

СТРУКТУРНАЯ АДАПТИВНОСТЬ И РЕПАРАТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СУСТАВНОГО ХРЯЩА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ УДЛИНЕНИЯ СМЕЖНОГО СЕГМЕНТА КОНЕЧНОСТИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Т.А. Ступина, М.М. Щудло

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, директор – д.м.н. А.В. Губин г. Курган

Методами сканирующей электронной микроскопии и гистоморфометрического анализа в суставном хряще при удлинении голени выявлены изменения реактивного и/или деструктивно-репаративного характера, степень которых зависит от параметров distraction. Анализ количественных данных показал, что автоdistraction в режиме 3 мм в сутки за 180 включений (шаг ≈ 17 мкм) является для суставного хряща менее травматичной, чем ручная distraction по 1 мм в день за 4 приема, причем значительно сокращается срок эксперимента. При автоdistraction с тем же шагом, но суточным темпом 1 мм восстановление суставного хряща протекает наиболее интенсивно.

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

STRUCTURAL ADAPTABILITY AND THE REPARATIVE POSSIBILITIES OF ARTICULAR CARTILAGE DEPENDING ON THE ADJACENT EXTREMITY SEGMENT LENGTHENING CONDITIONS (AN EXPERIMENTAL-AND-MORPHOLOGICAL STUDY)

T.A. Stupina, M.M. Schoudlo

The changes of reactive and/or destructive-and-reparative character, the degree of which depends on distraction parameters, have been revealed in articular cartilage during leg lengthening by the methods of scanning electron microscopy and histomorphometry analysis. The analysis of quantitative data has demonstrated, that autodistraction by 3 mm per day for 180 times (increment ≈ 17 μ m) appears to be less traumatic for the articular cartilage than manual distraction by 1 mm per day for 4 times, and, at the time, the period of experiment decreases significantly. The articular cartilage recovery occurs in the most intense manner in case of autodistraction with the same increment, but with the daily rate of 1 mm.

Key words: distraction osteosynthesis, articular cartilage, morphology, morphometry.

Введение

Реакция суставов на удлинение конечности аппаратом Илизарова отмечалась многими авторами [7, 9–12, 14]. Актуальной задачей при удлинении конечности, требующей теоретического обоснования и практического решения, является выбор оптимального режима distraction, максимальное повышение дробности distraction с помощью автоматических устройств. В связи с этим разработка, экспериментальная апробация и морфологическое обоснование новых технологий distractionного остеосинтеза продолжают.

Среди условий, влияющих на регенераторный процесс всех тканей удлиняемой конечности, важное место занимают оптимальные темп и ритм distraction. По мнению E. Nakamura с соавторами, повышение дробности удлинения

может предотвратить повреждения хрящевой выстилки смежных суставов [13]. Дальнейшее развитие этого направления требует изучения состояния физиологических резервов тканей удлиняемой конечности в зависимости от режима distraction, в том числе адекватной оценки реактивных изменений и репаративных потенциалов суставного хряща на основе современных представлений о его адаптивности и пластичности.

Цель – изучение особенностей структурно-функционального реагирования и восстановления суставного хряща при разных режимах удлинения смежного сегмента конечности.

Материал и методы

Объект исследования – суставной хрящ наружных мышечков бедра 37 взрослых бес-

породных собак, которым осуществляли дозированное удлинение голени на одинаковую величину – 28–30 мм (~14–15%), но в разных режимах. В серии I дистракция осуществлялась со скоростью 1 мм в день за 4 приема (ручной режим, шаг = 0,25 мм), в серии II – со скоростью 1 мм в сутки за 60 приемов (автодистракция, шаг ≈ 17 мкм), а в серии III – в режиме 3 мм за 180 приемов (автодистракция, шаг ≈ 17 мкм). Эксперименты проведены д.м.н. С.А. Ерофеевым. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли с соблюдением требований приказа МЗ СССР № 755 от 1977 г. Сроки морфологического исследования во всех сериях: конец дистракции, 30 суток фиксации и 30 суток без аппарата.

