

## ПРОГНОЗ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СОЗРЕВАНИЯ ДИСТРАКЦИОННОГО РЕГЕНЕРАТА

Н.В. Тушина, М.В. Стогов, Н.А. Кононович, А.А. Еманов

ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития России,  
директор – д.м.н. А.В. Губин  
г. Курган

Цель работы – исследовать особенности изменений биохимических показателей сыворотки крови у собак с замедленным созреванием distractionного регенерата после оперативного удлинения костей голени по Илизарову. В работе проведен сравнительный анализ биохимических изменений в сыворотке крови у животных с замедленным костеобразованием регенерата после оперативного удлинения костей голени по Илизарову. Обнаружено, что развитие устойчивой и выраженной гипокальциемии, значительное накопление неокисляемых продуктов распада в сыворотке крови в ходе оперативного удлинения костей конечностей по Илизарову являются неблагоприятными признаками, свидетельствующими о высокой вероятности нарушения дальнейшего формирования регенерата и последующего его созревания на этапе фиксации.

**Ключевые слова:** distractionный регенерат, биохимические показатели сыворотки крови, замедленный остеогенез.

## PREDICTION OF THE DURATION OF DISTRACTION REGENERATED BONE MATURATION

N.V. Tushina, M.V. Stogov, N.A. Kononovich, A.A. Yemanov

Aim of the study the characteristics of changes of serum biochemical parameters in dogs with delayed maturation of the distraction regenerate after surgical lengthening the leg bones by Ilizarov. The comparative analysis of biochemical changes in blood serum of animals with delayed regenerated bone osteogenesis after surgical leg bone lengthening according to Ilizarov has been made in the work. The development of persistent and marked hypocalcemia, significant accumulation of blood serum non-oxidized degradation products during limb bone surgical lengthening according to Ilizarov have been revealed to be adverse signs evidencing of the high probability of the disorder of further formation of the regenerated bone and its subsequent maturation at the stage of fixation.

**Key words:** distraction regenerated bone, blood biochemistry, delayed osteogenesis.

### Введение

Гистоморфологические и биохимические особенности костной репарации при distractionном остеогенезе изучены достаточно и освещены в ряде работ [2, 3, 8, 10]. Однако в клинической практике часто лимитирующим длительность лечения этапом является период фиксации, когда происходит активная минерализация и формирование (созревание) анатомически состоятельного distractionного регенерата [7]. Метаболическая природа и предикторы нарушений процесса созревания регенерата не изучены.

**Цель работы** – исследовать особенности изменений биохимических показателей сыворотки крови у собак с замедленным созреванием distractionного регенерата после оперативного удлинения костей голени по Илизарову.

### Материал и методы

Изучали биохимические показатели сыворотки крови 35 взрослых беспородных собак (воз-

раст 1,5–3 года), которым проводили оперативное удлинение костей голени по Илизарову. Всем животным осуществляли закрытую флексионную остеоклазию костей голени. Через 5 суток после нарушения целостности кости начинали distraction с темпом 1 мм в сутки за 4 приема в течение 28 суток. Величина удлинения в среднем составила  $14,5 \pm 1,8\%$  от общей длины сегмента. Далее следовал период фиксации до формирования анатомически состоятельного регенерата, оцениваемого по данным рентгенографии, после чего аппарат демонтировали. При этом в подавляющем большинстве случаев ( $n=28$ ) длительность фиксации составила 30 суток, тогда как у 7 животных срок фиксации составил 45 и более суток, эти животные нами были выделены в качестве основной группы. Животные с длительностью фиксации 30 суток составили группу сравнения. На проведение экспериментальных исследований получено разрешение комитета по этике при ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ.

