

Оценка регенераторных возможностей суставного хряща при различных условиях удлинения смежного сегмента конечности в эксперименте

Т.А. Ступина, М.М. Щудло

Estimation of articular cartilage regeneration potentials under different conditions of experimental lengthening of limb adjacent segment

T.A. Stupina, M.M. Chtchoudlo

Федеральное государственное учреждение
«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий», г. Курган
(и.о. генерального директора — д.м.н., профессор А.Н. Дьячков)
ПНИЛ «Управляемые гисто- и органогенезы» Курганского филиала ЮУНЦ РАН

Представлены результаты изучения репаративной регенерации суставного хряща при различных условиях удлинения смежного сегмента конечности: при «веерной» дистракции (1 серия) и при автодистракции с темпом 3 мм (2 серия). При изученных режимах удлинения конечности в суставном хряще выявлены структурно-функциональные изменения реактивного и/или деструктивно-репаративного характера, степень которых зависит от величины разового удлинения и сроков дистракции и фиксации конечности в аппарате. Интенсивность деструктивных изменений была выше при «веерной» дистракции. Основным фактором, обеспечивающим возможность обратимости изменений, являлась активизация пролиферативных и биосинтетических процессов. В 1 серии к концу эксперимента (93 суток) в суставном хряще пролиферация сочеталась с уменьшением числа секреторно-активных клеток, толщина хряща увеличивалась в меньшей степени, чем в сравниваемой серии. Во 2 серии на этом этапе (срок эксперимента 75 суток), хотя и регенерация имела незавершенный характер, но динамика изучаемых параметров указывала на усиление и биосинтетической, и пролиферативной активности клеток, что свидетельствовало о возможности в дальнейшем реституции суставного хряща.

Ключевые слова: суставной хрящ, удлинение конечности, репаративная регенерация.

The results are presented concerning studying articular cartilage reparative regeneration under different conditions of adjacent limb segment lengthening: by the technique of "fan-like" distraction (series 1) and using automatic distraction with 3-mm rate (series 2). While using the modes of limb lengthening studied the structural-and-functional changes of reactive and/or destructive-and-reparative character were revealed in articular cartilage the degree of which depends on the amount of one-time lengthening, as well as on the periods of limb distraction and fixation with the device. The intensity of destructive changes was higher for "fan-like" distraction. Activation of proliferative and biosynthetic processes was the main factor which provided for the possibility of change reversibility. In series 1, by the end of the experiment (93 days) proliferation in the articular cartilage was associated with the decrease of secretory active cells in number, cartilage thickness increased to a less extent than in the comparable series. In series 2, at this stage (experiment period 75 days), though regeneration was incomplete, the dynamics of the studied parameters indicated to intensifying of both biosynthetic and proliferative activity of cells, thereby evidencing the possibility of articular cartilage subsequent restitution.

Keywords: articular cartilage, limb lengthening, reparative regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое внедрение в клиническую практику чрескостного дистракционного остеосинтеза вызывает необходимость углубленного изучения процессов, происходящих в смежных суставах, поскольку сохранение их функциональных возможностей имеет большое значение для медицинской, социальной реабилитации и улучшения качества жизни пациентов.

Реакция суставов на удлинение конечности аппаратом Илизарова отмечалась в клинике многими авторами [3, 4, 9, 12, 14]. В процессе дистракционного остеосинтеза вынужденное ограничение функции удлиняемой конечности

сопровождается изменением распределения нагрузки на суставные поверхности, изменением состояния периферических нервов, сосудистого русла, что влечет нарушение трофики костной ткани и компонентов сустава [2, 3, 5, 6].

Среди условий, влияющих на регенераторный процесс всех тканей удлиняемой конечности, важное место занимает оптимальный темп и ритм дистракции. По мнению Nakamura E. et al. (1995), увеличение частоты удлинения может предотвратить повреждения смежных суставных хрящей [15].