Серийные перпендикулярные эпоксидные полутонкие (толщиной 0,5–1,0 мкм) срезы суставной поверхности большой площади (6–8 мм²) готовили на ультратоме “Nova” фирмы “LKВ” (Швеция). Препараты, окрашенные метиленовым синим и основным фуксином, изучали под фотомикроскопом “Orton” (Германия) с АПК «ДиаМорф» (Москва) для оцифровки изображений. Их репрезентативную выборку для количественного анализа получали путем ввода полей зрения параллельными рядами, исключая взаимоперекрывание. Выборку формировали тотально, при этом количество анализируемых структур, целиком попавших в поле зрения, было максимальным. В программе «ВТ-Мастер-Морфология» (фирма «ВидеоТест», СПб.) определяли толщину хряща (h_{xp}), рассчитывали объемную ($V_{v_{xh}}$) и численную (NA_{xh}) плотности всех хондроцитов в ткани, а также численную плотность изогенных групп ($NA_{из.гг}$) в общем объеме выборки (%). В поверхностной, промежуточной и глубокой зонах хряща производили цито- и кариометрию, в клетках определяли объемную плотность ядер ($V_{v_{я}}$) и цитоплазмы ($V_{v_{ц}}$), рассчитывали ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), определяли максимальный (d_{max}) и минимальный (d_{min}) диаметры клетки и ядра. Результаты измерения получали в микрометрах после геометрической калибровки изображений по оцифрованному при том же увеличении изображения шкалы объект-микрометра. 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 [1] в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Для изучения рельефа суставной поверхности материал дегидратировали в спиртах воз-

растающей концентрации, пропитывали в камфене [5], напыляли серебром и исследовали в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) “JSM-840” (Jeol, Япония).

Результаты и обсуждение

При исследовании суставного хряща интактных животных рельеф суставной поверхности имел регулярную волнистость (рис. 1 а), все зоны хряща сохраняли обычное строение, деструктивные изменения не выявлены.

К концу периода дистракции во всех сериях появлялись наиболее ранние изменения в поверхностной и глубокой зонах хряща. При светооптическом исследовании полутонких срезов отмечено нарушение гомогенности межклеточного вещества поверхностной зоны, снижение интенсивности его окраски. С помощью СЭМ выявлено разволокнение суставной поверхности, обнаружены вскрытые лакуны хондроцитов, как пустые, так и с обнаженными на поверхность клетками (рис. 1 б-г). Наиболее интенсивные деструктивные изменения – разволокнение коллагенового каркаса поверхностной зоны с формированием узур – отмечены при 4-кратном режиме дистракции.

В сериях I и III в части наблюдений отмечали нарушение целостности базофильной линии, проникновение сосудов в хрящ. В промежуточной зоне также отмечены хондроциты в состоянии деструкции. Наблюдаемые деструктивные изменения во всех сериях имели мозаичный характер. О включении механического компонента в патогенез свидетельствует локализация деструктивных изменений в участках высокой нагрузки (разволокнение поверхностной зоны, проникновение сосудов в глубокую зону со стороны субхондральной кости).

Морфометрический анализ выявил у животных серии I в период дистракции достоверное увеличение h_{xp} (табл. 1), что обусловлено выраженной дезорганизацией межклеточного вещества поверхностной зоны с набуханием основного вещества и коллагеновых волокон. На последующих этапах эксперимента данный параметр достоверно ниже нормы ($p < 0,001$). При автодистракции к концу периода удлинения выявлено снижение h_{xp} ($p < 0,001$), а к концу эксперимента – увеличение данного параметра, но только в серии с режимом дистракции 1/60, до интактной нормы.

К концу периода дистракции выявлено достоверное снижение NA_{xh} в сериях I и III. Во всех сериях достоверно снижена $V_{v_{xh}}$, наименьшие значения данного параметра выявлены при ручных подкрутках и автодистракции с повышенным темпом, что обусловлено увеличением

количества пустых лакун, уменьшением размеров хондроцитов, находящихся в состоянии деструкции. Наименьшая степень выраженности деструктивных изменений отмечена при автодистракции с темпом 1 мм и в меньшей степени, чем в остальных сериях, снижена $Vv_{хц}$, тогда как $Na_{хц}$ сопоставима с контролем. Через месяц фиксации во всех сериях $Vv_{хц}$ ниже нормы. Через месяц после снятия аппарата в серии I сохранились сниженные значения, а в сериях

II и III отмечена тенденция к росту последнего параметра.

