

УДК 616.71-018.3-073.756.8:616.718.5/.6-001.5-089.227.84-092.9

ЗАВИСИМОСТЬ ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СУСТАВНОГО ХРЯЩА ОТ УСЛОВИЙ УДЛИНЕНИЯ ГОЛЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ступина Т.А.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган, e-mail: StupinaSTA@mail.ru

Методами компьютерной морфо- и стереометрии в суставном хряще при удлинении голени у собак в режиме 1,0 мм в сутки за 4 и 8 приемов выявлены изменения деструктивно-репаративного характера. Сопоставительный анализ комплекса количественных параметров суставного хряща показал, что к концу distraction при режиме «1 мм за 4 приема» более выражена деструктивно-пролиферативная реакция. Высокая интенсивность деструктивных процессов при режиме «1 мм за 4 приема», вероятно, связана с большей (0,25 мм), чем при режиме «1 мм за 8 приемов» величиной одномоментного удлинения (0,125 мм). Параллельно в хряще развиваются регенераторные процессы, наиболее выраженные в периодах фиксации и после снятия аппарата. Сравнивая течение восстановительного процесса, можно отметить, что при более дробной distraction «1 мм за 8 приемов» восстановление структуры суставного хряща протекает наиболее интенсивно.

Ключевые слова: суставной хрящ, удлинение, морфометрия

DEPENDENCE OF HISTOMORPHOMETRIC FEATURES OF THE ARTICULAR CARTILAGE ON THE CONDITIONS OF THE EXPERIMENTAL TIBIAL LENGTHENING

Stupina T.A.

FSBI «Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: StupinaSTA@mail.ru

The methods of computer morpho- and stereometry detected both destructive and reparative changes in the articular cartilage of dogs that underwent lengthening with the rate of 1 mm a day made with 4 or 8 steps daily. Comparative analysis of the quantitative parameters of the articular cartilage showed that by lengthening of 1 mm for 4 steps, the destructive proliferative response was more expressed by the end of distraction. High intensity of destructive changes in this mode seems to be associated with a greater (0.25 mm) single step that in the mode of 1 mm for 8 steps (0.125 mm) single step. Regenerative processes in the cartilage went parallel but were more expressed in the fixation period and after the apparatus removal. It can be concluded that by higher frequency of daily distraction (1 mm/8 steps), the recovery of the articular cartilage structure ran more intensively.

Keywords: articular cartilage, lengthening, morphometry

Из всех существующих на сегодняшний день методов ортопедического удлинения именно метод Г.А. Илизарова получил международное признание и широкое внедрение в практику, однако вплоть до настоящего времени при его применении остаётся нерешённой проблема функциональной реабилитации пациентов – в частности, восстановления объёма движений в суставах [1, 5].

С целью уменьшения травматизации тканей при distractionном остеосинтезе академик Г.А. Илизаров предложил разделить суточное удлинение (1 мм) на несколько приёмов (разовых удлинений) – принцип дробной и высокодробной distraction [4]. В условиях дозированной низкодробной distraction с разовым удлинением 0,5 мм зарубежными исследователями [10, 12] были отмечены истончение, разволокнение суставного хряща, в части наблюдений выявлены некротические изменения. При применении автодистракторов, позволя-

ющих распределить суточное удлинение на 120 приёмов, повреждения суставного хряща существенно уменьшаются [11]. Меньшая травматизация суставного хряща в условиях высокодробной distraction установлена также при автоматическом удлинении с темпом 1 мм за 60 приёмов [9]. В настоящее время недостаточно изучено состояние суставного хряща при наиболее часто применяемом в клинике режиме ручной distraction «1 мм за 4 приёма» с разовым удлинением 0,25 мм, отсутствуют исследования по сопоставлению этого режима с высокодробным режимом ручной distraction «1 мм за 8 приемов» (величина разового удлинения 0,125 мм). Актуальность исследования структурной реорганизации суставного хряща при биомоделировании ортопедического удлинения конечностей и сопоставительного количественного анализа по единому алгоритму определяется недостаточными знаниями об адаптивности и пластичности хрящевой

ткани в обозначенных условиях и необходимостью этих знаний для оптимизации методик реконструктивной ортопедии.

