

Гистоморфометрическое исследование суставного хряща при удлинении голени в сочетании с интрамедуллярным армированием противоизогнутыми спицами

Т.А. Ступина, к.б.н., Российский НЦ «Восстановительная травматология и ортопедия», г. Курган

Длительное ограничение движения, возникающее при дистракционном остеосинтезе, создаёт проблему сохранения суставного хряща и функции суставов [1, 2, 8–10]. В последние годы становится актуальной потребность в дополнительных воздействиях на процесс дистракционного костеобразования с целью сокращения сроков лечения. В связи с этим разрабатываются различные способы стимуляции остеогенеза. Экспериментально-морфологическими исследованиями доказано, что удлинение в сочетании с интрамедуллярным напряжённым армированием спицами сопровождается усилением эндостального и периостального остеогенеза, что позволяет реально увеличить темп дистракции и сократить сроки остеосинтеза [3]. При этом помимо сокращения сроков лечения одним из важных аспектов является функциональное состояние удлиняемой конечности [1]. В связи с этим для выяснения морфофункционального состояния суставного хряща на этапах удлинения голени в сочетании с интрамедуллярным напряжённым армированием спицами предпринято настоящее исследование.

Материал и методы. Суставной хрящ мышелков бедренной кости исследован на девяти опытных собаках, которым после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей в течение 28 дней осуществляли дистракцию правой голени аппаратом Илизарова с суточным темпом 1 мм за четыре приёма в сочетании с интрамедуллярным армированием противоизогнутыми спицами (экспериментатор — д.м.н. С.А. Ерофеев). Этапы исследования: 15, 30 суток фиксации, 30 суток после снятия аппарата. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли согласно приказу МЗ СССР № 755, 1977 г.

Для гистоморфометрического анализа применяли серийные перпендикулярные суставной поверхности эпоксидные полутонкие срезы большой площади (4–8 мм²), окрашенные метиленовым синим и/или метиленовым синим-основным фуксином. На фотомикроскопе Opton (Германия) с АПК DiaMorph (Москва) изображения препаратов оцифровывали и анализировали в программе «ВидеоТест-Мастер-Морфология».

Измерения проводили в микрометрах после предварительной геометрической калибровки

по оцифрованной с тем же увеличением шкале объект-микрометра. Определяли толщину суставного хряща (h , мкм), объёмную плотность хондроцитов ($VV_{хц}$, %) в ткани, численную плотность хондроцитов ($NA_{хц}$) и долю (%) изогенных групп ($NA_{из. гр}$) в общем объёме выборки. Рассчитывали средний объём межклеточного вещества ($VV_{мкв}$, мкм³/мкм³) на одну клетку. В качестве контроля морфометрировали суставной хрящ пяти интактных животных. Для анализа цифрового материала использовали описательную статистику. В зависимости от характера распределения, достоверность различий оценивали с помощью критериев Стьюдента или Вилкоксона в программе AtteStat, версия 1.0 [4] в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Рельеф суставной поверхности изучали в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) JSM-840 (Jeol, Япония): материал дегидратировали в спиртах, пропитывали в камфене (3,3-диметил-2-метиленинбициклопентан — ГОСТ 15039-76), высушивали на воздухе, напыляли серебром [4, 5].

Результаты и их обсуждение. Через две недели фиксации при изучении в СЭМ выявлены неровности суставной поверхности, на отдельных участках отсутствовала бесклеточная пластинка, обнаружены вскрытые клеточные лакуны (рис. 1А). При светооптическом исследовании полутонких срезов в поверхностной зоне нарушена гомогенность межклеточного вещества, в очагах разволокнения хондроциты в состоянии деструкции, отмечены пустые клеточные лакуны (рис. 1Б).

