

## **Световая и сканирующая электронная микроскопия суставного хряща при автоматическом удлинении голени**

**Т.А. Ступина, М.М. Щудло, С.А. Ерофеев**

## ***Light and scanning electron microscopy of articular cartilage in automatic leg lengthening***

**T.A. Stoupina, M.M. Chtchoudlo, S.A. Yerofeyev**

Государственное учреждение

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)

Методами световой микроскопии полутонких срезов, сканирующей электронной микроскопии, компьютерной морфо- и стереометрии был исследован суставной хрящ наружных мыщелков бедренной кости 12 собак — 9 опытных и 3 интактных (контроль). В опытной серии после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей в течение 4 недель осуществляли дозированное удлинение правой голени с темпом 1 мм в день (с 8 до 20 часов) за 60 приемов — автодистракция. Исследование проводили через 28 дней дистракции, 30 дней фиксации, месяц после снятия аппарата. Установлено, что изменения структуры суставного хряща при дозированном удлинении голени состоят в деструкции поверхностной зоны хряща. Степень выраженности изменений прямо связана с длительностью аппаратного этапа эксперимента. Полученные результаты согласуются с литературными данными о трофическом влиянии функциональной нагрузки на суставной хрящ и подтверждают, что динамические нагрузки являются необходимым условием сохранения структурной организации суставного хряща.

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

The articular cartilage of femoral lateral condyles in 12 dogs (9 experimental and 3 intact - control) was studied using the methods of light microscopy of half-thin sections, scanning electron microscopy, computer morpho- and stereometry. In the experimental series graduated lengthening of right leg using autodistraktion by 1 mm per day (from 8 a.m. to 20 p.m.) for 60 times was performed during 4 weeks after closed flexion osteoclasis of leg bones. The study was made after 28 days of distraction, 30 days of fixation, in a month after fixator removal. It was established that the changes of articular cartilage structure in graduated leg lengthening consisted in destruction of the cartilage superficial zone. The degree of change manifestation is directly connected with the duration of experimental fixator-on stage. The results obtained are consistent with the data of literature about trophic influence of functional load on articular cartilage, and they confirm the fact that dynamical loads are necessary for maintenance of articular cartilage structural organization.

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

### **ВВЕДЕНИЕ**

В связи с широким применением в ортопедии и травматологии метода дистракционного остеосинтеза важное место занимает проблема сохранения функциональных возможностей суставов, так как ограничение движений, если оно длительно, влечет за собой развитие деструктивных процессов в суставном хряще [6, 13, 17].

Кроме того, при удлинении конечности, в суставах, смежных с удлиняемым сегментом, всегда создается дополнительное давление [5], которое влечет за собой целый комплекс изменений: понижение концентрации протеогликанов в матриксе, уменьшение массы хрящей [16]. Одним из моментов, обуславливающих эти метаболические нарушения, является отсутствие в неподвижном суставе перемешивания синовиальной жидкости, приводящее к ослаблению

трофических потенциалов хряща [8].

Структура поверхностной зоны суставного хряща, непосредственно контактирующая с синовиальной жидкостью, привлекает наибольшее внимание исследователей [8, 14, 15]. Суставная поверхность рассматривается не как инертный бесструктурный слой, а как подвижная динамическая структура, выполняющая определенную роль в механизме трения [8].

Работы по изучению морфологии суставного хряща в условиях дозированного удлинения голени малочисленны [4, 9, 10].

Учитывая вышеизложенное, целью настоящего исследования явилось изучение рельефа суставной поверхности и гистоморфометрических характеристик хряща в условиях автоматического удлинения голени.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследован суставной хрящ наружных мыщелков бедренной кости 12 собак – 9 опытных и 3 интактных (контроль). В опытной серии после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей в течение 4 недель осуществляли дозированное удлинение правой голени аппаратом Илизарова с автоматическим приводом с темпом 1 мм в день (с 8 до 20 часов) за 60 приемов. Исследования проводили через 28 дней distraction, 30 дней фиксации, 30 дней после снятия аппарата.