При количественном исследовании на клеточном уровне наиболее ярко выражены изменения хондроцитов неповрежденных участков поверхностной зоны. На протяжении всего эксперимента в связи с более значительным ростом $Vv_{ц}$ по сравнению с ядром во всех сериях выявлено снижение ЯЦИ, наиболее выраженное при автодистракции с суточным темпом 1 мм (рис. 2).

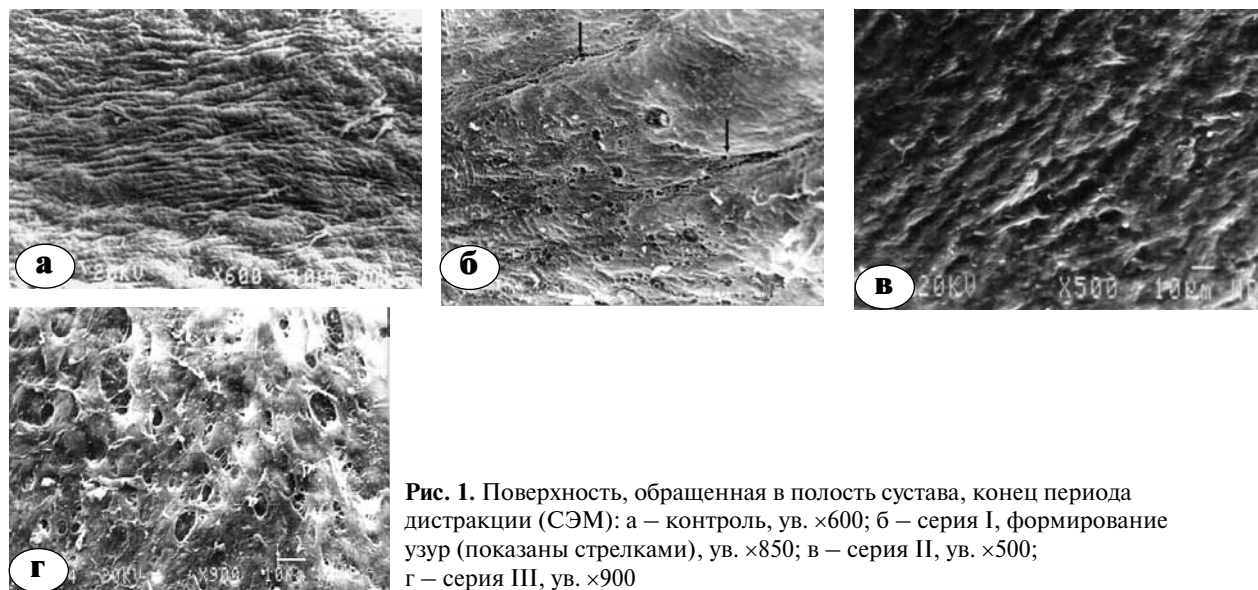


Рис. 1. Поверхность, обращенная в полость сустава, конец периода дистракции (СЭМ): а – контроль, ув. $\times 600$; б – серия I, формирование узур (показаны стрелками), ув. $\times 850$; в – серия II, ув. $\times 500$; г – серия III, ув. $\times 900$

Таблица 1

Характеристики суставного хряща мышелков бедра на этапах эксперимента

Сроки	Параметры			
	$Vv_{хц}$ (M \pm m), %	$Na_{хц}$ (M \pm m)	$h_{хр}$ (M \pm m), мкм	$Na_{из.гр}$, %
Контроль				
–	9,03 \pm 1,50	6,10 \pm 0,70	475,50 \pm 1,30	14,5
Серия I				
28 суток дистракции	4,13\pm0,28	5,10\pm0,42	710,30\pm7,10	24,7
30 суток фиксации	5,10\pm0,27	7,90\pm0,52	421,10\pm4,80	28,8
30 суток без аппарата	5,60\pm0,20	6,30 \pm 0,40	416,90\pm4,37	18,0
Серия II				
28 суток дистракции	8,34\pm0,48	6,84\pm0,47	356,45\pm1,50	25,6
30 суток фиксации	6,80\pm0,45	5,02\pm0,32	392,70\pm2,10	26,0
30 суток без аппарата	7,96\pm0,37	4,79\pm0,22	464,60 \pm 6,50	15,4
Серия III				
10 суток дистракции	4,79\pm0,39*	5,88\pm0,48	375,70\pm1,80	22,0
30 суток фиксации	5,43\pm0,21	4,84\pm0,20	439,50\pm1,80	31,3
30 суток без аппарата	7,72\pm0,49	6,56 \pm 0,45	446,80\pm1,60	27,5