Современные социально-экономические усло-

вия диктуют необходимость внедрения в практику новых, более современных технологий, позволяющих сокращать сроки пребывания пациентов в стационаре, обеспечивающих оптимальные условия для репаративного остеогенеза при минимальном риске послеоперационных осложнений. Дальнейшее развитие этого направления требует изучения состояния физиологических резервов и

адаптивности тканей удлиняемой конечности в зависимости от режима дистракции, в том числе адекватной оценки реактивных изменений и репаративных возможностей суставного хряща.

Целью работы явилось изучение морфо-функционального состояния суставного хряща при различных условиях удлинения смежного сегмента конечности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – суставной хрящ наружного мыщелка бедра 3 интактных и 17 опытных собак, которым удлиняли голень аппаратом Илизарова на 28-30 мм. Эксперимент выполнен д.м.н. С.А. Ерофеевым. В 1-й серии (n=8) в течение первой недели дистракцию проводили по задней паре стержней шарнирных узлов, следующую неделю – по передней паре, в дальнейшем с аналогичным чередованием. При этом режим дистракции был 2,0 мм за 4 приема на резьбовых стержнях (по задней поверхности кости темп составлял 1,42 мм, по передней – 0,57 мм). Через 2 недели дистракции диастаз по передней и задней поверхностям кости составлял 14 мм, на кость темп дистракции равнялся 1 мм. К концу 28-дневного периода такой «веерной» дистракции диастаз между костными отломками имел высоту 28 мм. Предлагаемый способ (Патент №2289348 РФ) позволял осуществлять не только стимуляцию костеобразования, но и использовать щадящий режим для мягких тканей, так как мышцы, расположенные с противоположных сторон, имели возможность периодического отдыха. Во 2-й серии (n=9) дистракцию осуществляли в течение 10 суток с темпом 3,0 мм за 180 приемов (автодистракция). Этапы эксперимента: конец дистракции, 30 суток фиксации, 30 суток после снятия аппарата.

Содержание и эвтаназию животных проводили в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Полутонкие эпоксидные срезы большой

площади (6-8 мм²), окрашенные метиленовым синим или метиленовым синим и основным фуксином по Уикли, изучали на большом исследовательском фотомикроскопе фирмы "Opton" (Германия) с аппаратно-программным комплексом "ДиаМорф" (Москва) для оцифровки изображений. Их репрезентативную выборку для стереологического анализа получали путем ввода полей зрения параллельными рядами, исключая взаимоперекрывание, с каждого 20-го препарата. Выборку формировали тотально, при этом количество анализируемых структур, целиком попавших в поле зрения, было максимальным. Определяли толщину (**h**, мкм) хряща, в поле зрения (площадь – 9616,53 мкм²) численную (**NA_{хц}**) плотность хондроцитов в ткани (во всех зонах хряща), численную плотность клеток в составе изогенных групп – пролиферировавших хондроцитов (**NA_{пхц}**) и величину их пула (**ВППХц**) – выраженное в процентах отношение $NA_{пхц}/NA_{хц}$. В качестве контроля морфометрировали суставной хрящ интактных животных.

Анализ цифрового материала был проведен методами описательной статистики. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента и критерию Вилкоксона для независимых выборок с помощью программы AtteStat, версия 1.0 [1] в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Рельеф суставной поверхности изучали в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) "JSM-840" (Jeol, Япония): материал дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали в камфене (3,3-диметил-2-метиленбицикло[2,2,1]гептан – ГОСТ 15039-76), высушивали на воздухе, напыляли серебром.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании суставного хряща интактных животных рельеф суставной поверхности имел регулярную волнистость и соответствовал описанной в литературе интактной суставной поверхности мыщелков бедренной кости [7, 10]. На полутонких срезах все зоны хряща имели обычное строение, деструктивные изменения не выявлены.

К концу дистракции в обеих сериях отмеча-

ли деструкцию суставной поверхности в виде очагов разволокнения (рис. 1). Обнаружены открытые лакуны хондроцитов, как пустые, так и с обнаженными на поверхность клетками.

На полутонких срезах определялось нарушение гомогенности межклеточного вещества (рис. 2), что свидетельствовало о минимальном содержании гликозаминогликанов в матриксе хряща.