Часть хондроцитов поверхностной зоны отличалась большими размерами, интенсивно базофильной цитоплазмой с секреторными гранулами. Отмечено увеличение количества двухчленных изогенных групп. В промежуточной зоне также наблюдалось большое количество изогенных групп клеток. Хондроциты характеризовались высокой метаболической активностью, содержали секреторные гранулы. Межклеточное вещество имело гомогенный вид. В глубокой зоне наблюдалось уменьшение числа клеток в колонках, отмечена интенсивная метахромазия территориального матрикса. Целостность базофильной линии не нарушена. При количественном исследовании выявлено уменьшение толщины хряща на 7% по сравнению с контролем. В поверхностной и промежуточной зонах

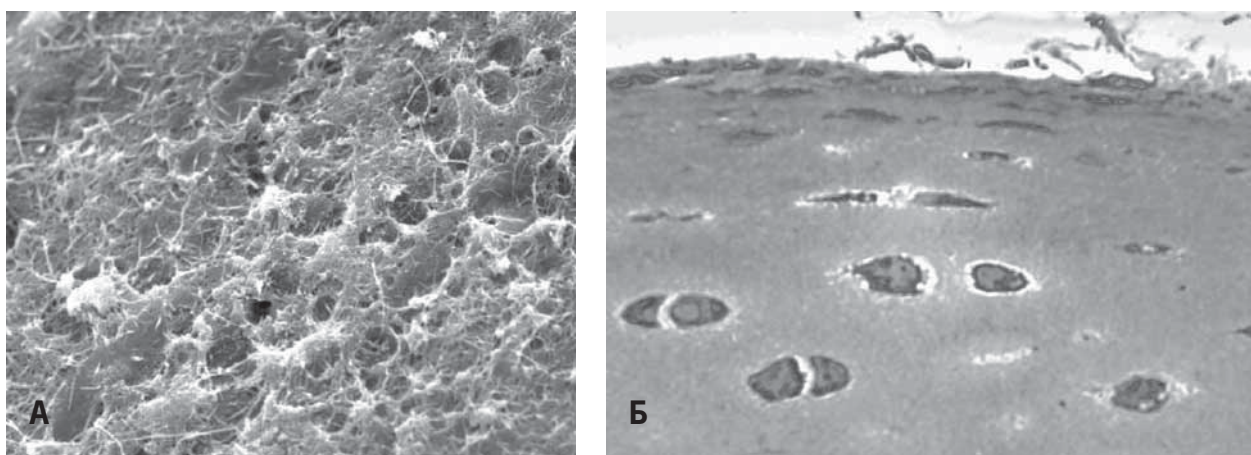


Рис. 1 – Суставной хрящ (15 суток фиксации):

А – суставная поверхность. СЭМ. Увеличение 1000;

Б – поверхностная зона хряща, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином, об. – 40; ок. – 12,5х

Количественные характеристики хрящевой ткани наружного мыщелка бедра при удлинении голени с использованием интрамедуллярного напряжённого армирования ($X \pm Sx$)

Параметры	Зона	$VV_{хц}$, %	$NA_{хц}$, мкм^{-2}	h хряща, мкм	$NA_{из.гр}$, %	$VV_{мкв}$ на 1 клетку
Контроль	1	$6,1 \pm 0,64$	$8,2 \pm 0,99$	$475,5 \pm 1,3$	14,5	$1175,12 \pm 63,86$
	2	$8,7 \pm 1,9$	$4,4 \pm 0,64$			
	3	$12,2 \pm 2,2$	$5,7 \pm 0,75$			
15 суток фиксации	1	$11,8 \pm 0,64$	$10,6 \pm 0,7$	$446,3 \pm 2,5$	26,9	$1178,03 \pm 96,92$
	2	$10,46 \pm 0,91$	$5,7 \pm 0,3$			
	3	$6,9 \pm 0,93$	$5,4 \pm 0,5$			
30 суток фиксации	1	$5,5 \pm 0,49$	$11,7 \pm 1,1$	$343,7 \pm 3,8$	25,5	$942,71 \pm 86,47$
	2	$7,21 \pm 0,72$	$6,3 \pm 0,5$			
	3	$7,6 \pm 0,89$	$5,5 \pm 0,65$			
30 суток без аппарата	1	$6,1 \pm 0,62$	$15,8 \pm 1,3$	$342,4 \pm 2,8$	18,9	$898,29 \pm 93,13$
	2	$6,6 \pm 0,59$	$7,5 \pm 1,14$			
	3	$7,04 \pm 0,56$	$6,4 \pm 0,8$			

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные различия с контролем.