Цель исследования

Изучение зависимости количественных характеристик суставного хряща от условий удлинения смежного сегмента конечности с темпом 1 мм за 4 и 8 приёмов.

Материалы и методы исследования

Исследован суставной хрящ наружных мышц локтевого бедра 5 интактных (контроль) и 28 опытных собак, которым после закрытой флекссионной остеоклазии в течение 28 суток удлиняли голень аппаратом Илизарова в 1-й серии ($n = 16$) с темпом 1 мм за 4 приема, во 2-й серии ($n = 12$) с темпом 1 мм за 8 приемов. Экспериментаторы д.м.н. С.А. Ерофеев и к.в.н. А.А. Еманов. Содержание, оперативные вмешательства и эвтаназию животных проводили в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник и принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986). Манипуляции, проводимые на животных, рассмотрены и одобрены этическим комитетом «РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова». Гистоморфометрические и стереологические исследования проведены через 28 суток distraction, 30 суток фиксации и 30 суток без аппарата по серийным полутонким срезам увеличенной (6–8 мм²) площади [7, 8], окрашенным метиленовым синим и основным фуксином. Цифровые изображения получали с помощью АПК «ДиаМорф» (Москва) на фотомикроскопе «Ортоп» (Германия). В графическом редакторе «BT-Мастер-Морфология» («ВидеоТест», С-Пб) измеряли толщину (h , мкм) хряща, рассчитывали долю хондроцитов в составе изогенных групп ($NN_{is,gr,\%}$) от общего количества хондроцитов и долю пустых лакун ($NN_{em,lac,\%}$) от общего количества лакун. В поверхностной, промежуточной и глубокой зонах хряща регистрировали объемную ($VV_{ch,\%}$) и численную (NA_{ch} , мкм⁻²) плотности клеток, площадь хондроцитов (S_{ch} , мкм²). В этих же клетках определяли объемную плотность ядер (VV_n) и цитоплазмы (VV_c) в долях единицы, а также их отношение (VV_n / VV_c) – ядерно-цитоплазматический индекс (NCI). Для анализа цифрового материала использовали описательную статистику. В зависимости от характера распределения и объема выборки достоверность различий оценивали с помощью критериев Стьюдента или Вилкоксона в программе AtteStat, версия 1.0 в электронных таблицах Microsoft Excel 97. Для исследования в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) «JSM-840» (Jeol, Япония) образцы суставного хряща с подлежащей субхондральной костью дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали в камфене (3,3-диметил-2-метиленицикло[2,2,1]гептан – ГОСТ 15039-76) по оригинальной методике [6], высушивали на воздухе, напыляли серебром.

Результаты исследования и их обсуждение

К концу distraction в обеих сериях при исследовании в СЭМ отмечено разволок-

нение суставной поверхности, вскрытые клеточные лакуны (рис. 1). Наиболее интенсивные деструктивные изменения (разволокнение коллагенового каркаса поверхностной зоны) отмечены в серии 1.

В обеих сериях при исследовании полутонких срезов хряща деструктивно измененные хондроциты были выявлены во всех зонах, но наибольшая частота встречаемости отмечена в поверхностной и глубокой.

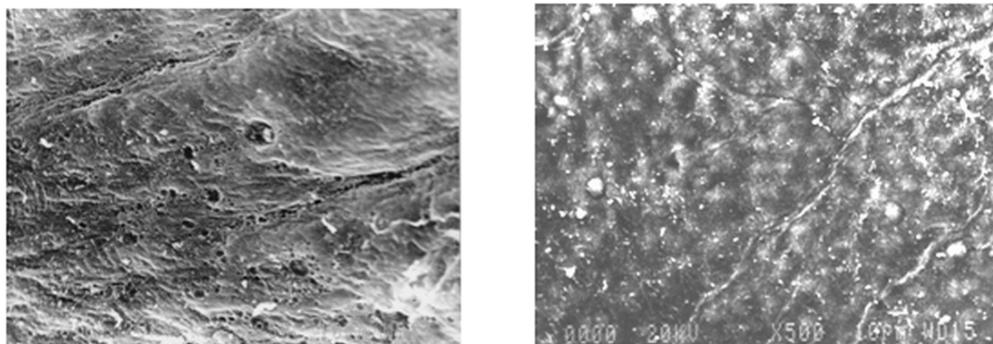
Морфометрический анализ комплекса параметров позволил уточнить различия в состоянии суставного хряща при ручной distraction с темпом 1 мм за 4 и 8 приемов. К концу периода distraction в 1-й серии отмечено достоверное ($p < 0,001$) увеличение h хряща относительно контроля (таблица), что обусловлено более выраженной дезорганизацией межклеточного вещества поверхностной зоны, набуханием основного вещества и коллагеновых волокон. На последующих этапах эксперимента выявлено достоверное ($p < 0,001$) снижение анализируемого параметра относительно контроля и 2-й серии эксперимента. Во 2-й серии к концу периода distraction h хряща достоверно ($p < 0,001$) ниже контроля. На последующих этапах эксперимента выявлена тенденция к увеличению, через месяц после снятия аппарата h хряща сопоставима с контролем.