Визуально оценивали состояние суставных поверхностей. Для световой микроскопии образцы хряща после альдегидно-осмиевой фиксации дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, заключали в аралдит. Для получения репрезентативных препаратов при резко выраженной вертикальной анизоморфии суставного хряща кусочки ориентировали так, чтобы плоскость среза была перпендикулярна суставной поверхности. Полутонкие срезы толщиной 0,5-1,0 мкм готовили на ультратоме "Nova" фирмы LKB (Швеция) и окрашивали метиленовым синим или метиленовым синим-основным фуксином [11]. Микропрепараты исследовали на фотомикроскопе фирмы "Opton" (Германия) с аппаратно-программным комплексом "ДиаМорф" (Москва). В программах той же фирмы изображения оцифровывали и морфометрировали. Измерения проводили в микро-

метрах после предварительной геометрической калибровки по оцифрованной с тем же увеличением шкале объект-микрометра. При оценке объемных отношений структур исходили из принципа A.Delesse (1847)  $VV_i = AA_i$  [7]. Определяли высоту ( $h$ ) хряща и  $h$  поверхностной зоны, в поле зрения подсчитывали число следов хондроцитов, площади их и межклеточного вещества, рассчитывали объемную ( $VV_{хц}$ ) и численную ( $NA_{хц}$ ) плотности всех хондроцитов, численную плотность пролиферировавших хондроцитов ( $NA_{пхц}$ ) и величину их пула – выраженное в процентах отношение  $NA_{пхц}/NA_{хц}$  [2]. 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 по W-критерию Вилкоксона (для параметров –  $VV_{хц}$ ,  $NA_{пхц}$ ) и критерию Стьюдента (для параметров –  $h$  хряща,  $h$  поверхностной зоны) [1, 3, 12].

**Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) материал дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали в камфене<sup>2</sup>, высушивали на воздухе, напыляли серебром, изучали в микроскопе "JSM-840" (исследовано 48 сканограмм).**

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании суставного хряща интактных животных макроскопически отмечали блестящие гладкие суставные поверхности жемчужно-белого цвета.

При изучении в СЭМ рельеф поверхности суставного хряща имел регулярную волнистость (рис. 1, а) и соответствовал описанной в литературе стереоультраструктуре интактной суставной поверхности мыщелков бедренной кости [8, 15].

При светооптическом исследовании отчетливо выражена зональная структура суставного хряща. Присутствовала бесклеточная пластинка (lamina splendens), межклеточное вещество поверхностной зоны было гомогенным.

Клетки продолговатой формы располагались в четко выраженных лакунах, вытянутых по направлению хода волокон, параллельно поверхности хряща (рис. 1, б).

В средней зоне наблюдались многочисленные хондроциты округлой формы, изогенные группы клеток. Увеличена интенсивность окраски межклеточного вещества вокруг изогенных групп (территориальный матрикс).

Базальная зона была относительно бедна хондроцитами, которые располагались колон-

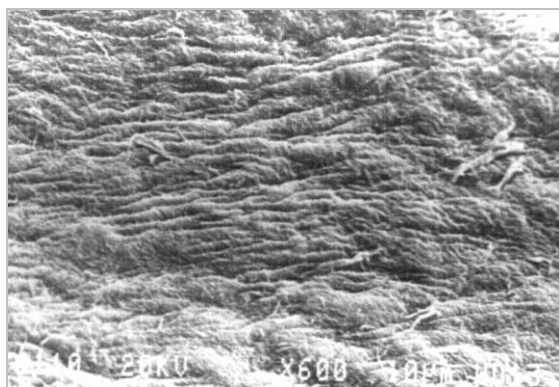
ками, выявлялись гипертрофированные клетки. Базофильная линия (tidemark) извилистая, непрерывная, отчетливо выражена.

**К концу distraction** макроскопически суставной хрящ был жемчужно-белого цвета, местами шероховатый. При изучении в СЭМ отмечали углубления, вдавления, неровности суставной поверхности, на отдельных участках отсутствовала бесклеточная пластинка (рис. 2, а).

При количественном морфологическом исследовании выявлено уменьшение высоты суставного хряща в среднем на 26 % по сравнению с контролем (табл. 1). Сохранялась зональная структура, за исключением разрушения бесклеточной пластинки.

<sup>1</sup> Удостоверение № 49/96 на рац. предложение. Способ оценки действия биологически активных веществ на гистологических препаратах суставного хряща / С.Н. Асонова, Г.Н. Филимонова (РФ), РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова.

<sup>2</sup> Удостоверение № 32/2002г. на рац. предложение. Способ высушивания биологических объектов для исследования методом сканирующей электронной микроскопии / Н.С. Мигалкин, Е.А. Наумов, Н.К. Чикорина, Е.В. Осипова, Р.Ю. Очеретина (РФ), РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова.