Для параметров $VV_{мкв}$, $NA_{хц}$ использовали критерий Вилкоксона (при $p < 0,05$), для h хряща – критерий Стьюдента (при $p < 0,001$). 1 – поверхностная; 2 – промежуточная; 3 – глубокая зоны

обнаружено достоверное ($p < 0,05$) увеличение объёмной и численной плотности хондроцитов. В глубокой зоне достоверно установлено снижение объёмной плотности хондроцитов (табл.). Численная плотность изогенных групп была на 12,4% выше контрольных значений, средний объём межклеточного вещества на одну клетку сопоставим с нормой.

Через 30 суток фиксации деструктивные изменения суставного хряща были более выражены. Межклеточное вещество поверхностной зоны разволокнено, снижена интенсивность его окраски. Обнаружены изменения citoархитектоники промежуточной зоны: преобладали трёх-, четырёх-, пятичленные изогенные группы клеток. Значительно уменьшилась толщина хряща (табл.). Численная плотность изогенных групп была на 11% выше контрольных значений. В поверхностной и промежуточной зонах продолжалось увеличение ($p < 0,05$) $NA_{хц}$. Однако вновь образованные клетки, входящие в состав изогенных групп, а также большая часть одиночно расположенных хондроцитов находились

в состоянии деструкции. Выявлено снижение ($p < 0,05$) $VV_{хц}$ во всех зонах хряща. Средний объём межклеточного вещества в расчёте на одну клетку достоверно ($p < 0,05$) снижался (табл.), что свидетельствовало об уменьшении биосинтетической активности хондроцитов. Известно, что пролиферативные и биосинтетические процессы являются конкурентными на уровне отдельной клетки [5].

Через месяц после снятия аппарата при исследовании в СЭМ на суставной поверхности выявлены вскрытые лакуны хондроцитов, часть из них без клеток, наблюдалось формирование узур (рис. 2А). Прогрессировало падение синтетической активности хондроцитов. Резко снизилась интенсивность окраски межклеточного вещества поверхностной и промежуточной зон, что косвенно указывало на минимальное содержание гликозаминогликанов, обеспечивающих плотность упаковки межклеточного вещества [6]. Отмечены обширные участки разволокнения, выявлялся коллагеновый каркас, большая часть хондроцитов находилась в состоянии деструкции (рис. 2Б).

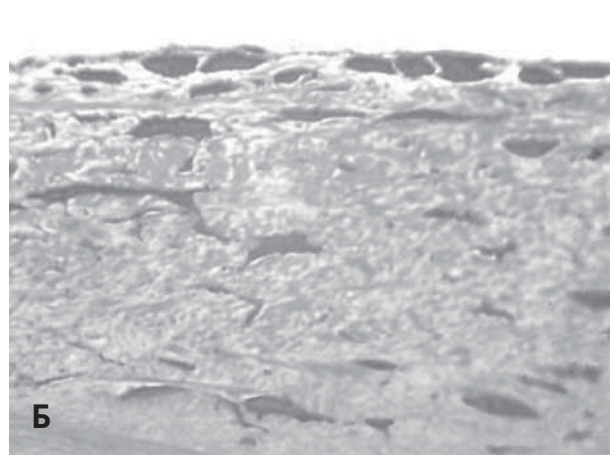
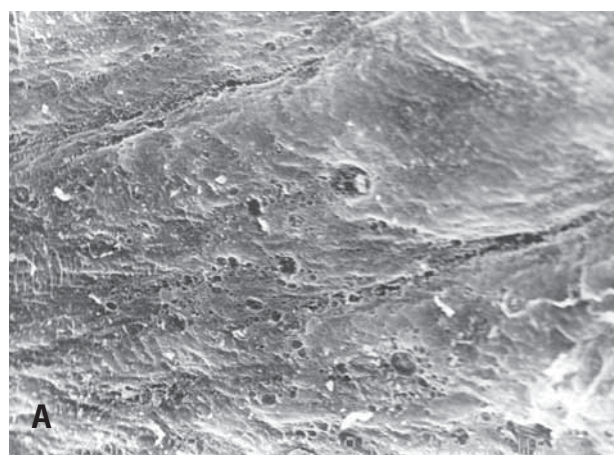


Рис. 2 – Суставной хрящ (без аппарата 30 суток):

А – суставная поверхность. СЭМ. Увеличение 850;

Б – поверхностная зона, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином, об. – 40; ок. – 12,5х