Примечание: жирным шрифтом отмечены достоверные различия с контролем. При определении достоверности различий для $Vv_{хц}$, $Na_{хц}$ использовали критерий Вилкоксона (различия достоверны при $p < 0,05$), для $h_{хр}$ – критерий Стьюдена (различия достоверны при $p < 0,001$).

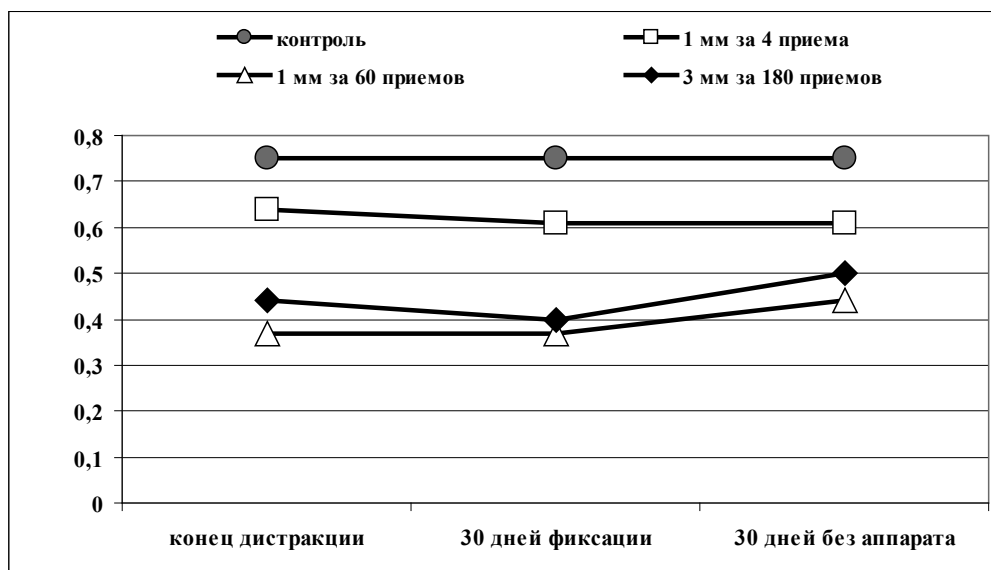


Рис. 2. Динамика ЯЦИ хондроцитов поверхностной зоны суставного хряща на этапах эксперимента

Динамика ЯЦИ на этапах эксперимента при автодистракции с суточным темпом 1 и 3 мм имела одинаковый характер. Наименьшее снижение ЯЦИ на всех сроках эксперимента выявлено при 4-кратной ручной дистракции.

Судя по увеличению d_{\min} , клетки округлялись, что подтверждает СЭМ (рис. 3). В норме клетки поверхностной зоны узкие, продолговатой формы [8].

На протяжении всего эксперимента d_{\min} клеток превышал норму (рис. 4) во всех сериях, но в наибольшей степени – при автодистракции с темпом 1 мм на этапах distraction и фиксации. К концу эксперимента в сериях I и особенно II наблюдалось снижение данного параметра.

Во всех сериях на протяжении всего эксперимента $N_{из.гр}$ была выше нормы; максимальные значения были выявлены в сериях I и III. Наибольшая частота встречаемости изогенных групп клеток наблюдалась в верхней части промежуточной зоны и в неповрежденных участках поверхностной. Полученные нами данные о функциональной значимости хондроцитов поверхностной зоны как резерва клеточной пролиферации согласуются с литературными данными [4, 8].