В поверхностной зоне через 28 суток distraction NA_{ch} в серии 1 достоверно ($p < 0,05$) снижена, относительно контроля и серии 2, к концу эксперимента достоверно превышала контроль и значения серии 2 (таблица).

В серии 2 к концу эксперимента сохранялись сниженные значения NA_{ch} . В срок 30 суток фиксации в серии 1 VV_{ch} незначительно увеличивалась относительно предыдущего срока, но к концу эксперимента сохранялись достоверно ($p < 0,05$) сниженные значения. В серии 2 значения VV_{ch} через месяц фиксации и месяц после снятия аппарата сопоставимы с контролем (таблица). Низкие значения объемной плотности хондроцитов в серии 1 на фоне высокой численной плотности обусловлены резким снижением S_{ch} (таблица). На всех этапах эксперимента в поверхностной зоне хряща 2-й серии выявлено снижение ($p < 0,05$) NCI ($0,54 \pm 0,03$ через 28 суток distraction; $0,35 \pm 0,03$ через 30 суток фиксации; $0,64 \pm 0,03$ через 30 суток баз аппарата; $0,75 \pm 0,03$ в контроле). В серии 1 снижение ($p < 0,05$) NCI выражено в меньшей степени, чем в серии 2 ($0,64 \pm 0,02$ через 28 суток distraction; $0,61 \pm 0,05$ через 30 суток фиксации и через 30 суток баз аппарата). Снижение параметров VV_{ch} , S_{ch}

в серии 1 к концу эксперимента может являться отражением деструктивных изменений хондроцитов, апоптоза. Самым ранним морфологическим проявлением апоптоза является появление в ядре резко очерченных уплотненных масс хроматина с внутренней

стороны ядерной оболочки [2]. Морфологические признаки апоптоза чаще наблюдали в суставном хряще серии 1, при исследовании в СЭМ отмечены явления сжатия клеток с сохранением контактов с межклеточным матриксом (рис. 2, А).



А

Б

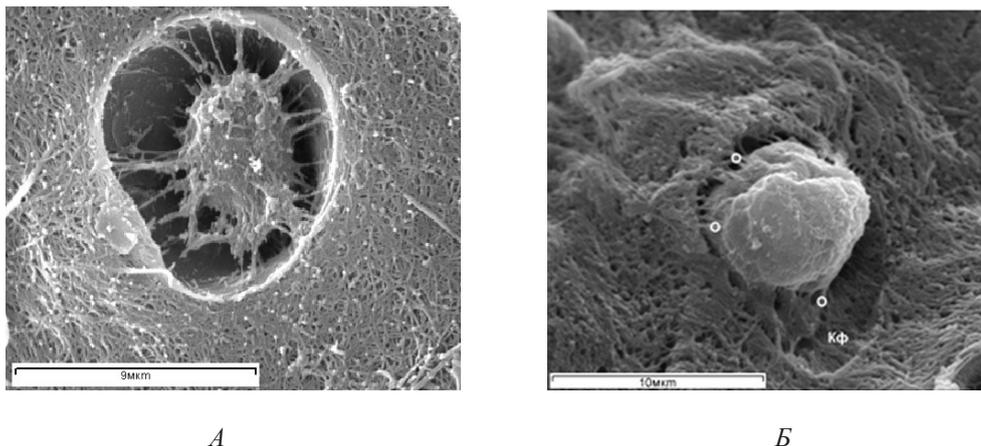
Рис. 1. СЭМ, поверхность, обращенная в полость сустава. Конец периода distraction. А – 1 серия, увеличение 850, Б – 2 серия, увеличение 500

