

УДК: 616-018.4-001.19-089:615.832.97-092.9

Субдеструктивное криовоздействие на костную ткань в эксперименте© Г.В. СЛИЗОВСКИЙ,¹ И.И. КУЖЕЛИВСКИЙ¹, Л.А. СИТКО²Сибирский государственный медицинский университет¹, Московский тракт, д. 2, Томск, 634050, Российская ФедерацияОмская государственная медицинская академия², ул. Ленина, д. 12, Омск, 644099, Российская Федерация

Актуальность Трендом современной хирургии при внедрении новых способов лечения является отработка всех этапов предлагаемого способа лечения на экспериментальной модели. В настоящей работе были проведены сравнительные исследования на лабораторных животных, направленные на изучение реакции костной ткани при субдеструктивном криовоздействии.

Цель Выявить наиболее оптимальную экспозицию хладагента для достижения криорегенеративного действия ультранизких температур.

Материалы и методы Экспериментальное исследование проводилось на кроликах «Шиншилла» путём криовоздействия в полости остеоперфораций с различной экспозицией хладагента (жидкого азота). Через 10 суток после выведения животного из эксперимента проводились морфологические исследования.

Результаты Выявлено, что при экспозиции в 3 секунды наблюдается активная регенерация, тогда как при длительной экспозиции наблюдался криоостеонекроз. Результаты экспериментальных исследований позволяют дифференцированно рекомендовать их для использования в клинической практике.

Заключение Световая микроскопия криорегенерата с трёхсекундной экспозицией хладагента демонстрирует очень активную кальцинацию регенерата. Первичная костная мозоль состоит из волокнистой и ретикулофиброзной ткани. Регенерат представлен цепочками остеобластов. Предлагаемый режим криовоздействия целесообразно применять при дегенеративно-дистрофических заболеваниях костной ткани с целью повышения остеорепаративных свойств костной ткани.

Ключевые слова: регенерация, никелид титана, криовоздействие, субдеструкция

Bone Subdestructive Kryoapplicaton in the Experiment© G.V. SLIZOVSKIY¹, I.I. KUZHELIVSKIY¹, L.A. SITKO²Siberian State Medical University¹, 2 Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russian FederationOmsk State Medical Academy², 12 Lenin str., Omsk, 644099, Russian Federation

Relevance Trend of modern surgery in the implementation of new methods of treatment is to develop all phases of the proposed method of treatment in an experimental model. In this paper, comparative studies have been performed in laboratory animals, aimed at studying the bone tissue reaction at subdestruktion cryotherapy.

Purpose Identify the optimal exposure of the refrigerant to achieve kryoregenerative action ultralow temperatures.

Materials and methods An experimental study was conducted on rabbits "Chinchilla" by cryotherapy in the cavity osteoperforation with different exposure refrigerant (liquid nitrogen). After 10 days after the removal of the animal from an experiment conducted morphological study.

Results It was found that the exposure of 3 seconds is observed active regeneration, while kryoosteonekrosis observed during long-term exposure. The experimental results allow differentiated recommend them for use in clinical practice.

Conclusion Light microscopy kryoregeneration with a three-second exposure shows the refrigerant is very active calcification regenerate. Primary callus composed of fibrous tissue and retikulofibrosis. Reclaimed presented osteoblasts chain. The proposed regime is advisable to apply cryotherapy with degenerative diseases of the bone in order to increase osteoreparative properties of bone.

Key words: regeneration, titanium nickelide, kryoregeneration, subdestruktion

В современной хирургии воздействие ультранизкой температурой на биологическую ткань ассоциируется, как правило, с её последующим разрушением [1]. Однако если производить постепенное отведение тепла или с небольшой экспозицией – возможно использование другого свойства ультранизких температур – эффекта субдеструктивного криовоздействия

с последующей регенерацией ткани. Использование субдеструктивного криовоздействия возможно в самых разных дисциплинах современной медицины при дегенеративно-дистрофических, некротических и хронических воспалительных процессах, когда требуется стимуляция регенерации ткани [2,3]. Идея применения субдеструктивного криовоздействия в нашем случае

© Г.В. Слизовский, И.И. Кужеливский, Л.А. Ситко Субдеструктивное криовоздействие на костную ткань в эксперименте. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2017; 10: 1: 44-48. DOI: 10.18499/2070-478X-2017-10-1-44-48.