Максимальные значения d_{\min} клеток промежуточной и глубокой зон в сериях I и II выявлены в срок 30 суток фиксации, в серии III – через месяц после снятия аппарата; в этой серии этап distraction укорочен на 18 суток и адаптационные процессы развились на более позднем этапе (рис. 5).

В серии I в промежуточной зоне на этапе distraction ЯЦИ значительно превышал норму за счет увеличения ($p < 0,001$) $V_{v,я}$, что коррелирует с повышенным содержанием ДНК (проли-

ферация), либо РНК (биосинтез) [2]. К концу эксперимента в сериях I и III значения ЯЦИ хондроцитов промежуточной зоны достоверно ($p < 0,001$) выше, чем в контроле (рис. 6).

Рост параметров, характеризующих размер и форму клеток и их ядер, свидетельствовал об усложнении структуры хондроцитов, усилении биосинтетической и пролиферативной активности.

Полученные нами данные о регенераторных возможностях суставного хряща при удлинении смежного сегмента конечности согласуются с литературными данными о компенсаторных процессах хрящевой ткани [2, 4, 8]. Репаративный гистогенез растущих тканей, к которым относится хрящевая ткань, включает процессы как клеточной пролиферации, так и внутриклеточных биосинтезов, сопровождающихся увеличением объема клетки [2]. По данным В.В. Кормильченко с соавторами и К.Г. Редько с соавторами, при суставной патологии выявлено снижение количественных характеристик хрящевых клеток [3, 6].

Возможность и степень восстановления суставной поверхности иллюстрируют данные, полученные через месяц после снятия аппарата. При автодистракции с темпом 1 мм репаративная регенерация по типу реституции завершается формированием суставной поверхности, приближающейся по структуре к интактной. При гистоморфометрическом исследовании отмечено восстановление гомогенности межклеточного вещества поверхностной зоны и толщины хряща. В сериях I и III регенерация суставного хряща имела незавершенный характер – в части наблюдений выявлены участки, в которых определялись вскрытые клеточные лакуны (рис. 7).

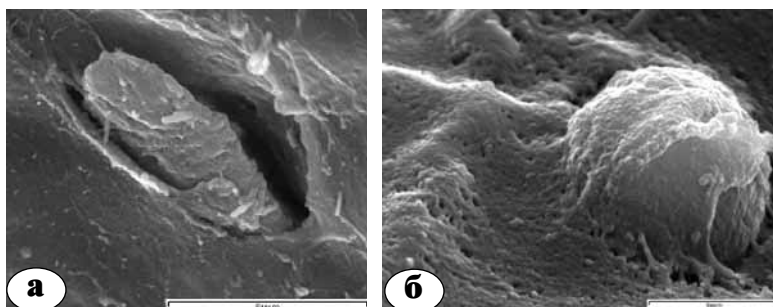


Рис. 3. Хондроциты поверхностной зоны (СЭМ):
а – контроль, ув. $\times 8500$; б – II серия, 30 суток фиксации, ув. $\times 5500$

