

© Т.А. Ступина, С.А. Ерофеев, 2007

Гистоморфометрические характеристики изменений суставного хряща при «веерном» удлинении голени в эксперименте

Т.А. Ступина, С.А. Ерофеев

The histomorphometric characteristics of articular cartilage changes for leg experimental «fan-like» lengthening

Т.А. Stoupina, S.A. Yerofeyev

Федеральное государственное учреждение

«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий», г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

Методами световой микроскопии, компьютерной морфо- и стереометрии исследован суставной хрящ наружных мыщелков бедренной кости 11 собак – 8 опытных и 3 интактных (контроль). В опытной серии после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей в течение 28 дней осуществляли удлинение правой голени аппаратом Илизарова с темпом 2,0 мм за 4 приема. В течение первой недели distraction проводили по задней паре стержней шарнирных узлов, следующую неделю – по передней паре, в дальнейшем с аналогичным чередованием. Результаты проведенного исследования показали, что в период distraction в суставном хряще смежных с удлинением сегментом суставов наблюдаются поверхностные повреждения, выражающиеся в деструкции части клеток и матрикса поверхностной зоны. Параллельно в хрящевой ткани развиваются регенераторные изменения, наиболее выраженные в промежуточной и базальной зонах, на этапах фиксации и после снятия аппарата. Основным фактором, обеспечивающим возможность обратимости изменений, является активизация пролиферативных и биосинтетических процессов. К концу эксперимента репаративный процесс в суставном хряще имеет незавершенный характер. Полученные сведения указывают на необходимость учитывать состояние суставного хряща и предупреждать развитие в нем патологических процессов.

Ключевые слова: distraction остеосинтез, суставной хрящ, морфология, морфометрия.

The articular cartilage of femoral lateral condyles has been studied in 11 dogs – 8 experimental and 3 intact (control) using the methods of light microscopy, computer morpho- and stereometry. Lengthening of the right leg in the experimental group after closed flexion osteoclasia of leg bones was performed with the Ilizarov fixator by 2,0 mm for 4 times. In the first week distraction was applied to the back pair of hinge unit half-pins, the next week – to the front pair, and with similar alternation subsequently. The results of the study made have demonstrated the presence of superficial damages, manifested themselves in the destruction of a part of cells and superficial zone matrix, in the articular cartilage of the joints, adjacent to the segment being lengthened in the period of distraction. In parallel, the regenerative changes in cartilage tissue, which are the most marked in the intermediate zone and basal one, appear at the stages of fixation and after the fixator removal. The activation of proliferative and biosynthetic processes is the main factor giving the possibility of reversibility of the changes. By the end of the experiment the reparative process in the articular cartilage is of non-completed character. The data obtained show the necessity to take into consideration the condition of the articular cartilage and to prevent the development of pathologic processes in it.

Keywords: distraction osteosynthesis, articular cartilage, morphology, morphometry.

ВВЕДЕНИЕ

В вопросах удлинения конечностей важное место занимает проблема сохранения функциональных возможностей суставов [8]. При distractionном остеосинтезе сопротивление мышечно-связочного аппарата нарастает, что ведет к увеличению сжатия смежных суставов [2]. Ограничение амплитуды движений в суставах при удлинении конечностей аппаратом Илизарова отмечалось в клинике многими авторами [2, 4, 10, 11]. В последние годы становится актуальной потребность в дополнительных воздействиях на процесс distractionного костеобра-

зования с целью ускорения темпов функциональной реабилитации [9]. В связи с этим в эксперименте был предпринят способ «веерного» удлинения конечностей, при котором осуществлялось чередование сторон приложения distractionных усилий [3]. Предполагалось, что такой способ окажется щадящим, так как даст возможность периодического «отдыха» тканям удлиняемой конечности.

Целью работы явилось изучение морфофункционального состояния суставного хряща при данных условиях удлинении голени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали суставной хрящ мыщелка бедренной кости 3 интактных и 8 опытных собак, которым после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей осуществляли удлинение голени с темпом 2,0 мм за 4 приема. В течение первой недели distraction проводили по задней паре стержней шарнирных узлов, следующую неделю – по передней паре, в дальнейшем с аналогичным чередованием. К концу 28-дневного периода «веерной» distraction диастаз между костными отломками имел высоту 28 мм. Этапы исследования – 14 (n=1) и 28 суток distraction (n=2), 30 суток фиксации (n=2), 30 суток после снятия аппарата (n=3). Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли согласно приказу МЗ СССР №755, 1977 г.

