

Патоморфологическая и морфометрическая характеристика суставного хряща при удлинении голени в разное время суток

Т.А. Ступина, С.А. Ерофеев

The pathomorphological and morphometric characteristic of articular cartilage during leg lengthening in different periods of the day

T.A. Stoupina, S.A. Yerofeyev

Государственное учреждение науки

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

Выполнено две серии опытов: в 1 серии производили удлинение голени в течение 28 дней с суточным темпом 1 мм за 60 приемов (автодистракция) в дневное время (с 8 до 20 часов), во 2 серии - в ночное время (с 20 до 8 часов). Проведено морфологическое и морфометрическое исследования суставного хряща. Установлено, что в суставном хряще собак обеих серий происходили аналогичные изменения: уменьшение высоты хряща в конце дистракции и через 30 дней фиксации, увеличение пролиферативной активности клеток. В конце дистракции в 1 серии и после 30 дней фиксации в 1 и 2 сериях отмечено разволокнение матрикса поверхностной зоны хряща. Необходимо отметить, что во 2 серии частота встречаемости и объем участков разволокнения были меньше, чем в 1 серии. Через месяц после снятия аппарата наблюдали восстановление структуры хряща в обеих сериях эксперимента. Высота хряща приближалась к контролю. Таким образом, проведенные патоморфологические исследования и анализ морфометрических данных позволили выявить общие закономерности функционального состояния суставного хряща при растяжении голени в разное время суток и показали, что применение автодистракции в ночное время для суставного хряща было более щадящим.

Ключевые слова: эксперимент, удлинение голени, суставной хрящ, морфометрия.

Two experimental series were made: in the 1-st series leg lengthening was performed during 28 days by the day rate of 1 mm for 60 times (autodistraktion) in the day-time (8 – 20), in the 2-nd series - in the night-time (20 – 8). Articular cartilage was studied morphologically and morphometrically. It was revealed that similar changes occurred in the articular cartilage of the dogs in both series: cartilage height decrease at the end of distraction and after 30 days of fixation, increase of cellular proliferative activity. At the end of distraction in 1-st series and after 30 days of fixation in 1-st and 2-nd series fibrillation of the superficial cartilage matrix was observed. It should be noted that the fibrillation incidence and zone area were less in 2-nd series in comparison with 1-st one. Restoration of the cartilage structure was observed in the both experimental series 1 month after the fixator removal. The cartilage height approximated to the control. Thus, the pathomorphological studies made and the analysis of morphometric data performed allowed to reveal general regularities of the articular cartilage functional status during leg lengthening in different periods of the day and showed that autodistraktion used in the night-time was found to be more sparing for the articular cartilage.

Keywords: experiment, leg lengthening, articular cartilage, morphometry.

ВВЕДЕНИЕ

По литературным данным известно, что регулирующая роль механических факторов особенно существенна в отношении суставных хрящей, для которых механическая функция является главной [10, 15]. Ограничение движений в суставе, если оно длительно (как это бывает при лечении переломов костей), влечет за собой развитие деструктивных процессов в суставном хряще, требующих определенного периода анатомо-функционального восстановле-

ния. Проведенные в РНЦ «ВТО» исследования показали, что любое оперативное вмешательство и возникающее при удлинении конечности дополнительное давление в суставах приводят к изменениям морфологической структуры хряща [4, 5, 6, 14]. По данным хронобиологических исследований [7, 8], регуляция клеточных делений в нормальных тканях проявляется строгой упорядоченностью во времени в виде суточного ритма, на протяжении 24-часового периода про-

исходят закономерные подъемы и спады числа митотически делящихся клеток. Учитывая данные положения и отсутствие исследований суставного хряща при дистракционном остеосинтезе с учетом суточных биоритмов, нами проведе-