а

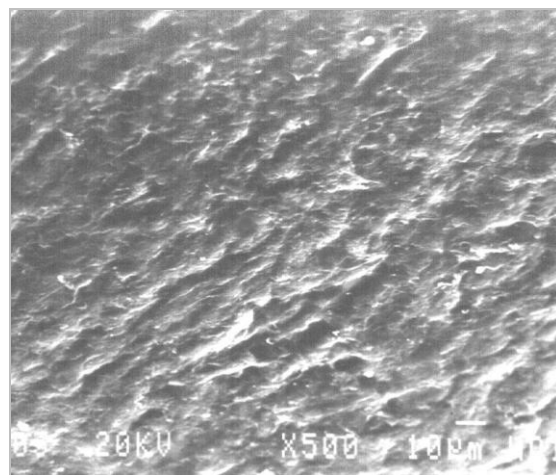


б

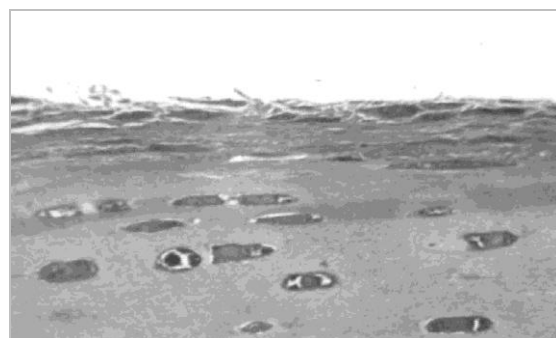
Рис. 1. Суставной хрящ: а - поверхность, обращенная в суставную полость. СЭМ. Увеличение 600; б – поверхностная зона, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Увеличение 500

В поверхностной зоне в части наблюдений отмечали деструктивные изменения: гибель отдельных клеток, нарушение гомогенности межклеточного вещества, появление зернистости, разволокнение суперфициальной 1/3 поверхностной зоны (рис. 2, б). 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 отмечено увеличение количества двух-, четырехчленных изогнутых групп, что косвенно указывало на повышение пролиферативной активности клеток. Величина пула пролиферировавших хондроцитов на 24 % выше контроля (табл. 1).



а



б

Рис. 2. Суставной хрящ: а - поверхность, обращенная в суставную полость. СЭМ. Увеличение 500; б – поверхностная зона, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Увеличение 500

В базальной зоне было отчетливо выражена базофилия территориального матрикса, что косвенно свидетельствовало о повышении функциональной активности хондроцитов. Базофильная линия не нарушена.

Через месяц фиксации суставной хрящ был матовый, местами истончен, с бледно-фиолетовыми пятнами.

При изучении в СЭМ изменения рельефа суставной поверхности еще более выражены: отмечали появление очагов разволокнения, многочисленные вскрытые лакуны хондроцитов как пустые, так и с обнаженными клетками (рис. 3, а).

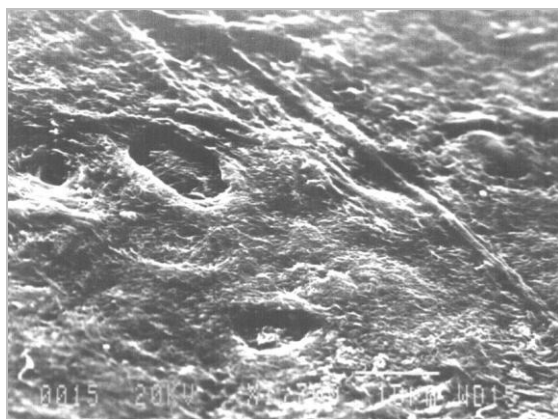
Таблица 1

Количественные характеристики хрящевой ткани суставной выстилки бедренной кости при автоматическом удлинении голени