Количественные характеристики суставного хряща мышелка бедра на этапах эксперимента удлинения голени

Параметры		VV (%, M ± σ)	NA _{ch} (мкм ² , M ± σ)	S _{ch} (мкм ² , M ± σ)	h (мкм, M ± m)	NN _{em.lac.} (%)	NN _{is.gr.} (%)
Контроль							
Контроль	I	6,12 ± 2,43	8,21 ± 2,19	45,34 ± 10,51	475,55 ± 1,31	13,6	14,5
	II	8,75 ± 2,54	4,45 ± 1,34	119,91 ± 24,37			
	III	12,26 ± 3,21	5,73 ± 2,15	129,31 ± 28,14			
1 мм за 4 приема (ручные подкрутки)							
28 суток distraction	I	3,42 ± 1,96*	5,42 ± 1,68*	44,23 ± 12,98	710,34 ± 7,16 *	29,97 *	24,7 *
	II	3,9 ± 0,68*	4,94 ± 1,33	53,64 ± 10,38*			
	III	4,99 ± 1,18*	4,91 ± 1,56*	70,81 ± 19,45*			
30 суток фиксации	I	4,12 ± 1,26*	11,5 ± 3,44*	29,53 ± 7,15*	421,15 ± 4,82 *	20,85 *	20,18 *
	II	4,67 ± 1,04*	6,3 ± 1,44*	71,13 ± 18,36*			
	III	6,58 ± 1,43*	6,51 ± 1,15*	80,75 ± 14,13*			
30 суток без аппарата	I	4,14 ± 0,97*	12,21 ± 2,62*	27,75 ± 4,32*	416,94 ± 4,37 *	21,12 *	15,4 *
	II	6,01 ± 1,39*	7,13 ± 2,68*	66,61 ± 15,01*			
	III	6,91 ± 1,97*	3,84 ± 2,64*	103,25 ± 29,92*			
1 мм за 8 приемов (ручные подкрутки)							
28 суток distraction	I	3,73 ± 1,62*	7,75 ± 1,79*■	30,09 ± 6,65*■	369,91 ± 2,57 *■	20,4 *■	21,14 *■
	II	6,41 ± 2,34*■	5,94 ± 1,56*■	68,71 ± 16,33*■			
	III	9,06 ± 3,85*■	6,01 ± 1,49*■	96,86 ± 30,14*■			
30 суток фиксации	I	6,32 ± 2,43■	7,92 ± 2,39*■	52,73 ± 18,44*■	415,38 ± 2,13 *■	19,7 *	31,2 *■
	II	9,22 ± 3,18*■	5,68 ± 1,84*■	102,34 ± 19,74*■			
	III	9,16 ± 3,27*■	6,36 ± 2,08*	90,94 ± 23,66*■			
30 суток без аппарата	I	6,53 ± 2,12■	4,59 ± 1,19*■	71,02 ± 21,61*■	468,24 ± 0,53 ■	15,8 *■	33,5 *■
	II	8,71 ± 1,68■	4,53 ± 1,12■	121,71 ± 22,35■			
	III	8,50 ± 1,34*■	4,87 ± 1,28*■	116,11 ± 33,18*■			

Примечания. I – поверхностная, II – промежуточная, III – глубокая зоны хряща.

* – достоверные различия с контролем, ■ – достоверные различия между сериями (для параметров VV_{ch}, NA_{ch}, NN_{em.lac}, NN_{is.gr} и S_{ch} – p < 0,05, для h – p < 0,001).



А

Б

Рис. 2. Хондроцит в лакуне. СЭМ. А – увеличение 5500. Серия 1. Б – увеличение 4300. Серия 2. Многочисленные отростки (О) контактируют со стенкой лакуны. Стенки лакуны построены из коллагеновых фибрилл (Кф)

В серии 2 увеличение размеров клеток, снижение NCI свидетельствовали о повышении синтетической активности хондроцитов поверхностной зоны, при исследовании в СЭМ отмечали хондроциты, которые занимали всю клеточную лакуну, поверхность таких клеток имела бугристый рельеф, многочисленные отростки контактировали со стенкой лакуны, фиксируя положение клетки (рис. 2, Б).