но исследование, целью которого явилось изучение патоморфологических изменений, в том числе количественных параметров, суставного хряща при удлинении голени в разное время суток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали суставной хрящ наружных мышечков бедренной кости (рис. 1) 22 взрослых беспородных собак – 3 интактных (контроль) и 19 опытных. Последним через 5 дней после закрытой флекссионной остеоклазии проводили удлинение голени автострактором в течение 28 дней с суточным темпом 1 мм за 60 приемов в дневное (с 8 до 20 часов) время – 1 серия (9 животных) и в ночное (с 20 до 8 часов) время – 2 серия (10 животных). Собак выводили из опыта через 28 дней дистракции, 30 дней фиксации, месяц после снятия аппарата. Образцы хряща обрабатывали по стандартной методике [10]: фиксировали в смеси 2% параформальдегида, 2% глутаральдегида и 0,1% пикриновой кислоты на фосфатном буфере при pH 7,4; постфиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, заключали в аралдит. При этом кусочки ориентировали так, чтобы плоскость среза была перпендикулярна суставной поверхности. Полутонкие срезы готовили на ультратоме "Nova" фирмы "LKB" (Швеция), окрашивали метиленовым синим и метиленовым синим–основным фуксином [11], исследовали на фотомикроскопе фирмы "Opton" (Германия). Изображения микропрепаратов оцифровывали и морфометрировали на компьютерном аппаратно-программном комплексе "ДиаМорф" (Москва) в программах "Cito" и "Medias" версии 1996 года. Измерения проводили в микрометрах после предварительной геометрической калибровки по объект-микрометру. Определяли высоту суставного хряща, площади межклеточного вещества и следов хондроцитов, численную плотность клеток, рассчитывали объемную плотность хондроцитов, "суммарную численную плотность проли-

ферирующих хондроцитов" [2]. Для оценки объемных отношений структур исходили из принципа А. Delesse (1847): доля площади среза, содержащая изучаемый компонент, равна его доле в объеме трехмерного объекта [1, 9, 12]. В качестве условного контроля морфометрировали суставной хрящ интактных животных. Анализ цифрового материала был проведен методами непараметрической статистики. Достоверность различий оценивали в программе "Microsoft Excel" по W-критерию Вилкоксона для независимых выборок (статистические тесты запрограммированы И.П. Гайдышевым [3] и помещены в динамически подключаемую библиотеку).

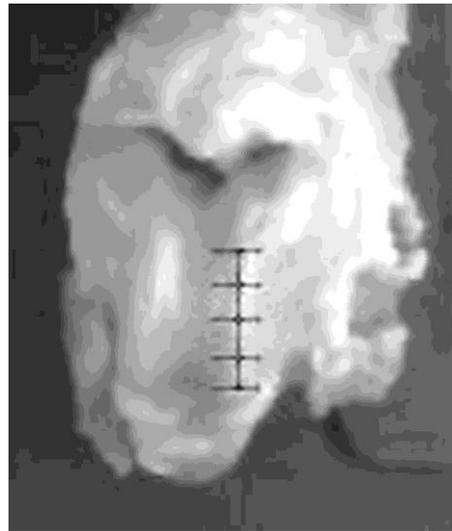


Рис. 1. Схема вырезки суставного хряща наружного мышечка бедра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При клинических наблюдениях за животными обеих серий эксперимента не выявлено существенных различий в функциональном состоянии удлиняемой конечности. На оперированную конечность животные начинали наступать при ходьбе через 14 дней дистракции. К концу дистракции большинство животных пользовались удлинённой конечностью, приступая на нее в стойке или при ходьбе. При этом не было отмечено значительных ограничений движений в суставах: в коленном определялась

умеренная сгибательная контрактура, амплитуда движений составляла 80-90° (норма 100-110°), в голеностопном – в пределах 30-50° (норма 90°), положение стопы, как правило, было близко к физиологическому. В период фиксации все собаки практически полностью нагружали оперированную конечность, амплитуда движений в коленном суставе приближалась к норме и составляла 90-100°, в голеностопном суставе сохранялось ограничение амплитуды движений – 50-60°. После снятия аппарата

функция коленного сустава не отличалась от исходных значений – животные в полном объеме пользовались оперированной конечностью.

Проведенные морфологические и морфометрические исследования показали, что в конце distraction у животных 1 серии хрящ был истончен в среднем на 28% по сравнению с контролем (рис. 2). Отмечены изменения в структуре поверхностной зоны хряща, которые выражались снижением интенсивности окраски межклеточного вещества, нарушением его гомогенности, появлением участков разволокнения. Обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) уменьшение численной плотности хондроцитов по сравнению с контролем. Выявлены пустые лакуны. Объемная плотность хондроцитов в 1,7 раза была ниже, чем в контроле (табл. 1). В средней зоне хряща отмечено повышение пролиферативной активности клеток, в результате чего увеличилось количество двух-, четырехчленных изогенных групп. Пул пролиферирующих хондроцитов во всех зонах хряща составлял в среднем 56% (рис. 4). Отчетливо была выражена базофилия межклеточного вещества базальной зоны хряща, что косвенно свидетельствовало о его кальцификации. Базофильная линия не нарушена.