сфокусирована на лечении асептического некроза головки бедренной кости у детей (болезнь Легг-Кальве-Пертеса) путём туннелизации шейки бедренной кости и криовоздействия на очаг остеонекроза в головке. Однако, как известно, перед применением способа в клинике необходимо проведение экспериментальных испытаний на лабораторных животных.

Все экспериментальные исследования проводились с учетом требований Хельсинской Декларации обращения с животными и в строгом соответствии с Международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных и ТПК 125-2008* (02040). Эксперименты выполнены с соблюдением требований приказа Минздрава СССР № 176 от 12.08.1977 г.

Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России проведение научно-исследовательской работы по протоколу «Хирургическое лечение диспластических заболеваний у детей с использованием криотехнологий, имплантов никелида титана и методов ранней артропластики» (экспериментальная часть) было одобрено с заключением о соответствии запланированных экспериментальных исследований этическим нормам и регламентирующим правилам (регистрационный № 4669/1 от 21.03.2016 г.). Экспериментальные исследования проводились на базе лаборатории биологических моделей ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заведующий лабораторией Иванов В.В.).

Гистологические исследования проводились на базе кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (заведующая проф. Завьялова М.В.). Рентгенологические исследования проводились на базе ветеринарной клиники при сельскохозяйственной академии г.Томска (заведующий Недзельский А.П.), отделения ветеринарии (ветеринарный врач Максимов В.И.).

Цель: выявить оптимальную субдеструктивную (криорегенеративную) экспозицию хладагента.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводилось на базе лаборатории биологических моделей при ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (зав. лаб. Иванов В.В.). В эксперименте приняло участие 30 кроликов породы «шиншилла» обоего пола, возраст животных от 6 месяцев до 1 года, масса тела 2700-3500 грамм. Деление животных на группы исследования не проводилось. Содержание животных в виварии, в клетках 12 часов день, 12 часов ночь. Питание в условиях вивария стандартное. Операции проводились под общим обезболиванием в соответствии с этическими требованиями к экспериментальной работе после изоляции в карантинном отделении в течение 15 дней.

Для достижения заявленной цели и выполнения поставленных задач нами были осуществлены экспериментальные исследования, направленные на из-

учение субдеструктивного (криорегенеративного) воздействия на костную ткань. Гистоморфологические исследования (световая микроскопия) проводились на 10е сутки после остеоперфораций с целью изучения интенсивности регенеративных изменений костной структуры после криовоздействия с различной экспозицией и сравнения их с контрольными остеоперфорациями. Для окраски полутонких срезов использовали толуидиновый синий.

Ход эксперимента. Условия операционной. Под общим обезболиванием 0,5 мл рометара выбрито операционное поле. После общей анестезии с использованием пропофола и заливки проведен прямой разрез кожи животного в проекции левой бедренной кости длиной до 9см. Электрической дрелью произведено 5 фрезевых отверстий диаметром 3мм на протяжении диафиза бедренной кости через 1 см в направлении от проксимальной части кости к дистальной. Далее проведено поочерёдное криовоздействие каждого фрезевого отверстия жидким азотом с экспозицией от 3 секунд от проксимального края, далее 6, 9 и 12 секунд. Пятое отверстие оставлено без криовоздействия (контроль). Криовоздействие проводилось специальным аппликатором из пористого никелида титана «пинцет» производства НИИ Медицинских материалов и имплантов с памятью формы при ТГУ (директор проф. Гюнтер В.Э.) с порционным дозатором хладагента [1]. Ушивание раны послойно, обработка кожи в области послеоперационного шва антисептиком. Введен антибиотик внутримышечно (цефазолин). Животное из наркоза вышло гладко, отпаивание и уход стандартный для послеоперационного животного. В послеоперационном периоде самочувствие животного было удовлетворительное. Раза зажала вторичным натяжением.