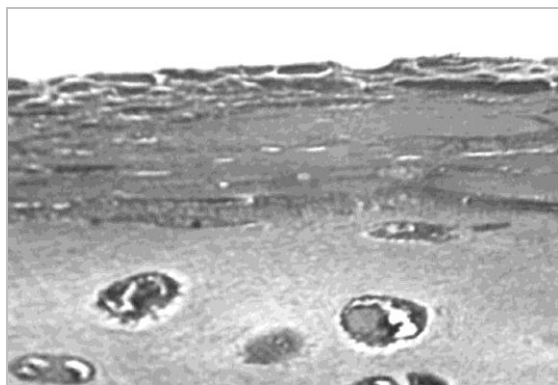
| Параметры                        | Контроль | Срок эксперимента |                |         |
|----------------------------------|----------|-------------------|----------------|---------|
|                                  |          | Д 28              | Ф 30           | БА 30   |
| VVхц (% , М)                     | 9        | 5                 | 8,23           | 8,38    |
| NA <sub>хц</sub> (М±m)           | 6,1±0,79 | <b>3,8±0,7</b>    | 5,9±0,5        | 5,3±0,6 |
| h поверхн. зоны хряща (мкм, М±m) | 105±2    | <b>63±0,6</b>     | <b>90±1,2</b>  | 100±1,5 |
| h хряща (мкм, М±m)               | 475±1,3  | <b>356±1,5</b>    | <b>392±2,1</b> | 464±6,5 |
| Величина пула пхц (%)            | 29       | 53                | 50             | 57      |

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные различия с контролем ( $p < 0,05$ ).

При количественном исследовании микропрепаратов наблюдалось достоверное ( $p < 0,05$ ) уменьшение высоты хряща на 18 % по сравнению с контролем (табл. 1). Отсутствовала бесклеточная пластинка, была нарушена гомогенность межклеточного вещества, выявлены участки разволокнения 2/3 поверхностной зоны (рис. 3, б). Некоторые хондроциты отличались большими размерами и округлой формой (рис. 3, б).



а



б

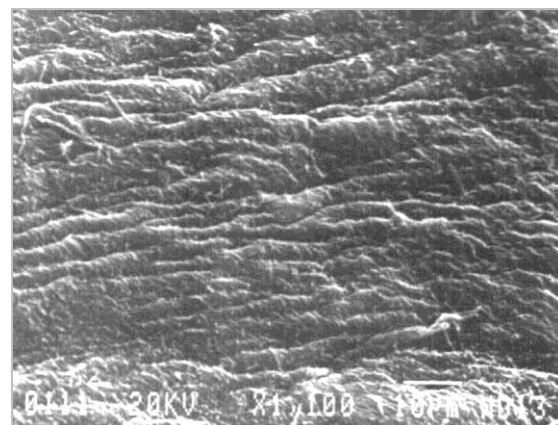
Рис. 3. Суставной хрящ: а - поверхность, обращенная в суставную полость. СЭМ. Увеличение 1700; б - поверхностная зона, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Увеличение 500

В средней и базальной зонах численная плотность хондроцитов на 7 % меньше, чем в контроле. Обнаружено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение объемной плотности хондроцитов по сравнению с предыдущим сроком эксперимента, различия с контролем по этому параметру недостоверны ( $p > 0,05$ ). Сохраняется повышенное количество молодых изогенных групп по сравнению с контролем. Об активной пролиферации хондроцитов свидетельствует их близкое расположение в изогенных группах, отсутствие сформированного территориального матрикса вокруг клеток. Величина пула пролиферирующих хондроцитов на

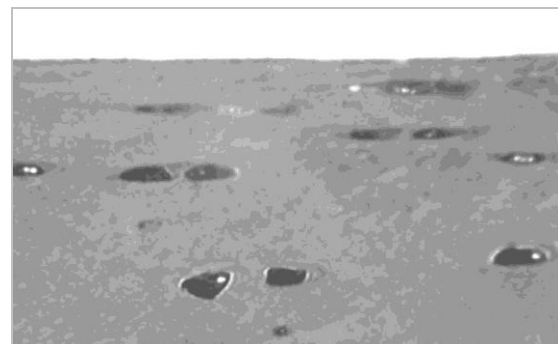
21 % выше контроля (табл. 1).

Через 30 дней после снятия аппарата отмечали блестящие гладкие суставные поверхности жемчужно-белого цвета. При изучении в СЭМ патологические очаги не выявлены (рис. 4, а).

При количественном исследовании высота хряща была увеличена на 24 % по сравнению со сроком 28 дней дистракции и существенно не отличалась от контроля ( $p > 0,05$ ). Структура не нарушена, восстановлена бесклеточная пластинка, выявлялась гомогенность межклеточного вещества поверхностной зоны (рис. 4, б).



а



б

Рис. 4. Суставной хрящ: а - поверхность, обращенная в суставную полость. СЭМ. Увеличение 1100; б - поверхностная зона, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Увеличение 500

В средней зоне сохранялось повышенное количество двух- и четырехчленных изогенных групп клеток. Величина пула пролиферирующих хондроцитов составляла 57 %. Морфометрический анализ выявил, что объемная и численная плотность хондроцитов по зонам существенно ( $p > 0,05$ ) не отличалась от контроля (табл. 1). Базофильная линия была отчетливо выражена, непрерывна.