Уменьшилось количество многоклеточных лакун. Целостность базофильной линии в части наблюдений нарушена, наблюдалось проникновение сосудов в хрящ. Морфометрически выявлено снижение $NA_{из.гр}$ относительно предыдущих этапов эксперимента, по сравнению с контролем сохранялись повышенные значения. Толщина хряща была достоверно ($p < 0,001$) ниже контроля. Объёмная плотность клеток в поверхностной зоне сопоставима с контролем, в промежуточной и глубокой зонах достоверно ($p < 0,05$) снижена. Сохранялись повышенные значения численной плотности клеток (табл.). Средний объём межклеточного вещества в расчёте на одну клетку достоверно ($p < 0,05$) снижен относительно контроля и предыдущих сроков эксперимента.

Выводы. Таким образом, при удлинении голени аппаратом Илизарова в сочетании с интрамедуллярным напряжённым армированием спицами через 15 суток фиксации в смежных с удлиняемым сегментом суставах выявлены деструктивные изменения хрящевой ткани, одновременно обнаружено усиление пролиферативной и биосинтетической активности части хондроцитов. Наибольшая частота встречаемости изогенных групп клеток наблюдалась в промежуточной зоне и в неповреждённых участках более глубоких слоёв поверхностной зоны.

Полученные нами результаты (о функциональной значимости хондроцитов поверхностной зоны как резерва клеточной пролиферации) согласуются с литературными данными [6, 7]. Наблюдаемые изменения свидетельствовали о достаточно высокой степени выраженности компенсаторных реакций хрящевой ткани и могут быть расценены как реактивные изменения адаптационного генеза. Через месяц фиксации интенсивная пролиферация сочеталась с уменьшением числа секреторно-активных клеток,

наблюдалось угнетение синтеза компонентов матрикса хряща. Закономерным выглядело снижение толщины хряща.

Отмеченные изменения, по нашему мнению, свидетельствуют о срыве компенсаторных возможностей хряща. В результате к концу эксперимента деструктивные изменения хрящевой ткани прогрессировали. Полученные сведения о динамике деструктивно-репаративных изменений суставного хряща необходимо учитывать при проведении дистракционного остеосинтеза в сочетании с дополнительными способами стимуляции остеогенеза.

Литература

1. Шевцов В.И., Попков А.В. Оперативное удлинение нижних конечностей. М.: Медицина, 1998. 192 с.
2. Щудло М.М., Ступина Т.А., Ерофеев С.А. Экспериментально-гистологическое исследование суставного хряща наружного мыщелка бедра при удлинении голени собак // Морфология. 2005. № 5. С. 67–71.
3. Попков Д.А., Ерофеев С.А., Чиркова А.М. Костеобразование при удлинении голени с использованием интрамедуллярного напряжённого армирования (экспериментальное исследование) // Морфофункциональные аспекты регенерации и адаптационной дифференцировки структурных компонентов опорно-двигательного аппарата в условиях механических воздействий: матер. междунар. науч.-практич. конф. Курган, 2004. С. 226–227.
4. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. СПб.: Питер, 2001. 752 с.
5. Данилов Р.К., Гололобов В.Г., Одинцова И.А. и др. Гистологические основы регенерации тканей опорно-двигательного аппарата // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. № 2. С. 102.
6. Павлова В.Н., Копьева Т.Н., Слуцкий Л.И. и др. Хрящ. М.: Медицина, 1988. 320 с.
7. Модяев В.П. Некоторые особенности репродукции хондроцитов в суставном хряще // Физиология и патология соединительной ткани. Новосибирск, 1980. Т. 1. С. 149–150.
8. Nakamura E., Mizuta H., Takagi K. Knee cartilage injury after tibial lengthening. Radiographic and histological studies in rabbits after 3–6 months // Acta Orthop Scand. 1995. Aug;66(4). P. 313–316.
9. Stanitski D.F. The effect of limb lengthening on articular cartilage. An experimental study // Clin Orthop Relat Res. 1994. Apr; (301). P. 68–72.
10. The effect of tibial lengthening using the Ilizarov method on the cartilage and the menisci of the knee joint / Fink B., Schwinger G., Singer J., Sager M., Wilke C., Braunstein S. // J Orthop Res. 2001 Jul; 19(4). P. 665–670.