Результаты исследования

На 10-е сутки после проведенных оперативных вмешательств интраоперационно под наркозом был иссечен сформировавшийся рубец и после доступа к бедру была произведена ревизия диафиза кости. Визуальный осмотр показал менее выраженные регенеративные изменения во фрезевых отверстиях контроля, с 6-ти и 9ти секундной экспозицией хладагента, тогда как в области отверстия с 3-х секундной экспозицией визуализировались наиболее выраженные светлые плотно-эластичные белесоватые наслоения, внешне напоминающие соединительную ткань (рис. 1).

Далее проведен забор криорегенерата с использованием глазного скальпеля Optimum и микроложечки фолькмана из каждого фрезевого отверстия для проведения светового и электронного микроскопических исследований. Помимо забора криорегенерата был произведен забор регенерата из контрольного фрезевого отверстия без криовоздействия (рис. 2).

Гистоморфологическое исследование регенерата группы контроля демонстрирует обычное образование первичной костной мозоли через развитие хрящевой и

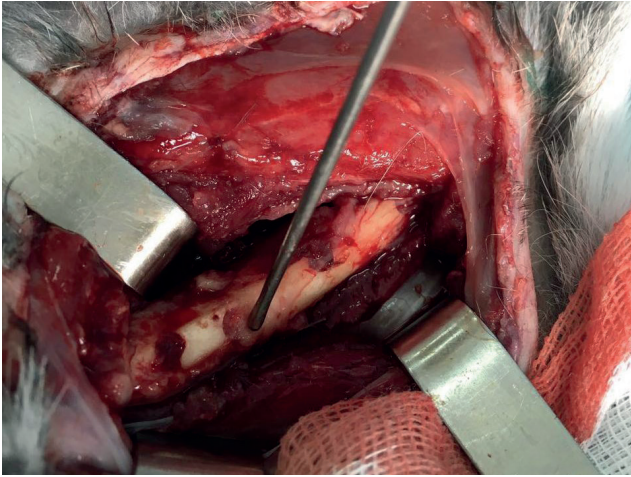


Рис. 1. Фибриновые наложения в области отверстия с 3-х секундной экспозицией хладагента. Интраоперационный снимок. / Fig. 1. Fibrinous layers in the area of the hole with a 3-second exposure of the refrigerant. Intraoperative picture.

соединительной ткани. Подобная микроскопическая картина демонстрирует типичные процессы остеогенеза. Световая микроскопия криорегенерата с трёхсекундной экспозицией хладагента демонстрирует очень активную кальцинацию регенерата. Первичная костная мозоль состоит из волокнистой и ретикулофиброзной ткани. Регенерат представлен цепочками остеобластов (рис. 3).

Световая микроскопия криорегенерата с шестисекундной экспозицией хладагента демонстрирует единичные остеобласты, образование костной мозоли через развитие хрящевой и соединительной ткани с преобладанием соединительной (рис. 4).

Микроскопическая картина 9-ти секундной экспозиции представлена в основном соединительной тканью. Анализируя гистиоцитарную реакцию в реге-

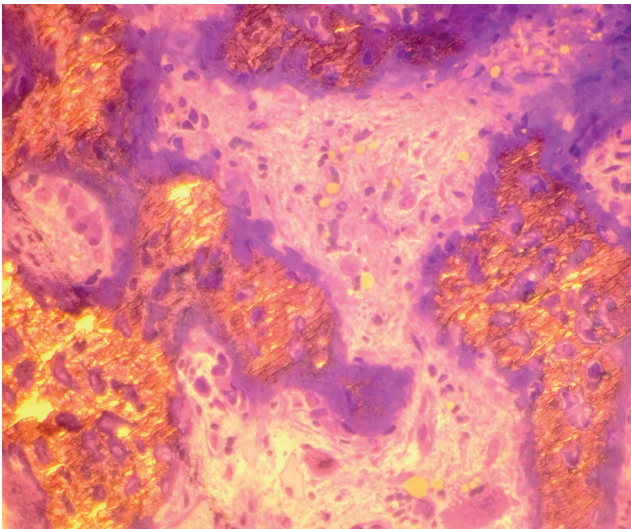


Рис. 3. Образование кальцинированной первичной костной мозоли через ретикулофиброзную ткань. Полутонкий срез. Окраска - толуидиновый синий. Увеличение 70. / Fig. 3. Activation soda primary callus tissue through retikulofibrosis. Semifine slice. Painting - toluidine blue Increase 70.