## ВЫВОДЫ

Изменения структуры суставного хряща при удлинении голени состоят в деструкции поверхностной зоны хряща. Наблюдаемое уже на

этапе дистракции в автоматическом режиме повышение пролиферативной и биосинтетической активности хондроцитов в средней и ба-

зальной зонах направлено на пластическое обеспечение репарации поверхностной зоны [6].

Через месяц после снятия аппарата возврат к двигательному стереотипу способствовал реституции суставной поверхности.

Полученные результаты согласуются с литературными данными о трофическом влиянии функциональной нагрузки на суставной хрящ [6, 16] и подтверждают, что динамические нагрузки являются необходимым условием сохранения структурной организации суставного хряща.

Примененный комплекс методов световой

микроскопии полутонких срезов, сканирующей электронной микроскопии, компьютерной морфо- и стереометрии позволил объективно оценить характер и объем изменений рельефа суставной поверхности, их связи с другими зонами хряща.

Полученные сведения о динамике развития деструктивных изменений хрящевой ткани указывают на необходимость учитывать состояние суставного хряща при удлинении голени и предупреждать развитие в нем патологических процессов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов, Г.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблчанский, В.Г. Губенко. - М.: Медицина, 1981. - 189с.
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 / И.П. Гайдышев. - СПб.: Питер, 2001. - 752с.
4. Комплексное исследование хрящевой ткани при иммобилизации сустава / Л.И. Грачева, С.Н. Асонова, А.А. Утенькин, С.Я. Зевенко // Материалы школы "Биология опорно-двигательного аппарата". - Харьков, 1992.- С.55-56.
5. Грачева, Л.И. Механохимия суставного хряща при коррекции патологии опорно-двигательного аппарата: Дис... канд. хим. наук. - Курган, 1992. - 154с.
6. Хрящ / В.Н. Павлова, Т.Н. Копьева, Л.И. Слуцкий, Г.Г. Павлов. - М.: Медицина, 1988. - 320 с.
7. Непомнящих, Л.М. Морфометрия и стереология гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушников, Г.И. Непомнящих. - М.: Наука, 1986. - 159 с.
8. Павлова, М.Н. Ультраструктура трущихся поверхностей в суставе / М.Н. Павлова, Б.Н. Куманин // Арх. анатомии. - 1983. - №8. - С. 38-42.
9. Морфология суставного хряща при последовательном дистракционно-компрессионном остеосинтезе голени / А.В. Попков, Т.А. Ступина, С.А. Ерофеев и др. // Гений ортопедии. - 2000. - № 3. - С. 25-29.
10. Ступина, Т.А. Морфологическая характеристика суставного хряща при удлинении голени в разное время суток / Т.А. Ступина // Вестник РГМУ. - 2002. - № 1. - С. 156.
11. Уикли, Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. - М.: Мир, 1975. - 324 с.
12. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. - М.: Медицина, 1975. - 295 с.
13. Биохимические и биомеханические изменения суставного хряща при многоэтапном удлинении конечности у собак / В.И. Шевцов, С.Н. Лунева, А.А. Ларионов и др. // Гений ортопедии. - 1996. - № 2-3. - С. 147-148.
14. Clarke, I.C. Articular cartilage: a review and scanning electron microscope study. I. The interterritorial fibrillar architecture / I.C. Clarke // J. Bone Jt. Surg. - 1971. - Vol. 53-B, N 3. - P. 732-750.
15. Candolin, T. Surface changes in the articular cartilage of rabbit knee during immobilization. A scanning electron microscopic study of experimental osteoarthritis / T. Candolin, T. Videman // Acta Path. Microbiol. Scand. - 1980. - Vol. 88, N 5. - P. 291-297.
16. Proteoglycan alterations in rabbit knee articular cartilage following physical exercise and immobilization / M. Tammi, A.-M. Saamanen, A. Jauhiainen et al. // Connect. Tiss. Res. - 1983. - Vol. 11, N 1. - P. 45-55.
17. Trias, A. Effect of persistent pressure on the articular cartilage / A. Trias // J. Bone Jt. Surg. - 1971. - Vol. 2. - P. 376-386.

Рукопись поступила 03.12.03.