В сыворотке крови определяли концентрацию общего белка, креатинина, мочевины, олигопептидов, общих липидов, общего холестерина, триглицеридов, глюкозы, молочной (МК) и пировиноградной кислот, общего и ионизированного кальция, неорганического фосфата, магния, хлоридов, диеновых конъюгат, малонового диальдегида, продуктов перекисного окисления белка (ПОБ), глюкуроновых (ГУК) и сиаловых кислот. Изучали активность щелочной (ЩФ) и тартратрезистентного изофермента кислой (ТрКФ) фосфатазы, креатинкиназы, лактатдегидрогеназы, аминотрансфераз. В плазме крови определяли суммарное содержание веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ), среди которых рассчитывали процент катаболического пула (ВНСММ<sub>кат%</sub>). В эритроцитах определяли активность антиоксидантного фермента – супероксиддисмутазы (СОД).

Активность ферментов сыворотки крови, а также концентрацию МК, общего белка, мочевины, креатинина, глюкозы, общего холестерина, триглицеридов, общего кальция, неорганического фосфата, магния, хлоридов определяли на биохимическом фотометре Stat Fax 1904+ (США), используя наборы реагентов фирмы Vital Diagnostic (РФ). Концентрацию общих липидов определяли с помощью наборов реактивов фирмы LaChema (Чехия), сиаловых кислот – наборами реагентов «Сиалотест 100» (РФ). Концентрацию ионизированного кальция рассчитывали из содержания общего кальция по белку сыворотки [6]. Активность СОД в эритроцитах определяли по реакции, основанной на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметсульфата. В депротеинизированной сыворотке определяли содержание ПВК по методу Бабаскина [1], ГУК – по реакции с карбазолом [9], в плазме – МДА по реакции с тиобарбитуровой кислотой [5]. Уровень диеновых конъюгат в плазме крови определяли в гептановой фазе гептан-изопропаноловой (1:1) смеси при длине волны 232 нм. Содержание олигопептидов и ВНСММ в плазме крови и эритроцитах находили по методу Малаховой [6]. Продукты ПОБ сыворотки крови определяли в белковом осадке по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [4].

Достоверность различий между двумя выборками оценивали с помощью W-критерия Вилкоксона для независимых выборок. Корреляционную зависимость между выборками, подчиняющимся закону нормального распределения, оценивали по критерию Пирсона, не подчиняющимся – по критерию Спирмена.

Факторный анализ проводили методом главных факторов, метод оценки общностей – анализ главных компонент.

### Результаты и обсуждение

У животных обеих групп рентгенологическая картина формирования дистракционного регенерата на этапе удлинения была идентичной. Во всех случаях рентгенологически к 14-м суткам дистракции регенерат имел зональное строение. Высота как проксимального так и дистального костных отделов регенерата составляла в среднем  $5,3 \pm 1,2$  мм, срединной зоны просветления – в среднем  $4,2 \pm 0,5$  мм. Концы костных отделов регенерата имели зубчатый контур (рис. 1 а, 2 а). К окончанию периода дистракции у животных обеих групп регенерат приобретал нормопластическую или гиперпластическую форму. Его зональное строение сохранялось. Высота срединной зоны просветления снижалась до  $2,4 \pm 1,28$  мм, её на всем протяжении пересекали трабекулярные тени, образующие костные «мостики» (рис. 1 б, 2 б). Во всех случаях при формировании механически состоятельного новообразованного участка диафиза рентгенологически регенерат утрачивал зональное строение и приобретал гомогенную структуру. Срединную зону просветления перекрывали тени высокой интенсивности в сравнении с близлежащими участками регенерата. Периостальные образования объединялись между собой, формируя непрерывную корковую пластинку, толщина которой достигала 2,0 мм (рис. 1 в).

В основной группе первые, визуально определяемые, рентгенологические признаки нарушения формирования дистракционного регенерата наблюдались лишь к 30-м суткам фиксации. У 4 животных при нормопластическом либо гиперпластическом типе регенерата сохранялась срединная зона просветления в виде отдельных участков (рис. 2 г). В 3-х случаях регенерат утрачивал зональное строение, однако соответствовал гипопластическому типу. Сформированная непрерывная корковая пластинка была тонкой (толщина не превышала 1,0 мм), а гомогенные тени, перекрывающие единую костномозговую полость – низкой интенсивности по отношению к группе сравнения (рис. 2 в). Перечисленные признаки в основной группе указывали на необходимость продолжения фиксации аппаратом.