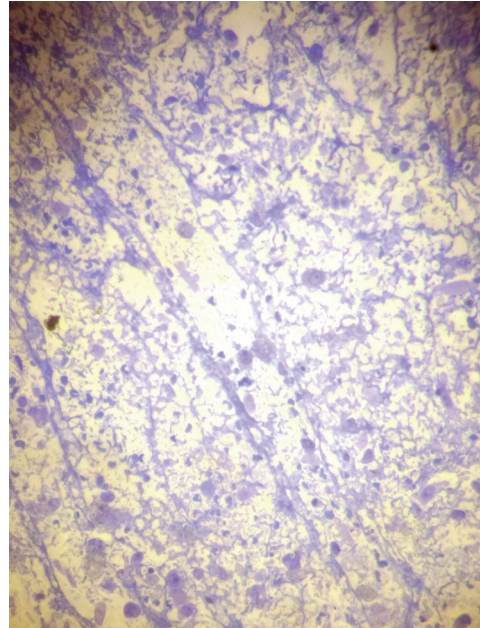


Рис. 2. Образование хрящевой и соединительной ткани в контрольном отверстии, единичные хондроциты. Полутонкий срез. Окраска - толуидиновый синий. Увеличение 50. / Fig. 2. Formation of cartilage and connective tissue in the control hole, isolated chondrocytes. Semifine slice. Painting - toluidine blue Increase 50.

нератах 6-9 секунд можно сделать вывод, что она не столь активна как при 3х секундной экспозицией (нет остеобластов и низкое содержание хрящевой ткани), однако регенеративная активность выше в сравнении с контрольным отверстием (без криовоздействия) (рис. 5).

Далее представлены результаты световой микроскопии криорегенерата с экспозицией 12 секунд. Световая микроскопия криорегенерата с двенадцатисекундной экспозицией хладагента демонстрирует

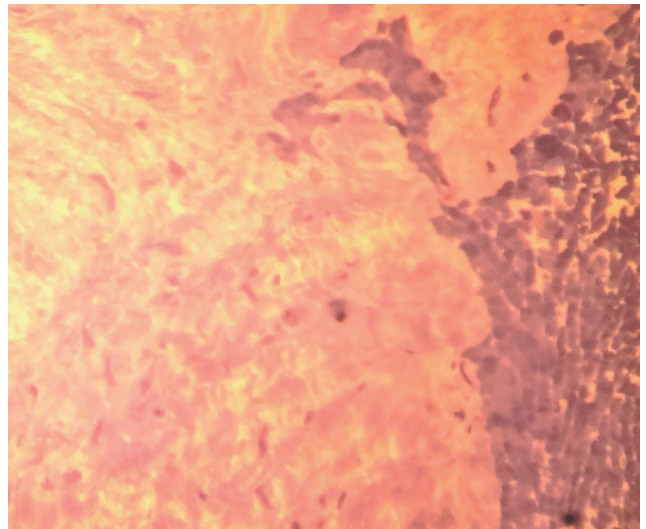


Рис. 4. Криорегенерат с экспозицией 6 секунд, Окраска - толуидиновый синий. Увеличение 50. / Fig. 4. Kryoregenerative with an exposure of 6 seconds. Painting - toluidine blue. Increase 50.