Для световой микроскопии образцы хряща после альдегидно-осмиевой фиксации дегидратировали в спиртах и ацетоне, в качестве уплотняющей среды использовали аралдит. Учитывая зональное строение суставного хряща, кусочки ориентировали так, чтобы плоскость срезов была перпендикулярна суставной поверхности. Полутонкие (0,5-1,0 мкм) срезы получали на ультратоме "Nova" фирмы LKB (Швеция). Применение аралдита в качестве уплотняющей среды и стеклянных или алмазных ножей минимизировало

деформацию объекта при изготовлении срезов, а их толщина позволила пренебречь эффектом Холмса [5]. Препараты, окрашенные метиленовым синим или метиленовым синим - основным фуксином, оцифровывали и морфометрировали на фотомикроскопе фирмы "Opton" (Германия) с помощью аппаратно-программного комплекса "ДиаМорф" (Москва). Измерения проводили в микрометрах после предварительной геометрической калибровки по оцифрованной с тем же увеличением шкале объект-микрометра. Определяли параметры: толщину (h , мкм) хряща, объемную ($V_{V_{хц}}$, мкм³/мкм³) и численную ($NA_{хц}$, мкм²) плотности всех хондроцитов, численную плотность клеток в составе изогенных групп – пролиферирующих хондроцитов ($NA_{пхц}$), величину пула пролиферирующих хондроцитов ($ВППХц = NA_{пхц} / NA_{хц} * 100\%$) [6]. В качестве контроля морфометрировали суставной хрящ интактных животных. Анализ цифрового материала был проведен методами вариационной и непараметрической статистики. Достоверность различий оценивали в программе Microsoft Excel 97 - программное обеспечение AtteStat, версия 1.0 [1]. После тестирования выборок на характер распределения для параметра h хряща применяли критерий Стьюдента, для параметров $V_{V_{хц}}$ и $NA_{хц}$ - критерий Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В период distraction макроскопически суставные поверхности были фиолетового цвета, в части наблюдений по боковым поверхностям мыщелков выявлены эрозии. При исследовании полутонких срезов матрикс поверхностной зоны терял свою гомогенность, выглядел разволокненным, клеточные лакуны в участках разволокнения были лишены содержимого. Часть хондроцитов находилась в состоянии деструкции. В отдельных случаях очаги разволокнения захватывали всю поверхностную зону, наблюдалось формирование узур (рис. 1). В верхней части промежуточной зоны была нарушена гомогенность межтерриториального матрикса. Наблюдалось увеличение количества изогенных групп, что являлось отражением пролиферации клеток. Одиночно расположенные хондроциты промежуточной и базальной зон отличались высокой биосинтетической активностью, о чем свидетельствовали гомогенность межклеточного вещества и интенсивная метакромазия территориального матрикса. Наряду с вышеописанными изменениями, были обнаружены участки хряща, имеющие обычную структуру.

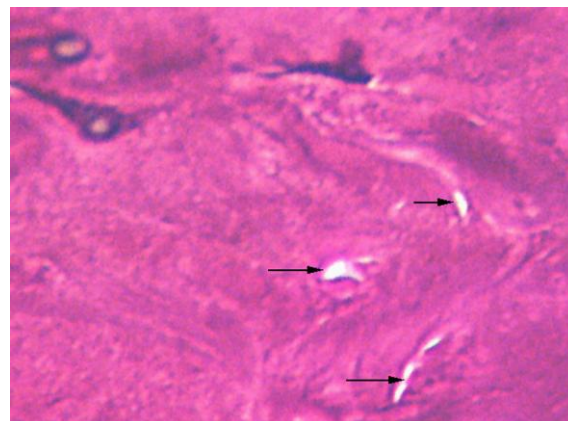
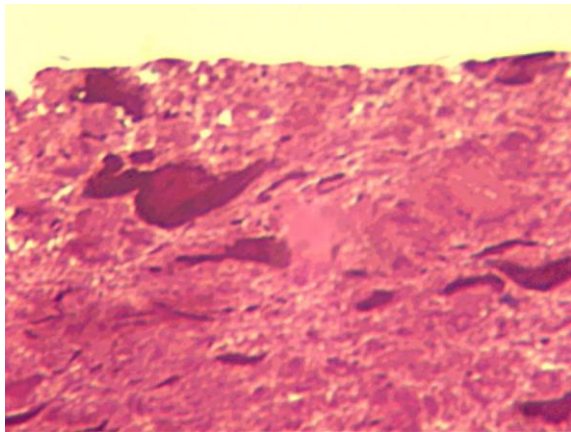