Все выше сказанное свидетельствует об отсутствии четких рентгенологических признаков, которые в период дистракции могут указывать на замедление процессов формирования механически состоятельного участка диафиза в после-

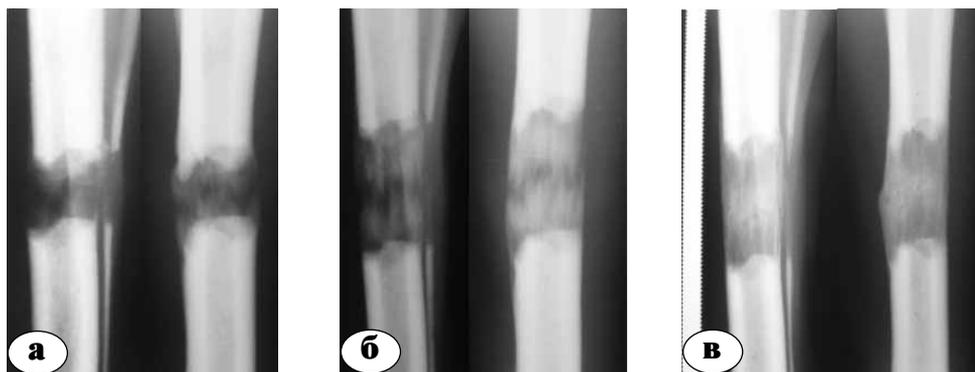


Рис. 1. Фрагменты рентгенограмм, группа сравнения, собака № 4510: а – дистракция 14 суток, б – окончание периода дистракции, в – фиксация 30 суток

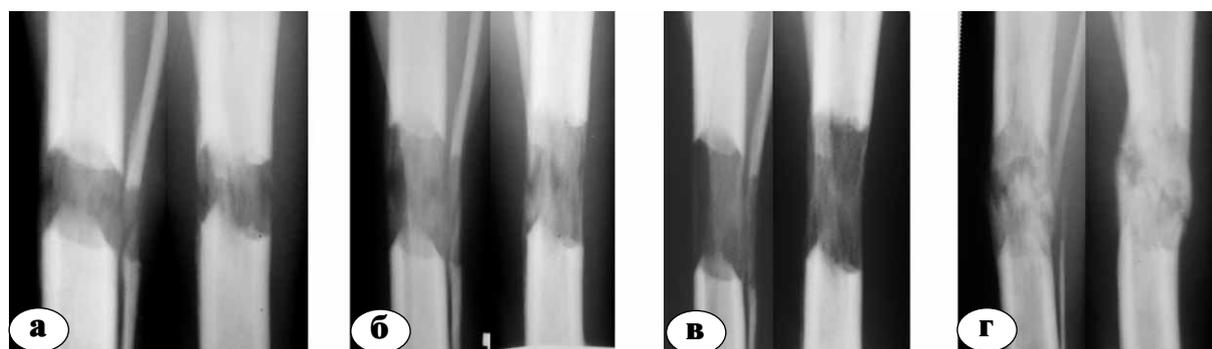


Рис. 2. Фрагменты рентгенограмм, основная группа: а – дистракция 14 суток, собака № 4321; б – окончание периода дистракции, собака № 4321; в – фиксация 30 суток, собака № 4321; г – фиксация 30 суток, собака № 4286

дующем. Это, в свою очередь, дает предпосылки к поиску соответствующих этиологических факторов путем оценки динамики метаболических процессов на разных этапах удлинения.

При оценке биохимического состава сыворотки крови у животных изучаемых экспериментальных групп достоверных отличий дооперационного фона между показателями не выявили.