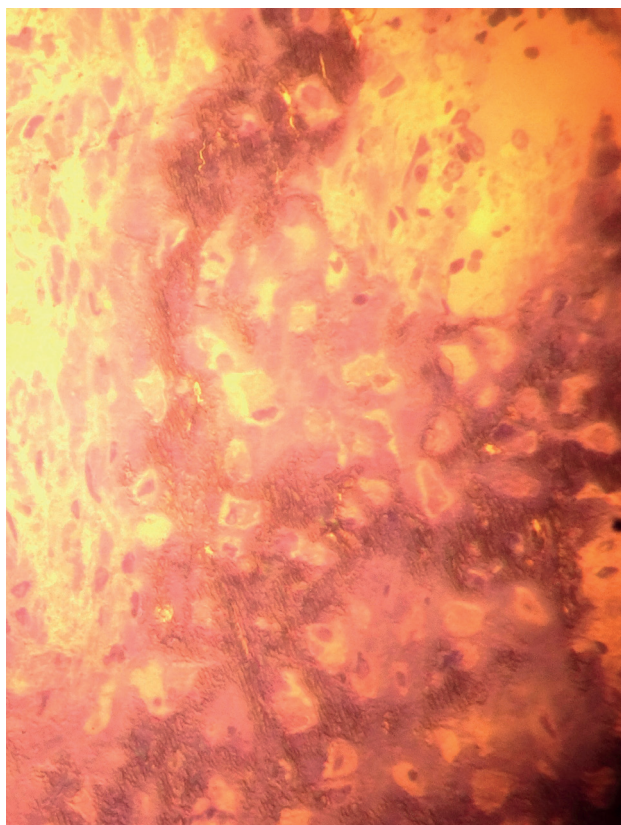


Рис. 5. Криорегенерат с экспозицией 9 секунд. Полутонкий срез. Окраска - толуидиновый синий. Увеличение 50 / Fig. 5. Kryoregenerative with 9 seconds exposure. Semifine slice. Painting - toluidine blue. Increase 50.

обильное развитие соединительной ткани без признаков образования костной мозоли, о чём свидетельствует отсутствие кровеносных сосудов. Гистоморфологическая картина напоминает развитие соединительной ткани после крионекроза в криоостеонекроз (рис. 6).

Результаты и их обсуждение

При подробном анализе гистиоцитарной реакции образцов ткани с различной экспозицией хладагента и контрольными выявлено, что в препаратах из образца ткани, не подвергшейся воздействию (контроль) отмечалась выраженная пролиферация остеобластов. В контрольном образце ткани отмечалась лишь незначительная пролиферация остеобластов и фибробластов без признаков неоангиогенеза. В образце ткани, подвергшейся воздействию на протяжении 3 секунд отмечалась выраженная пролиферация остеобластов, пролиферация фибробластов, васкуляризация с формированием мелких сосудов капиллярного типа (неоангиогенез) и инфильтрация единичными лимфоцитами, что свидетельствует об активном остеогистогенезе. В препарате из образца ткани, подвергшейся воздействию на протяжении 6 секунд определялась умеренная пролиферация остеобластов,

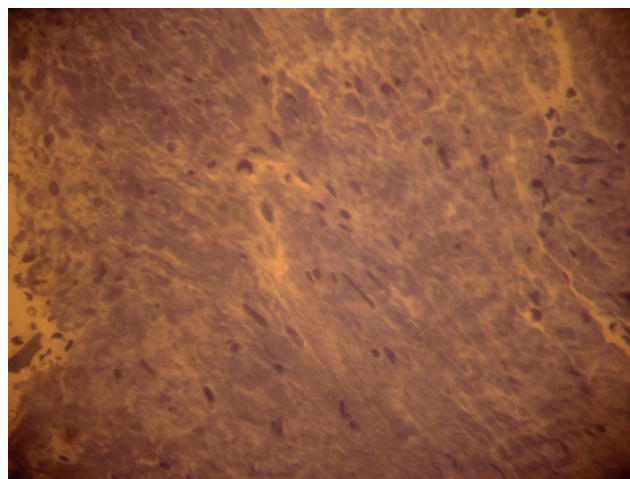


Рис. 6. Криорегенерат с экспозицией 12 секунд. Полутонкий срез. Окраска - толуидиновый синий. Увеличение 50 / Fig. 6. Kryoregenerative with an exposure of 12 seconds. Semifine slice. Painting - toluidine blue. Increase 50.