В промежуточной зоне в обеих сериях на всех сроках эксперимента численная плотность клеток превышала контрольные значения, максимальные значения были выявлены в серии 1 в сроки 30 суток фиксации и месяц после снятия аппарата (таблица). В обеих сериях к концу периода distraction выявлено уменьшение VV_{ch} , в серии 1 значения минимальные (таблица). Снижение VV_{ch} обусловлено уменьшением S_{ch} в обеих сериях, наиболее выраженным в 1 серии. Через месяц фиксации в обеих сериях отмечена тенденция к увеличению VV_{ch} , наиболее выраженная во 2-й серии. К концу эксперимента значения VV_{ch} в серии 2 достигали контроль, в серии 1 достоверно ($p < 0,05$) ниже контроля. При 4-кратной distraction отмечено достоверное ($p < 0,05$) увеличение Vv_n , в результате чего NCI на всех этапах эксперимента превышал ($p < 0,05$) контроль ($0,74 \pm 0,04$ через 28 суток distraction; $0,34 \pm 0,03$ через 30 суток фиксации; $0,32 \pm 0,03$ через 30 суток без аппарата; $0,27 \pm 0,02$ в контроле). При 8-кратной distraction значения NCI к концу distraction увеличивались ($0,32 \pm 0,01$), через месяцев фиксации за счет увеличения в большей степени Vv_c снижались до

$0,24 \pm 0,01$, к концу эксперимента вновь увеличивались до $0,34 \pm 0,02$. Выявленная динамика количественных характеристик клеток и их ядер промежуточной зоны суставного хряща в серии 1 может являться отражением дедифференцировки клеток и восстановления их пролиферативных потенциалов. Известно, что дедифференцировка, как реактивно-приспособительное изменение клеток, сопровождается увеличением относительных объемов ядер [3]. Так, к концу периода distraction доля изогенных групп и доля пустых лакун в общем объеме выборки в 1-й серии превышала контроль и значения серии 2 (таблица). Значения доли пустых лакун в общем объеме выборки в этой серии максимальны. При некрозе происходит разрушение мембранного скелета с выходом ее содержимого в окружающее пространство, в том числе и факторов роста, тем самым в биологическом феномене некроза уже заложен фактор будущей регенерации [2]. Чем, возможно, объясняются интенсивно выраженные процессы гибели и пролиферации в серии 1. К концу эксперимента в обеих сериях сохранялись повышенные значения $NN_{is,gr}$, максимальные значения отмечены в серии 2.

В глубокой зоне во 2-й серии NA_{ch} превышала контроль (таблица), за счет увеличения количества клеток в колонках, формирования изогенных групп, вокруг которых территориальный матрикс отсутствовал. В 1-й серии значения данного параметра значимо снижены. При светоптическом исследовании полутонких срезов выявлено изменение цитоархитектоники глубокой зоны, отсутствовало колончатое

расположение клеток, появлялись бесклеточные поля, часть хондроцитов в состоянии деструкции, выявлены пустые лакуны. Через месяц фиксации NA_{ch} в обеих сериях достоверно ($p < 0,05$) превышала контроль, к концу эксперимента выявлена тенденция к снижению данного параметра, минимальные значения зарегистрированы в серии 1. В обеих сериях VV_{ch} на всех этапах эксперимента снижена, минимальные значения отмечены в серии 1. Низкие значения VV_{ch} обусловлены резким снижением S_{ch} интенсивнее выраженным в серии 1 (таблица). Значения NCI в серии 1 на этапах distraction ($0,24 \pm 0,02$) и через 30 суток фиксации ($0,26 \pm 0,02$) сопоставимы с контролем ($0,25 \pm 0,02$), в срок 30 суток без аппарата ($0,17 \pm 0,01$) за счет увеличения Vv_c снижены ($p < 0,05$). В серии 2 на этапе distraction и в конце эксперимента значения NCI увеличивались ($0,32 \pm 0,02$ и $0,27 \pm 0,02$ соответственно), а в срок 30 суток фиксации ($0,21 \pm 0,01$) незначительно снижались.