В ходе эксперимента мы обнаружили, что в основной группе наиболее существенно изменялась концентрация ионизированного кальция, олигопептидов и МК (рис. 3). Так, уровень ионизированного кальция на 14–28-е сутки дистракции и 30-е сутки фиксации был достоверно ниже как дооперационного уровня, так и значений группы сравнения. Концентрация

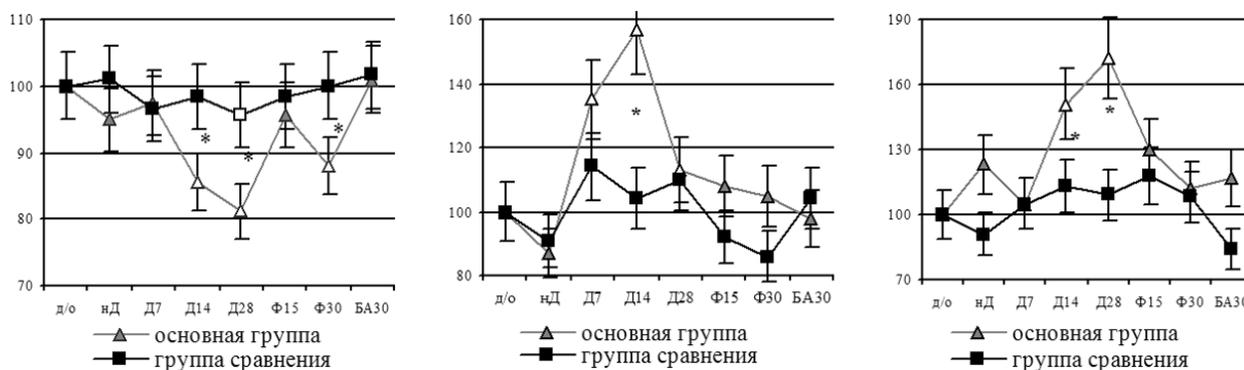


Рис. 3. Сравнительная динамика изменения концентрации ионизированного кальция (моль/л), олигопептидов (ммоль/л) и молочной кислоты (моль/л) в сыворотке крови собак в ходе эксперимента.

Примечание. По оси ОХ – % от уровня дооперационных значений. Сроки эксперимента: д/о – до операции, нД – начало дистракции, 14Д – 14-е сутки дистракции; 28Д – 28-е сутки дистракции; 15Ф – 15-е сутки фиксации; 30Ф – 30-е сутки фиксации; БА30 – 1 месяц после снятия аппарата. Белые маркеры на графике – достоверные отличия от дооперационного уровня при  $p=0,05$ . \* – значимость различий между группами при  $p<0,05$

молочной кислоты и олигопептидов достоверно увеличивалась на 14–28-е и на 7–14-е сутки distractionii соответственно.

Ряд показателей имели достоверные отличия относительно собак группы сравнения на отдельных этапах (табл. 1). Так, к 7-м суткам distractionii отмечался значительный прирост активности ЩФ на фоне более выраженной гипопроотеинемии. На 14-е сутки удлинения существенно снижалась активность ТрКФ. Уровень фосфата, процент продуктов катаболизма среди ВНСММ (ВНСММКат%) и продукты ПОБ к окончанию периода distractionii были заметно выше относительно дооперационного уровня и значений животных группы сравнения. И, наконец, через 15 суток фиксации в сыворотке крови определяли достоверное повышение содержания ГУК и снижение активности СОД в эритроцитах.

Динамика остальных изученных показателей сыворотки крови животных обеих групп была одинакова, их значения на сроках эксперимента не имели достоверных отличий.

Таким образом, профиль биохимических показателей сыворотки крови у собак основной группы на всех сроках наблюдения отличался относительно животных группы сравнения, при этом наибольшее расхождение биохимических параметров крови наблюдалось в период с 14-х по 28-е сутки distractionii (на этих сроках достоверные отличия отмечались для 7 из 28 изученных показателей). В целом на разных сроках наблюдения достоверные отличия отмечены для 11 показателей, затрагивающих все звенья обмена: углеводный, липидный, белковый, минеральный.