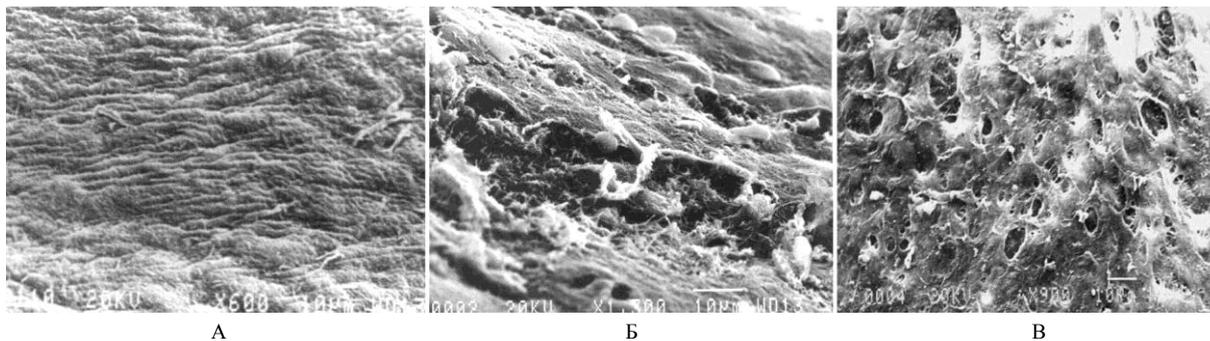


Рис. 1. СЭМ, поверхность, обращенная в полость сустава: А – контроль, увеличение 600, Б – 1 серия - увеличение 1300, В - 2 серия – увеличение 900. Конец периода distraction

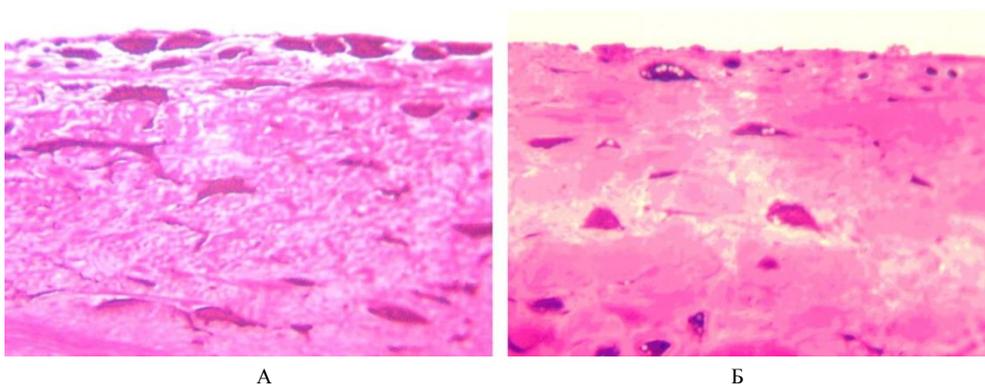


Рис. 2. Конец периода distraction. Поверхностная зона, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. – 40, ок. – 12,5х: А – 1 серия; Б – 2 серия

В очагах разволокнения хондроциты имели пикнотичные ядра, вакуолизированную цитоплазму. Наиболее интенсивно деструктивные изменения были выражены в 1 серии, в которой в отдельных наблюдениях очаги разволокнения захватывали часть промежуточной зоны, наблюдалось формирование узур. В обеих сериях деструктивные изменения имели мозаичный характер.

Сходные картины деструктивных изменений суставной поверхности наблюдали через 30 суток фиксации. Для хондроцитов промежуточной и глубокой зон характерны два типа изменений. Деструктивные – хондроциты находились в состоянии деструкции, отмечалось значительное количество пустых лакун, формировались перичеллюлярные очаги распада ткани. В части наблюдений 1 серии отмечено нарушение целостности базофильной линии, проникновение сосудов в хрящ.

Параллельно в хряще развивались реактивные изменения.