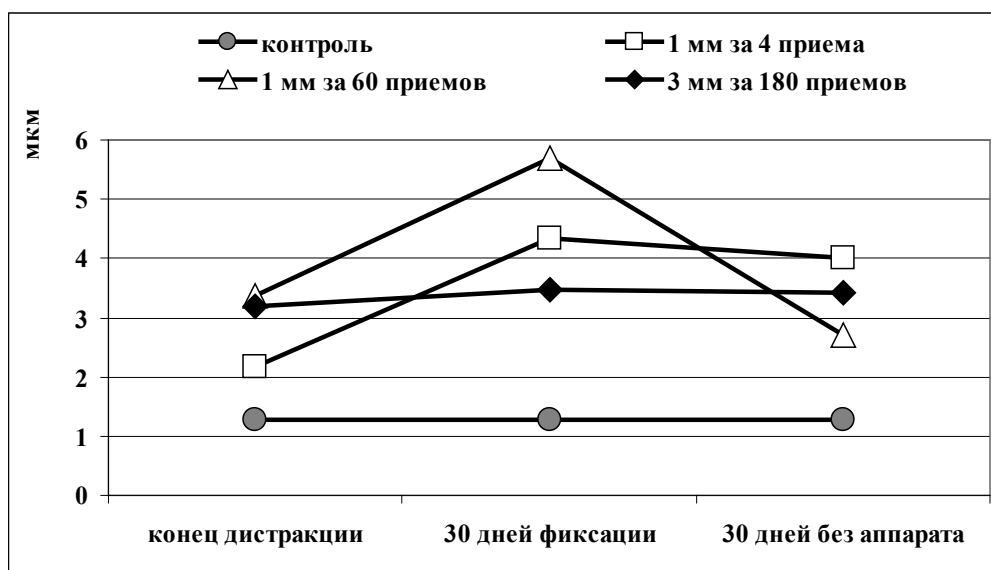


Рис. 4. Динамика значения минимального диаметра хондроцитов поверхностной зоны суставного хряща на этапах эксперимента

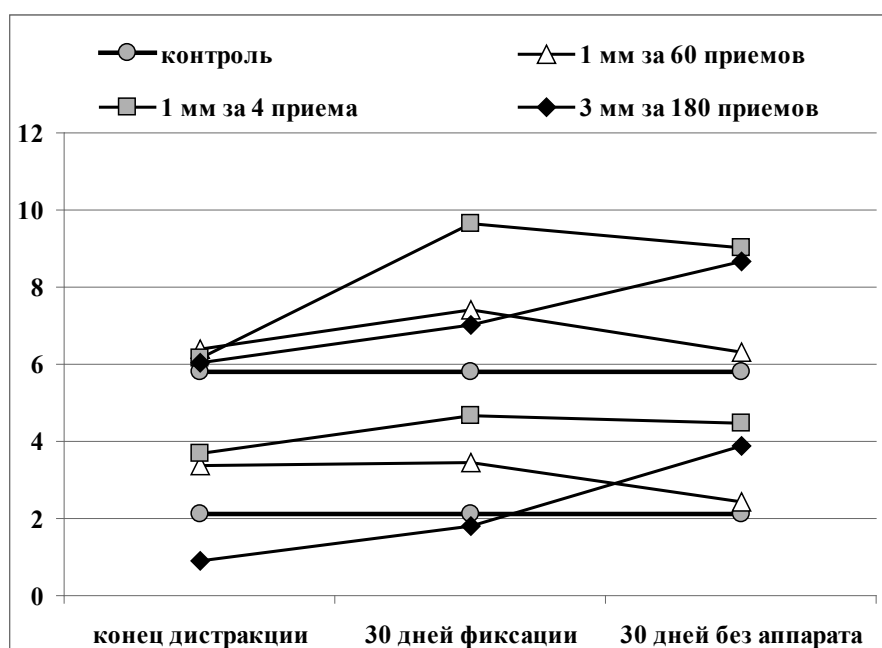


Рис. 5. Динамика минимального диаметра хондроцитов и их ядер в промежуточной зоне суставного хряща на этапах эксперимента