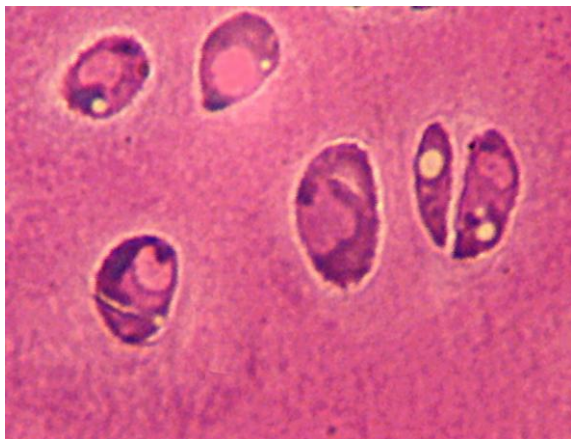
Рис. 1. Суставной хрящ (distraction – 28 суток). В очагах разволокнения поверхностной зоны наблюдается формирование узур (стрелки). Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. – 100; ок. – 12,5×

На этапе фиксации в поверхностной зоне наблюдали сходные с предыдущим сроком картины деструктивных изменений (рис. 2, а). В промежуточной и базальной зонах отмечено повышение пролиферативной и биосинтетической активности хондроцитов. Одиночно расположенные и входящие в состав изогенных групп клетки характеризовались высокой метаболиче-

ской активностью, содержали секреторные включения (рис. 2, б).



а



б

Рис. 2. Хондроциты поверхностной (а) и промежуточной (б) зон суставного хряща (фиксация – 30 суток). Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. – 100; ок. – 12,5×

В срок 30 суток после снятия аппарата репаративный процесс в суставном хряще имел незавершенный характер, сохранялись разволокненные участки матрикса поверхностной зоны (рис. 3). В промежуточной и базальной зонах наблюдалось повышенное количество изогенных групп клеток. Хондроциты характеризовались высокой биосин-

тетической активностью, о чем можно судить по интенсивной метахромазии территориального матрикса. Необходимо отметить, что частота встречаемости и объем участков разволокнения в этом сроке были выражены в меньшей степени, чем на предыдущих этапах эксперимента.

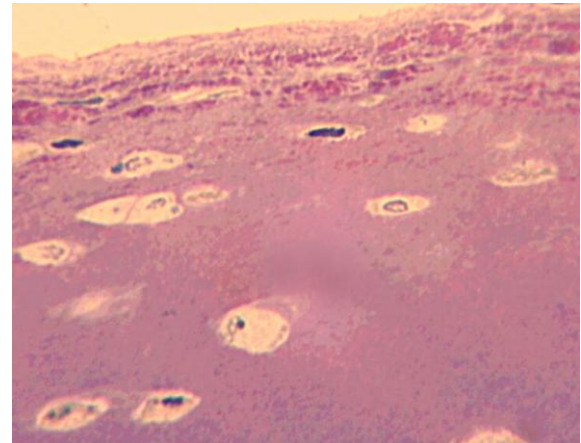


Рис. 3. Суставной хрящ (без аппарата 30 суток). Поверхностная зона, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. – 40; ок. – 12,5×

Анализ количественных данных выявил следующее: к концу дистракции отмечено увеличение ($p < 0,001$) толщины суставного хряща (табл. 1). Это обусловлено дезорганизацией межклеточного вещества поверхностной зоны – его разволокнением и набуханием. Через 30 суток фиксации выявлено уменьшение ($p < 0,001$) анализируемого параметра по сравнению с контролем, что связано с дальнейшей деструкцией матрикса поверхностной зоны. К концу эксперимента толщина хряща увеличена относительно предыдущего срока, но достоверно ($p < 0,001$) ниже контроля.

Величина пула пролиферировавших хондроцитов на всех этапах эксперимента превышала контроль (табл. 1). Максимальные значения исследуемого параметра наблюдались на начальных этапах.

Таблица 1

Количественные характеристики хрящевой ткани наружного мыщелка бедра при «всерном» удлинении голени у собак

Параметры		VV _{хц} (M,%)	NA _{хц} (M±m)	h (мкм, M±m)	ВППХц (%)
Контроль	Поверхностная зона	6,1	8,2±0,99	475±1,3	14,5
	Промежуточная зона	8,75	4,4±0,64		
	Базальная зона	12,26	5,7±0,75		
28 суток дистракции	Поверхностная зона	2,8	5,89±0,5	549,6±2,1	32,29
	Промежуточная зона	6,1	3,99±0,38		
	Базальная зона	5,9	4,21±0,52		
30 суток фиксации	Поверхностная зона	3,32	7,5±0,57	336,5±3,8	29,1
	Промежуточная зона	7,01	6,29±0,46		
	Базальная зона	6,9	6,1±0,55		
30 суток без аппарата	Поверхностная зона	4,8	7,36±0,8	382,3±1,4	27,53
	Промежуточная зона	5,7	5,3±0,59		
	Базальная зона	7,5	4,67±0,47		

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные различия с контролем.