У животных 2 серии сохранялась зональная структура хряща, по сравнению с контролем не отмечено существенных изменений в толщине зон. Межклеточное вещество поверхностной зоны было гомогенным, умеренно базофильным. Численная плотность хондроцитов ниже контроля ($p < 0,05$). Объемная плотность хондроцитов была в 1,2 раза выше, чем в 1 серии, но в 1,3 раза ниже контроля (табл. 1). В средней зоне наблюдалась активная пролиферация клеток, на что косвенно указывало большое количество изогенных групп. Пул пролиферирующих хонд-

роцитов во всех зонах хряща составлял в среднем 48% (рис. 4). Увеличена интенсивность окраски территориального матрикса, что косвенно указывало на повышение секреторной активности клеток. Базальная зона сохраняла обычное строение с колончатым расположением хондроцитов.

Через 30 дней фиксации в 1 серии отмечено уменьшение высоты хряща на 18% и его поверхностной зоны на 15% по сравнению с контролем (рис. 2). Нарушена гомогенность межклеточного вещества, определялись очаги разволокнения, распространяющиеся в отдельных участках на среднюю зону (рис. 3А). Снижение интенсивности окраски межклеточного вещества свидетельствовало о низком содержании гликозаминогликанов в поверхностной зоне. В участках разволокнения наблюдалось уменьшение объемной и численной плотности хондроцитов. Полученные результаты согласуются с литературными данными [10]. В средней зоне морфометрически обнаружена тенденция к повышению объемной плотности хондроцитов (табл. 1). Величина пула пролиферирующих хондроцитов была в 1,6 выше, чем в контрольной группе (рис. 4). В базальной зоне существенных изменений не выявлено.

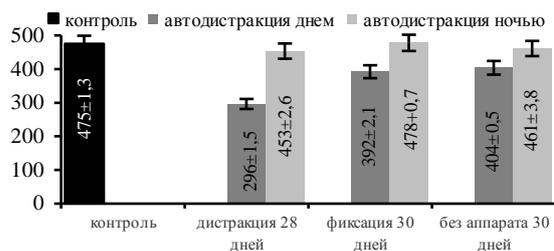


Рис. 2. Высота суставного хряща бедренной кости (мкм).

Таблица 1. Численная (N_A) и объемная (V_V) плотности хондроцитов в суставной выстилке бедренной кости при автодистракции в дневное и ночное время

Срок эксперимента	Зоны суставного хряща	Объем выборки (n)	Параметры	
			$N_{A_{\text{ХИ}}}$	$V_{V_{\text{ХИ}}}$ в %
Контроль	Поверхностная	15	8,2±0,29	6,1
	Средняя	15	4,4±0,34	8,75
	Базальная	15	5,7±0,45	12,26
Дистракция 28 дней	Поверхностная	15	5,1±0,3 (7,4±0,4)*	3,63 (4,6)
	Средняя	15	3±0,24 (5,4±0,45)*	5,6 (9,2)*
	Базальная	15	3,33±0,3 (6±0,36)*	5,97 (9,9)*
Фиксация 30 дней	Поверхностная	15	7,66±0,3 (5,18±0,5)*	5,71 (8,19)
	Средняя	15	4,75±0,4 (5,36±0,45)	9,28 (9,67)
	Базальная	15	5,25±0,4 (5,6±0,32)	9,71 (10,5)
Без аппарата 30 дней	Поверхностная	15	6,6±0,3 (7,62±0,36)	6,16 (5,73)
	Средняя	15	4,42±0,2 (4,5±0,48)	8,9 (7,95)
	Базальная	15	4,77±0,3 (5,6±0,33)	10,1 (9,36)

Примечание: 1) в скобках указаны N_A и V_V хондроцитов в суставной выстилке бедренной кости при автодистракции в ночное время; 2) жирным шрифтом выделены достоверные различия с контролем ($p < 0,05$); 3) * - достоверные различия между сериями ($p < 0,05$).