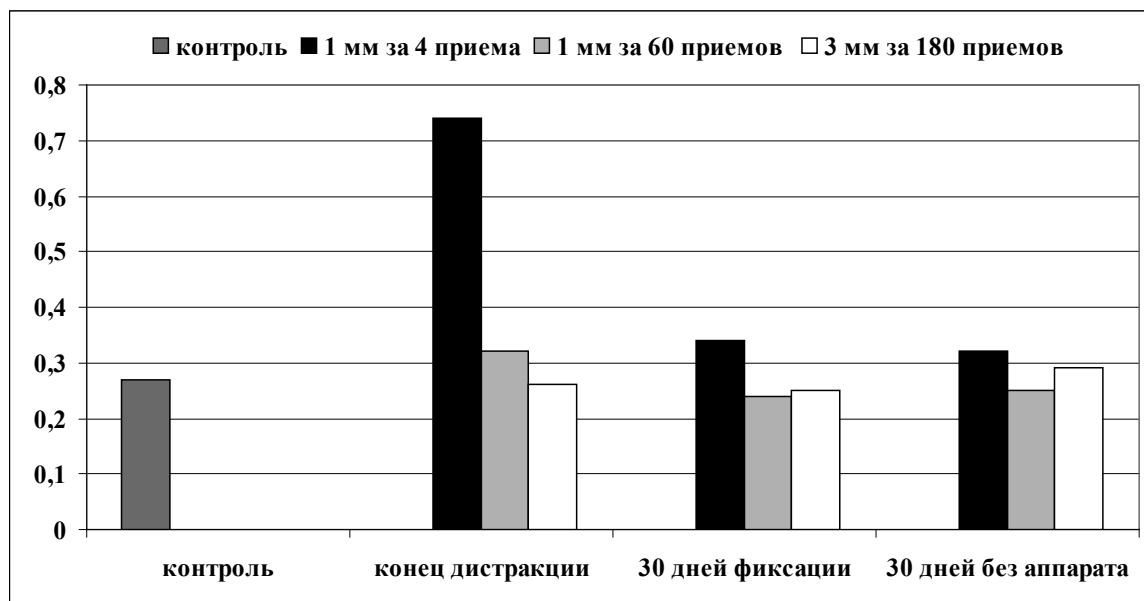


Рис. 6. Динамика ЯЦИ хондроцитов промежуточной зоны суставного хряща на этапах эксперимента

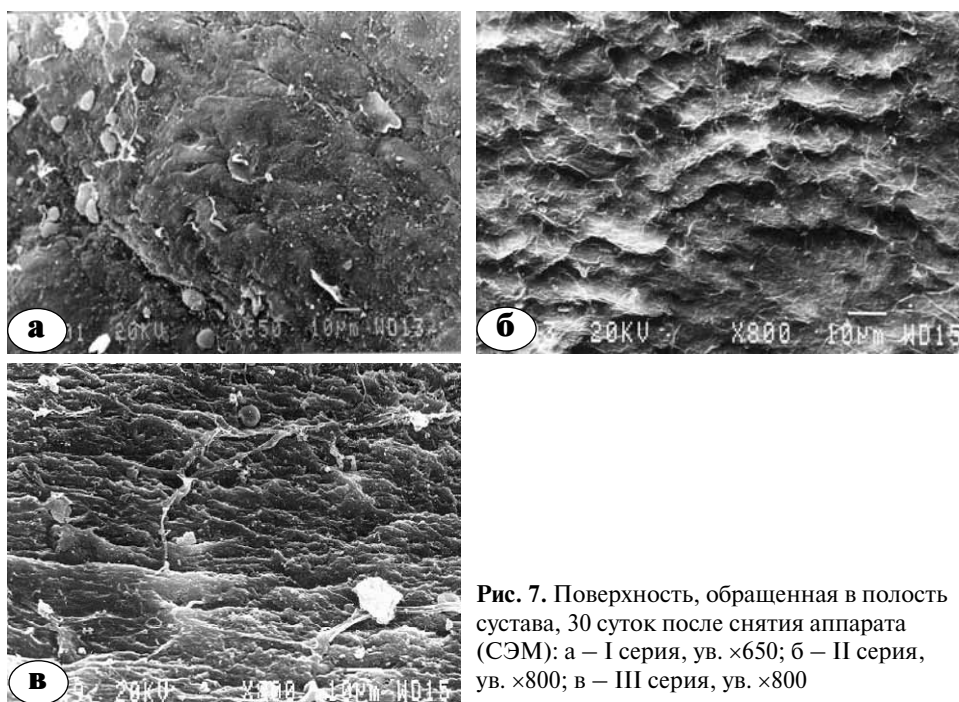


Рис. 7. Поверхность, обращенная в полость сустава, 30 суток после снятия аппарата (СЭМ): а – I серия, ув. $\times 650$; б – II серия, ув. $\times 800$; в – III серия, ув. $\times 800$

Выводы

1. При удлинении голени в суставном хряще мышечков бедра выявлены структурно-функциональные изменения реактивного и/или деструктивно-репаративного характера, степень которых зависит от режима distraction.

2. Деструктивные изменения имеют очаговый характер и проявляются разволокнением поверхностной зоны, гибелью и деструкцией части хондроцитов, снижением толщины хряща, численной и объемной плотности клеток

поверхностной и глубокой зон. Наиболее интенсивно деструктивные изменения выражены при 4-кратной ручной distraction.