Чтобы получить определенное представление о ведущих метаболических нарушениях, приведших к замедленному костеобразованию

у экспериментальных животных, мы использовали дополнительные методы оценки результатов – корреляционный и факторный анализ. Нами обнаружено, что на 14-е сутки distractionii достоверно с длительностью фиксации (выражена в сутках) коррелировала концентрация ионизированного кальция, олигопептидов и активность ТрКФ, соответственно:  $r$  (Са/срок фиксации) =  $-0,80$  ( $p=0,05$ ),  $r$  (олигопептиды/срок фиксации) =  $+0,80$  ( $p=0,05$ ),  $r$  (ТрКФ/срок фиксации) =  $-0,66$  ( $p=0,05$ ). Для более детальной оценки корреляционных связей мы провели факторный анализ. Результаты анализа обнаружили, что биохимические показатели сыворотки крови были достоверно связаны со значениями длительности фиксации только на сроке 14-е сутки distractionii, и таким показателем являлся ионизированный кальций (табл. 2).

Такой результат указывает на то, что нарушения кальций-фосфорного баланса, развивающиеся к концу distractionii, могли быть причиной замедленного созревания distractionii регенерата у животных основной группы. Механизмы, приводящие к этому, выглядят достаточно просто: длительное и значительное снижение уровня ионизированного кальция в крови животных вызывает значительный выброс паратиреоидного гормона, который повышает уровень кальция за счет его поступления из кости, что, как следствие, приводит к снижению интенсивности минерализации в периоде фиксации. Однако гипокальциемии как единственного фактора, приводящего к замедлению минерализации регенерата, на наш взгляд, не вполне достаточно, т.к. нельзя игнорировать изменения других показателей, которые у животных основной группы имели значимые отличия от животных группы сравнения, но для которых корреляционной зависимости с длительностью фиксации не обнаружено.

Таблица 1

**Сроки эксперимента, на которых биохимические показатели животных основной группы имели достоверные отличия от показателей животных группы сравнения**

Срок	Показатель	Значения группы сравнения в % от дооперационного уровня	Значения основной группы в % от дооперационного уровня
7-е сутки distractionii	ЩФ	149	182 <sup>0,05</sup>
7-е сутки distractionii	Общий белок	99	91 <sup>0,04</sup>
14-е сутки distractionii	ТрКФ	106	85 <sup>0,03</sup>
28-е сутки distractionii	ПОБ	102	140 <sup>0,01</sup>
28-е сутки distractionii	ВНСММ <sub>кат%</sub>	83	126 <sup>0,004</sup>
28-е сутки distractionii	Фосфат	108	129 <sup>0,03</sup>
15-е сутки фиксации	ГУК	120	154 <sup>0,05</sup>
15-е сутки фиксации	СОД	189	114 <sup>0,01</sup>

Верхний индекс – уровень значимости отличий между группами.

Таблица 2

**Матрица факторных нагрузок биохимических показателей сыворотки крови животных основной группы на 14-е сутки distraction**

Показатель	Фактор					
	1	2	3	4	5	6
Длительность фиксации						<b>0,956</b>
Щелочная фосфатаза			0,966			
Магний					0,860	
Хлориды	0,990					
Неорганический фосфат				0,832		
Лактатдегидрогеназа		0,918				
Креатинкиназа					0,696	
Молочная кислота	0,775					
Пировиноградная кислота			-0,845			
Общий белок			0,780			
Диновые конъюгаты				0,802		
Малоновый диальдегид		0,953				
Продукты перекисного окисления белков	0,765					
Ионизированный кальций						<b>-0,859</b>
% выделенной дисперсии	31,6	21,8	17,7	11,4	10,7	6,8

Примечание. Существенными считали те факторы, выделенная дисперсия которых превышала 5%. Указаны факторные нагрузки тех показателей, значения которых превышали по модулю 0,72, т.к. при этом уровень значимости был меньше 0,05.

