeneration. An experimental study with animals. *J Maxillofac Surg*. 1975;3(2):128-131.
14. Kuylenstierna R., Lundquist P.G., Nathanson A. Destruction and regeneration of jaw bone after cryogenic application. An experimental study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1980;89(6 Pt 1):582-589.
15. Rabb J.M., Renaud M.L., Brandt P.A., Witt C.W. Effect of freezing and thawing on the microcirculation and capillary endothelium of the hamster cheek pouch. *Cryobiology*. 1974;11(6):508-518.
16. Kuylenstierna R., Lundquist P.G., Nathanson A. Early morphological changes in rabbit mandible after cryogenic application. *Arch Otorinolaryngol*. 1980; 226(1-2):35-43.
17. Fisher A.D., Williams D.F., Bradley P.F. The effect of cryosurgery on the strength of bone. *Br J Oral Surg*. 1978;15(3):215-222.
18. Keijser L.C., Schreuder H.W., Boons H.W., Keulers B.J., Buma P., Huiskes R., Veth R.P. Bone grafting of cryosurgically treated bone defects: experiments in goats. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(396):215-222.
19. Keijser L.C., Schreuder H.W., Buma P., Weinans H., Veth R.P. Cryosurgery in long bones: an experimental study of necrosis and revitalization in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1999;119(7-8):440-444.
20. Popken F., Michael J.W., Zarghooni K., Sobottke R., Kasper H.U., Blaecker D. et al. Stability changes after cryosurgery in long tubular bones in correlation to histological results: an animal trail. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009;129(6):857-862. DOI: 10.1007/s00402-008-0704-9.
21. Беляев А.М., Г.Г. Прохоров. Криогенные технологии в онкологии. *Вопросы онкологии*. 2015;61(3):317-322.
Belyaev A.M., Prokhorov G.G. [Cryogenic technologies in oncology]. *Voprosy onkologii*. 2015;61(3):317-322. (In Russian).
22. Callstrom M.R., Atwell T.D., Charboneau J.W., Farrell M.A., Goetz M.P., Rubin J. et al. Painful metastases involving bone: percutaneous image-guided cryoablation — Prospective Trial Interim Analysis. *Radiology*. 2006;241(2):572-580 DOI: 10.1148/radiol.2412051247.
23. Prokhorov G.G., Gritsaenko A.E., Prokhorov D.G., Gasanov M.I., Klepikov V.V., Gurin A.V. et al. A minimally invasive cryotherapeutic system. *Biomedical Engineering*. 2017;51(1):41-45. DOI 10.1007/s10527-017-9681-z.
24. Xu Kecheng, Li Haibo, Mu Feng. Percutaneous cryoablation for treatment of painful bone metastases. *Modern cryosurgery for cancer. World Sciences*; 2012. pp. 801-815. ISBN-13/978-981-4329-65-1.
25. Popken F., Meschede P., Erberich H., Koy T., Bosse M., Fischer J.H., Eysel P. Complication after

- cryosurgery with new miniature cryoprobes in long hollow bones: an animal trail. *BMC Surg.* 2005;5:17. DOI: 10.1186/1471-2482-5-17.
26. Granov A.M., Prokhorov D.G., Andreev A.P. et al. Temperature measuring and evaluation of tumor cell viability in different zones of an ice ball. Practical application of in vitro experimental results. In: Basics of cryosurgery. ed. by N. Korpan. Wien, New York: Springer, 2001. pp. 15-24. ISBN 3211837019.
27. Brix G., Seebass V., Hellwig G., Griebel J. Estimation of heat transfer and temperature rise in partial-body regions during MR procedure: an analytical approach with respect to safety consideration. *Magn Reson Imaging.* 2002;20(1):65-76.
28. Raydan M., Shubin N.A., Blinova M.I., Prokhorov G.G., Pinaev G.P. Stability of bone marrow stromal cells to low temperatures depending on degree of differentiation. *Cell Tissue Biology.* 2011;5(3):294-299.
29. Шафранов В.В., Борхунова Е.Н., Цыганов Д.И., Торба А.И., Таганов А.В., Межов-Деглин Л.П., Калмыкова З.В., Подшивалова О.А. Современная концепция разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции. *Гуманитарный вестник.* 2013;12(14):8. Режим доступа: <http://hmbul.bmstu.ru/catalog/prmed/hidden/142.html>.
- Shafranov V.V., Borhunova E.N., Tsyganov D.I., Torba A.I., Taganov A.V., Mezhev-Deglin L.P., Kalmykova Z.V., Podshivalova O.A. [Modern concept of biological tissues destruction at local cryosurgery]. *Gumanitarnyi vestnik* [Humanities Bulletin of BMSTU]. 2013;12(14):8. (In Russian). Available from: <http://hmbul.bmstu.ru/catalog/prmed/hidden/142.html>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Беляев Алексей Михайлович — д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Прохоров Георгий Георгиевич — д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник научного отделения онкоурологии и общей онкологии, врач-онколог, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Сушников Виктор Александрович — канд. техн. наук, доцент, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Артемьева Анна Сергеевна — канд. мед. наук, заведующая отделением патоморфологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Архицкая Анна Андреевна — аспирант, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Чуглова Дина Александровна — научный сотрудник отделения патоморфологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Alexey M. Belyaev — Dr. Sci. (Med.), professor, director of Petrov National Medical Research Center (Petrov's Institute of Oncology), St. Petersburg, Russian Federation

Georgiy G. Prokhorov — Dr. Sci. (Med.), professor, leading researcher, Department of General Oncology, Petrov National Medical Research Center (Petrov's Institute of Oncology), St. Petersburg, Russian Federation

Viktor A. Sushnikov — Cand. Sci. (Tech.), associate professor, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Anna S. Artemyeva — Cand. Sci. (Med.), head of the Department of Pathomorphology, Petrov National Medical Research Center (Petrov's Institute of Oncology), St. Petersburg, Russian Federation

Anna A. Arkhitskaya — PhD student, Petrov National Medical Research Center (Petrov's Institute of Oncology), St. Petersburg, Russian Federation

Dina A. Chuglova — researcher, Department of Pathomorphology, Petrov National Medical Research Center (Petrov's Institute of Oncology), St. Petersburg, Russian Federation