3. Репаративная регенерация хряща происходит за счет активации пролиферативных и биосинтетических процессов, различно выраженных при разных режимах distraction в зависимости от степени повреждения. При 4-кратной дробности distraction более выражены пролиферативные процессы, при 60-кратной – биосинтетические.

4. Высокодобрная автодистракция с темпом 1 мм позволяет снизить травматизацию смежных суставов и обеспечивает высокую эффективность адаптационных реакций, направленных на восстановление структуры суставного хряща.

5. Сопоставительный анализ комплекса количественных параметров на тканевом и клеточном уровнях структурной организации показал, что автодистракция с темпом 3 мм по сравнению с ручной дистракцией (1 мм за 4 приема) является менее травматичной для суставного хряща и обеспечивает высокую эффективность адаптационных реакций, направленных на восстановление его структуры, при этом значительно (на 18 суток) сокращается срок эксперимента.

Литература

1. Гайдышев, И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник / И.П. Гайдышев. — СПб. : Питер, 2001. — 752 с.
2. Данилов, Р.К. Гистологические основы регенерации тканей опорно-двигательного аппарата / Р.К. Данилов [и др.] // Ортопедия, травматология и протезирование. — 2000. — №2. — С. 102.
3. Кормильченко, В.В. Количественные гистоморфометрические характеристики изменений суставного хряща головки бедренной кости у пожилых людей и при коксартрозе / В.В. Кормильченко, Л.О. Анисимова, Г.И. Нетылько // 13 научно-практическая конференция SICOT : тезисы докладов. — СПб., 2002. — С. 69.
4. Модяев, В.П. Морфология суставного хряща в норме и после местного воздействия ионизирующей радиации : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Модяев В.П. — М., 1983. — 36 с.
5. Пат. 2397472 РФ, МПК8 А61 В 6/00. Способ подготовки образцов биологических тканей для исследования в сканирующем электронном микроскопе / Силантьева Т.А., Горбач Е.Н., Ирьянов Ю.М., Ступина Т.А., Варсегова Т.Н. ; заявитель и патентообладатель ФГУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий». — № 2008150910; опубл. 20.08.2010, Бюл. № 23.
6. Редько, К.Г. Количественная морфометрия в диагностике ранних стадий остеоартроза (экспериментальное исследование) / К.Г. Редько, Л.О. Анисимова, Г.И. Нетылько // 13 научно-практическая конференция SICOT : тезисы докладов. — СПб., 2002. — С. 130.
7. Стецула, В.И. Основы управляемого чрескостного остеосинтеза / В.И. Стецула, В.В. Веклич. — М. : Медицина, 2003. — 224 с.
8. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение / под. ред. В.Н. Павловой, Г.Г. Павлова, Н.А. Шостак, Л.И. Слуцкого. — М. : Медицинское информационное агентство, 2011. — 552 с.
9. Шевцов, В.И. Оперативное удлинение нижних конечностей / В.И. Шевцов, А.В. Попков. — М. : Медицина, 1998. — 192 с.
10. Herzenberg, J.E. Knee range of motion in isolated femoral lengthening / J.E. Herzenberg [et al.] // Clin. Orthop. — 1994. — N 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, N 4. — P. 333–338.
12. Motmans, R. Knee mobility in femoral lengthening using Ilizarov's method / R. Motmans, J. Lammens // Acta Orthop. Belg. — 2008. — Vol. 74. — P. 184–189.
13. Nakamura, E. Knee cartilage injury after tibial lengthening. Radiographic and histological studies in rabbits after 3–6 months / E. Nakamura, H. Mizuta, K. Takagi // Acta Orthop. Scand. — 1995. — Vol. 66, N 4. — P. 313–316.
14. Shyam, A.K. Leg lengthening by distraction osteogenesis using the Ilizarov apparatus: a novel concept of tibia callus subsidence and its influencing factors / A.K. Shyam [et al.] // Indian J. Orthop. — 2009. — Vol. 33, N 6. — P. 1753–1759.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ступина Татьяна Анатольевна – к.б.н. старший научный сотрудник

E-mail: StupinaSTA@mail.ru;

Щудло Михаил Моисеевич – д.м.н. ведущий научный сотрудник.