фибробластов, наличие остеокластов и инфильтрация единичными лимфоцитами, степень остеогистогенеза не столь выражена как при экспозиции в 3 секунды. В препаратах из образцов ткани, подвергшейся воздействию на протяжении 9 секунд определялась умеренно выраженная пролиферация остеобластов с очагами напоминающими криоостеонекроз. В образце ткани, подвергшейся воздействию на протяжении 12 секунд отмечалась умеренная пролиферация фибробластов, умеренная лимфоидная инфильтрация, картина тотального криоостеонекроза. Представленные результаты микроскопии полутонких срезов криорегенератов с различной экспозицией наглядно демонстрируют наиболее активное образование остеобластов, фибробластов, активный рост сосудистой ткани и образование первичной костной мозоли из хрящевой ткани при 3 секундной экспозиции хладагента.

Выводы

1. Результаты гистоморфологических исследований (световая микроскопия) показали, что наиболее оптимальной для оптимизации остеогистогенеза является 3-х секундная экспозиция хладагента.

2. Проведённое экспериментальное исследование доказывает регенеративный эффект субструктивного криовоздействия. Это позволяет применить описанный способ при лечении асептического некроза головки бедренной кости у детей путём туннелизации шейки бедра до очага остеонекроза и субструктивного криовоздействия с целью активизации репаративной регенерации в некротически изменённой головке.

Список литературы

1. Гюнтер В.Э. Биосовместимые материалы с памятью формы и новые технологии в медицине. «НПП МИЦ» 2014; 342.
2. Крестьяшин И.В., Коварский С.Л., Крестьяшин В.М., Шафранов В.В., Тимошенко О.В., Домарев А.О., Подшивалова О.А. Современные стационарзамещающие технологии в работе детского центра амбулаторной хирургии, травматологии-ортопедии. Детская хирургия 2014; 5: 53-56.
3. Кужеливский И.И. Болезнь Пертеса: современное состояние проблемы и пути её решения. Сибирский медицинский журнал 2015; 4: 117-121.

Поступила 26.10.2017

Информация об авторах

1. Слизовский Г. В. – д.м.н., доцент, зав. кафедрой детских хирургических болезней СибГМУ, e-mail: sgv5858@mail.ru.
2. Кужеливский И. И. – к.м.н., доцент кафедры детских хирургических болезней СибГМУ, e-mail: kuzhel@rambler.ru
3. Ситко Л. А. – заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор кафедры детской хирургии Омской государственной медицинской академии, e-mail: sitkola2006@mail.ru

References

1. Giunter V.E. Biosovmestimye materialy s pamiat'iu formy i novye tekhnologii v meditsine [Biocompatible materials with shape memory and new technologies in medicine] "NPP MITS" 2014; 342.
2. Krest'iashin I.V., Kovarskii S.L., Krest'iashin V.M., Shafranov V.V., Timoshchenko O.V., Domarev A.O., Podshivalova O.A. Sovremennye stacionarzameshchayushchie tekhnologii v rabote detskogo tsentra ambulatornoi khirurgii, travmatologii-ortopedii [Stationariness modern technologies in the work of the children's center, outpatient surgery, orthopedics and traumatology] Pediatric surgery 2014; 5: 53-56.
3. Kuzhelivskiy I.I. Bolezn' Pertesa: sovremennoe sostoianie problemy i puti ee resheniia [Perthes disease: the current state of the problem and ways to solve it]. Siberian medical journal 2015; 4: 117-121.

Received 26.10.2017

Information about the Authors

1. Slizovskiy G.V. - MD, professor, head. Department of childhood surgical diseases of Siberian State Medical University, e-mail: sgv5858@mail.ru.
2. Kuzhelivskiy I.I. - PhD, professor of the Department of children's surgical diseases of Siberian State Medical University, e-mail: kuzhel@rambler.ru
3. Sitko L.A. - honored worker of science of RF, MD, professor, Department of pediatric surgery of Omsk State Medical Academy, e-mail: sitkola2006@mail.ru