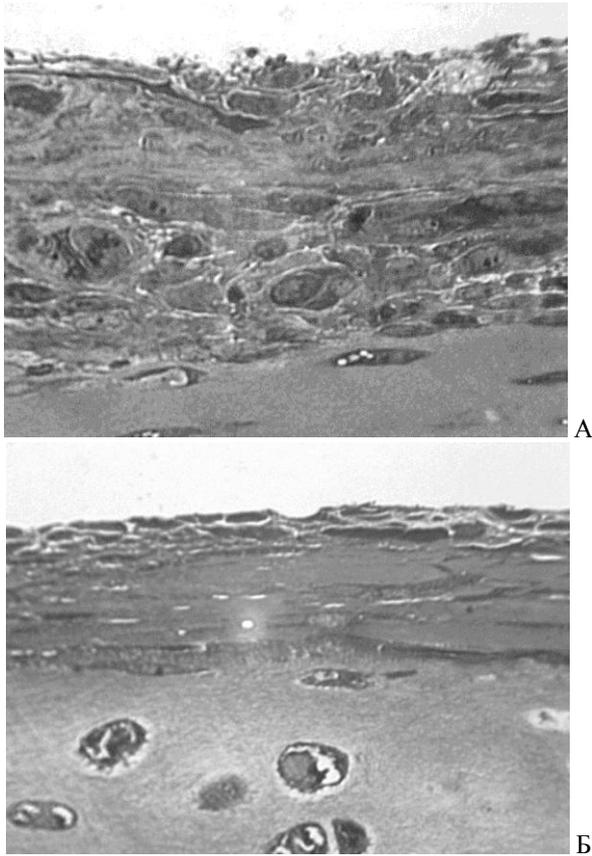


Рис. 3. Разволокнение поверхностной зоны суставного хряща через 30 дней фиксации, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Микрофото. Об. 40, ок. 12,5х. А - 1 серия опытов; Б - 2 серия опытов.

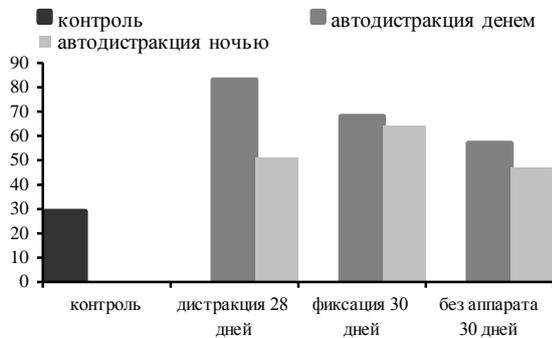


Рис. 4. Величина пула пролиферирующих хондроцитов в суставном хряще бедренной кости (%).

Во 2 серии в части наблюдений определялись очаги расщепления межклеточного вещества поверхностной зоны (рис. 3Б), зональная структура хряща не нарушена. Межклеточное вещество поверхностной зоны было гомогенным. Высота хряща незначительно отличалась от контроля (различия не достоверны, $p > 0,05$). Морфометрически обнаружено увеличение объемной плотности хондроцитов во всех зонах хряща. Отмечено повышение численной плотности клеток в средней зоне в 1,2 раза по сравнению с контролем (табл. 1). Пул пролиферирующих хондроцитов во всех зонах хряща составлял в среднем 64%. (рис. 4).

Через месяц после снятия аппарата в 1 и 2 сериях высота хряща была увеличена на 27% и 6% соответственно по сравнению со сроком 28 дней дистракции (рис. 2). Морфологически хрящ в обеих сериях имел обычное строение. Межклеточное вещество поверхностной зоны было гомогенным и базофильным. В средней зоне преобладали двух- и четырехчленные изогенные группы клеток. Пул пролиферирующих хондроцитов во всех зонах хряща составлял в среднем 54% в 1 серии и 47% во 2 серии (рис. 4). Морфометрический анализ показал, что в обеих сериях объемная плотность хондроцитов по зонам существенно не отличалась от контроля ($p > 0,05$). Базофильная линия была отчетливо выражена, непрерывна.

Проведенные исследования показали, что в период удлинения голени в разное время суток в суставном хряще собак обеих серий происходили аналогичные изменения: уменьшение высоты хряща в конце дистракции и через 30 дней фиксации и увеличение пролиферативной активности клеток, которое было более выражено у животных 1 серии эксперимента. Это может быть обусловлено проведением дистракции в дневное время, когда происходит подъем [7, 8] числа митотически делящихся клеток, и действием механических факторов – сжатием, трением суставных поверхностей при удлинении голени и функциональной активности животных днем (активная пролиферация клеток является компенсаторной реакцией [10] на травматизацию). В конце дистракции в 1 серии и после 30 дней фиксации в 1 и 2 сериях отмечено разволокнение матрикса поверхностной зоны хряща. Необходимо отметить, что во 2 серии частота встречаемости и объем участков разволокнения были меньше, чем в 1 серии. Известно, что пролиферативные и биосинтетические процессы являются конкурентными на уровне отдельной клетки [12]. Можно предположить, что во 2 серии при меньшей пролиферативной активности и увеличении относительного объема хондроцитов по сравнению с 1 серией, происходит их цитодифференцировка и возрастание биосинтетической активности, что приводит к приросту высоты суставного хряща (рис. 2). Через месяц после снятия аппарата в обеих сериях эксперимента наблюдали восстановление структуры хряща, высота хряща приближалась к контролю.