В частности, мы обратили внимание на тот факт, что у животных основной группы к концу distraction и в первой половине фиксации отмечалось более интенсивное, чем в группе сравнения, накопление в крови продуктов распада (МК, ПОБ, ГУК, олигопептиды, ВНСММ<sub>Кат%</sub>). Такое явление, по-нашему мнению, есть следствие дезадаптации организма этих животных к оперативному удлинению. Выше сказанное позволяет резюмировать, что длительная гипокальциемия на фоне устойчивого накопления в крови продуктов распада, наблюдаемые в ходе оперативного удлинения, можно отнести к критериям, указывающим на необходимость коррекции режима distraction или ее прекращения.

### Выводы

Таким образом, результаты проведенного исследования не позволяют однозначно ответить на вопрос о том, является ли замедление скорости созревания distractionного регенерата, сформированного после оперативного удлинения костей голени по Илизарову, моно- или полиэтиологичным по своей природе, однако с большей однозначностью можно сформулировать следующие выводы:

1) характер минерализации distractionного

ного регенерата определяется функционально-метаболическим состоянием «заинтересованных» систем организма (сердечно-сосудистая, костно-мышечная, эндокринная, пищеварительная, выделительная) на момент окончания distraction;

2) развитие устойчивой и выраженной гипокальциемии, значительное накопление неокисляемых продуктов распада (молочная кислота, продукты перекисного окисления, ВНСММ) в сыворотке крови в ходе оперативного удлинения костей конечностей по Илизарову являются неблагоприятным признаком, свидетельствующим о высокой вероятности нарушения дальнейшего формирования регенерата и последующего его созревания на этапе фиксации.

### Литература

1. Бабаскин, Б.С. Определение пировиноградной кислоты модифицированным методом Умбрайт / Б.С. Бабаскин // Лаб. дело. — 1976. — №3. — С. 76–78.
2. Биохимические аспекты регуляции distractionного остеогенеза / В.И. Шевцов, К.С. Десятниченко, О.П. Березовская, Л.С. Кузнецова // Вестник РАМН. — 2000. — № 2. — С. 30–35.
3. Кочутина, Л.Н. Регенерационный миогенез мышц голени при ее удлинении в эксперименте / Л.Н. Кочутина // Изв. АН СССР: Сер. Биол. — 1990. — № 4. — С. 565–570.

4. Различия в процессах перекисного окисления белков у беременных крыс, селективных по порогу возбудимости нервной системы / А.В. Вьюшина [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2002. — № 3. — С. 292–294.
5. Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — 392 с.
6. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л.А. Даниловой. — СПб.: Питер, 2003. — 736 с.
7. Шевцов, В.И. Оперативное удлинение нижних конечностей / В.И. Шевцов, А.В. Попков. — М.: Медицина, 1998. — 192 с.
8. Шевцов, В.И. Стереологический анализ передней большеберцовой мышцы и капилляров эндомизия в эксперименте с дозированным удлинением голени при четырехкратной и автоматической дробностью / В.И. Шевцов, Г.Н. Филимонова, С.А. Ерофеев // Гений ортопедии. — 2004. — № 1. — С. 17–24.
9. Bitter, T. A modified uronic acid carbazole reactions / T. Bitter, H.M. Muir // Anal. Biochem. — 1962. — Vol.4, N 4. — P. 330–334.
10. Tsujimura T. Response of rabbit skeletal muscle to tibial lengthening / T. Tsujimura, M. Kinoshita, M. Abe // J. Orthop. Sci. — 2006. — Vol.11, N 2. — P. 185–190.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Тушина Наталья Владимировна – младший научный сотрудник клинико-экспериментального лабораторного отдела  
E-mail: E-mail.: office@ilizarov.ru;

Стогов Максим Валерьевич – д.б.н. ведущий научный сотрудник клинико-экспериментального лабораторного отдела  
E-mail: stogo\_off@list.ru;

Кононович Наталья Андреевна – к.в.н. старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной травматологии и ортопедии  
E-mail: n.a.kononovich@mail.ru;

Еманов Андрей Александрович – к.в.н. научный сотрудник лаборатории экспериментальной травматологии и ортопедии  
E-mail: a\_eman@list.ru.