Степень травматизации суставного хряща характеризует увеличение $NN_{em.lac.}$, что выявлено в обеих сериях, максимальные значения данного параметра зарегистрированы в 1-й серии через 28 суток distraction, различия между сериями достоверны (таблица). При этом размерные характеристики хондроцитов в серии 1 более снижены по сравнению с контролем и серией 2. На последующих этапах эксперимента в серии 2 интенсивнее выражены процессы пролиферации (высокие значения $NN_{is.gr.}$), а увеличение к концу эксперимента параметров h хряща, VV_{ch} , S_{ch} характеризовало повышение биосинтетической активности хондроцитов.

Заключение

Таким образом, степень выраженности изменений в суставном хряще зависела от характеристик distraction. Так, при режиме «1 мм за 4 приема» высокая интенсивность деструктивных процессов, вероятно, связана с большей ($0,25$ мм), чем при режиме «1 мм за 8 приемов» величиной одномоментного удлинения ($0,125$ мм). Сопоставительный анализ комплекса количественных параметров суставного хряща показал, что к концу distraction при режиме «1 мм за 4 приема» более выражена деструктивно-пролифера-

тивная реакция суставного хряща, чем при режиме «1 мм за 8 приемов». Параллельно в хряще развиваются регенераторные процессы, наиболее выраженные в периодах фиксации и после снятия аппарата. Сравнивая течение восстановительного процесса, можно отметить, что при более дробной distraction в режиме «1 мм за 8 приемов» восстановление структуры суставного хряща протекает наиболее интенсивно.

Список литературы

1. Аранович А.М., Динидибера Е.В., Климов О.В., Новиков К.И. Ошибки и осложнения при удлинении голени у больных ахондроплазией // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 1. – С. 36–37.
2. Вагина И.Р., Петров С.В. Феномен апоптоза в условиях длительного механического напряжения патологически измененных тканей у человека // «Морфофункциональные аспекты регенерации и адаптационной дифференцировки структурных компонентов опорно-двигательного аппарата в условиях механических воздействий». – Курган, 2004. – С. 54–56.
3. Данилов Р. К. Гистология. Эмбриология. Цитология. – Изд-во МИА, 2006. – 456 с.
4. Илизаров Г.А. Теоретические и практические аспекты удлинения конечностей методом чрескостного остеосинтеза / Г.А. Илизаров, В.И. Шевцов, В.И. Калякина и др. // Пленум науч. совета по травматол. и ортопед. АМН СССР: Тез. докл. – Пермь, 1982. – С. 33–36.
5. Попков А.В., Попков Д.А. Особенности функционального восстановления после оперативного лечения детей с врожденным укорочением нижних конечностей // Гений ортопедии. – 2008. – № 1. – С. 19–26.
6. Патент 2397472 Р.Ф., МПК Способ подготовки образцов биологических тканей для исследования в сканирующем электронном микроскопе / Силантьева Т.А. (РФ), Горбач Е.Н. (РФ), Ирьянов Ю.М. (РФ), Ступина Т.А. (РФ), Варсегова Т.Н. (РФ), РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова (РФ). – № 2008150910/12; Заявл. 22.10.2008.; Оpubл. 20.08.2010. Бюл. № 23.
7. Ступина Т.А., Щудло М.М. Способ количественной оценки состояния суставного хряща на разных уровнях структурной организации // Гений ортопедии. – 2009. – № 1. – С. 55–57.
8. Ступина Т.А., Щудло М.М. Способ изготовления препаратов недекальцированного суставного хряща с подлежащей субхондральной костью для многоцелевых исследований // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – № 3. – С. 388–390.
9. 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.
10. Fink B., Schwinger G., Singer J., Sager M., Wilke C., Braunstein S. The effect of tibial lengthening using the Ilizarov method on the cartilage and the menisci of the knee joint // J Orthop Res. – 2001 – Jul;19(4). – P. 665–670.
11. 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.
12. Stanitski D.F., Rossman K., Torosian M. The effect of femoral lengthening on knee articular cartilage: the role of apparatus extension across the joint // J Pediatr Orthop. – 1996. – Mar-Apr;16(2). – P. 151–154.