Таким образом, проведенные патоморфологические исследования и анализ морфометрических данных позволили выявить общие закономерности функционального состояния суставного хряща при растяжении голени в разное время суток и показали, что применение автодистракции в ночное время для суставного хряща было более щадящим.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. и др. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблунчанский, В.Г. Губенко. - М.: Медицина, 1981. - 189 с.
2. Способ количественной морфологической оценки действия БАВ на суставной хрящ / С.Н. Асонова, К.С. Десятниченко, Г.Н. Филимонова и др. // Современные проблемы медицины и биологии: Материалы 29 обл. науч.-практ. конф. - Курган, 1997. - С. 200-201.
3. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. - СПб.: Питер, 2001. - 752 с.
4. Комплексное исследование хрящевой ткани при иммобилизации сустава / Л.И. Грачева, С.Н. Асонова, А.А. Утенькин, С.Я. Звенко // Материалы школы "Биология опорно-двигательного аппарата". - Харьков, 1992. - С.55-56.
5. Грачева Л.И., Попков А.В., Ерофеев С.А. Биохимический тест на изменение суставного хряща при удлинении конечности // Ортопед., травматол. - 1994. - №4. - С. 111-
6. Дегенеративно-дистрофические изменения суставного хряща и способ их фармакологической коррекции / К.С. Десятниченко, С.Н. Лунова, А.А. Ларионов, С.Н. Асонова // Гений ортопедии. - 1998. - № 1. - С. 28 - 32.
7. Ефимов М.Л. и др. Суточная хронобиология и хронотерапия опухолей / М.Л. Ефимов, Г.С. Васильева, В.Р. Коваленко, Н.Т. Имангалиева. - Алма-Ата: Казахстан, 1985. - 128 с.
8. Хронобиология и хрономедицина: Учебник / Под ред. Ф.И. Комарова. - М.: Медицина, 1989. - 400 с.
9. Непомнящих Л.М. и др. Морфометрия и стереология гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушников, Г.И. Непомнящих. - М.: Наука, 1986. - 159 с.
10. Павлова В.Н. и др. Хрящ / В.Н. Павлова, Т.Н. Копьева, Л.И. Слуцкий, Г.Г. Павлов. - М.: Медицина, 1988. - 320 с.
11. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. - М.: Мир, 1975. - 324 с.
12. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. - М.: Медицина, 1975. - 295 с.
13. Гистология: Учебник / Под ред. Э.Г. Улумбекова. - М.: ГЭОТАР, 1997. - 960 с.
14. Биохимические и биомеханические изменения суставного хряща при многоэтапном удлинении конечности у собак / В.И. Шевцов, С.Н. Лунова, А.А. Ларионов и др. // Гений ортопедии. - 1996. - № 2-3. - С. 147-148.
15. Trias A. Effect of peristent pressure on the articular cartilage // J. Bone Jt. Surg. - 1971. - N 2. - P. 376-386.

Рукопись поступила 27.06.02.

Предлагаем вашему вниманию



В.И. Шевцов, А.М. Аранович, Р.Д. Бородайкевич

РЕАБИЛИТАЦИЯ БОЛЬНЫХ С НЕПРАВИЛЬНО СРОСШИМИСЯ ПЕРЕЛОМАМИ КОСТЕЙ ГОЛЕНИ



ISBN5-87247-072-X

Курган, 2003 г. - 284 с.

Монография посвящена проблеме лечения больных с неправильно сросшимися переломами костей голени неосложненных и осложненных хроническим остеомиелитом.

В монографии обоснована методика малотравматичной кортикотомии, определены показания и противопоказания к различным методикам чрескостного остеосинтеза.

Разработана классификация больных с неправильно сросшимися переломами костей голени, осложненных хроническим остеомиелитом. С помощью радиологических методов исследованы распространенность остеомиелитического процесса, состояние иммунного фона, свертывающей системы крови у больных с хроническим остеомиелитом.

Описаны особенности ведения больных обеих групп в послеоперационном периоде. Изучены отдаленные анатомо-функциональные результаты лечения, дан подробный анализ встретившихся ошибок и осложнений, описаны способы их лечения и меры профилактики. Монография предназначена для травматологов-ортопедов.