Численная плотность клеток в поверхностной зоне на всех этапах эксперимента достоверно ($p < 0,05$) снижена относительно контрольных значений. На этапах фиксации и после снятия аппарата $NA_{\text{хц}}$ имела тенденцию к увеличению по сравнению со сроком 28 суток distraction (табл. 1). В промежуточной и базальной зонах к концу distraction $NA_{\text{хц}}$ достоверно ($p < 0,05$) снижалась, на этапе фиксации превышала ($p < 0,05$) контрольные значения, что было связано с увеличением количества изогнутых групп клеток. Повышение численной плотности клеток во всех зонах хряща на этапе фиксации относительно предыдущего срока являлось отражением репаративной регенерации. Через месяц после снятия аппарата в промежуточной зоне сохранялись повышенные значения $NA_{\text{хц}}$, в базальной зоне анализируемый параметр достоверно ($p < 0,05$) снижался.

Объемная плотность хондроцитов во всех зонах хряща на всех этапах эксперимента достоверно ($p < 0,05$) снижена, что связано с деструкцией и гибелью части клеток.

Результаты проведенного исследования показали, что в период distraction в суставном хряще смежных с удлиняемым сегментом суставов наблюдаются поверхностные поврежде-

ния, выражающиеся в деструкции части клеток и матрикса поверхностной зоны. Параллельно деструкции в хрящевой ткани развиваются регенераторные изменения, наиболее выраженные в промежуточной и базальной зонах, на этапах фиксации и после снятия аппарата. Основным фактором, обеспечивающим возможность обратимости изменений, является активизация пролиферативных и биосинтетических процессов. В монографии Павловой В.Н. с соавт. (1988) приведены результаты экспериментальных исследований репаративных потенций хряща, согласно которым – «наличие изогнутых групп клеток, функционально активных хондроцитов, а также организованный матрикс промежуточной и базальной зон позволяет хрящу восстанавливать не глубокие частичные повреждения» [7].

Таким образом, при использовании «веерного» способа удлинения конечностей в смежных суставах возникают поверхностные, частичные повреждения хрящевой ткани. К концу эксперимента репаративный процесс в суставном хряще имеет незавершенный характер.

Полученные сведения указывают на необходимость учитывать состояние суставного хряща и предупреждать развитие в нем патологических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдышев, И. П. Анализ и обработка данных : специальный справочник / И. П. Гайдышев. – СПб. : Питер, 2001. – 752 с.
2. Дьячкова, Г. В. Мышечно-фасциальный аппарат голени при удлинении ее по методу Илизарова в эксперименте / Г. В. Дьячкова // Лечение ортопедо-травматологических больных в стационаре и поликлинике методом чрескостного остеосинтеза, разработанным в КНИИЭКОТ : тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. : в 2-х ч. - Курган, 1982. – Ч. 2. – С. 176-179.
3. Заявка № 2003 118783 (019956) МПК⁷ А61 В17/56 Способ «веерного» удлинения конечностей / В.И. Шевцов, С.А. Ерофеев (РФ). – Заявл. 23.06.03; Опубл. 20.12.05.
4. Клинико-физиологические и морфологические характеристики адаптивной перестройки в мягкотканых структурах удлиняемой конечности / В. И. Калякина [и др.] // Значение открытых Г.А. Илизаровым общебиологических закономерностей в регенерации тканей : сб. науч. тр. - Курган, 1988. - Вып. 13. - С. 63-70.
5. Проблема эффекта Холмса в количественной телепатологии / М. М. Щудло [и др.] // Известия Челябинского научного центра. - 2003. - Вып. 1(18). – С. 1-5.
6. Удостоверение №49/1996 на рац. предложение. Способ оценки действия биологически активных веществ (БАВ) на гистологических препаратах суставного хряща / С. Н. Асонова, Г. Н. Филимонова; РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова.
7. Хрящ / В. Н. Павлова [и др.]. - М. : Медицина, 1988. – 320 с.
8. Шевцов, В. И. Оперативное удлинение нижних конечностей / В. И. Шевцов, А. В. Попков. – М. : Медицина, 1998. – 192 с.
9. Шевцов, В. И. Теоретические предпосылки и практические последствия увеличения длины нижних конечностей у больных с ахондроплазией / В. И. Шевцов, Т. И. Меньщикова, В. А. Щуров // Российский журнал биомеханики. – 2000. – Т. 4, № 3. – С. 74-79.
10. Knee range of motion in isolated femoral lengthening / J. E. Herzenberg [et al.] // Clin. Orthop. – 1994. – No 301. - P. 49-54.
11. Maffulli, N. Changes in knee motion following femoral and tibial lengthening using the Ilizarov apparatus : a cohort study / N. Maffulli, U. Nele, L. Matarazzo // J. Orthop. Sci. – 2001. - Vol. 6, No 4. - P. 333-338.

Рукопись поступила 15.09.04.