Одни хондроциты пролиферировали, максимальные значения величины пула пролиферировавших хондроцитов на всех этапах эксперимента отмечены в 1-й серии (табл. 1), что может быть обусловлено более выраженной реактивной реакцией хондроцитов в ответ на действие механических факторов (компрессии) при данном режиме distraction, влияние такого механического воздействия на пролиферативную активность хондроцитов известно [8, 11, 13, 16]. Наибольшая частота встречаемости изогнутых групп клеток в обеих сериях наблюдалась в промежуточной зоне.

Необходимо также отметить наличие изогнутых групп клеток и в неповрежденных участках более глубоких слоев поверхностной зоны.

Другие хондроциты – окруженные гомогенным интенсивно окрашенным матриксом (рис. 3) – демонстрировали высокую биосинтетическую активность, отличались большими размерами, округлой формой, рыхлыми крупными ядрами, базофильной цитоплазмой. Такие клетки были отмечены во всех зонах хряща.

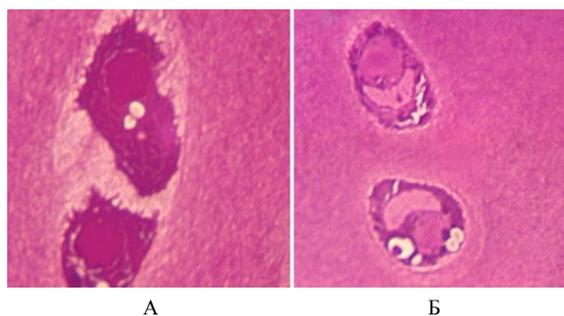


Рис. 3. Функционально активные хондроциты (фиксация 30 суток). Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. – 40; ок. – 12,5х: А – 1 серия, глубокая зона; Б – 2 серия, промежуточная зона

Повышение пролиферативной и биосинтетической активности хондроцитов регистрировали как признаки репаративных процессов.

Наблюдаемые изменения суставного хряща сопровождались изменениями и его количественных характеристик (табл. 1). К концу периода distraction толщина хряща в 1-й серии увеличивалась, что обусловлено дезорганизацией и

набуханием матрикса поверхностной зоны, а во 2-й серии была достоверно ($p < 0,001$) ниже нормы. Через 30 суток фиксации значения анализируемого параметра в 1 серии резко снижались, во 2 серии по сравнению с предыдущим сроком увеличивались. Через месяц после снятия аппарата в обеих сериях относительно предыдущего срока выявлено увеличение исследуемого параметра, по сравнению с контролем значения достоверно ($p < 0,001$) снижены.

Численная плотность хондроцитов к концу периода distraction снижена ($p < 0,05$), минимальные значения отмечены в 1 серии. К концу периода фиксации в 1 серии $NA_{хц}$ превышала контроль, во 2 серии сохранялись сниженные значения. После снятия аппарата в 1-й серии $NA_{хц}$ была ниже нормы, во 2 серии увеличивалась и была сопоставима с контролем.

Через месяц после снятия аппарата в обеих сериях деструктивные изменения в суставном хряще имели обратимый характер. При исследовании в СЭМ определялись обширные участки с регулярной волнистостью. На полутонких срезах восстанавливалась гомогенность межклеточного вещества поверхностной зоны (рис. 4). При этом сохранялись участки суставного хряща, в которых регенерация имела незавершенный характер, отсутствовала бесклеточная пластинка, определялись вскрытые клеточные лакуны.

В 1 серии к концу эксперимента (93 суток) пролиферация сочеталась с уменьшением числа секреторно-активных клеток, толщина хряща увеличивалась в меньшей степени, чем в сравниваемой серии. Во 2 серии на этом этапе (срок экспе-

римента 75 суток), хотя и регенерация имела незавершенный характер, но динамика морфометрируемых параметров указывала на усиление и биосинтетической, и пролиферативной активности клеток, что свидетельствовало о возможности в дальнейшем восстановления суставного хряща.

Таким образом, при данных условиях удлинения голени в суставном хряще наружного мыщелка бедра выявлены структурно-функциональные изменения реактивного и/или деструктивно-репаративного характера, степень которых зависит от величины разового удлинения и сроков distraction и фиксации конечности в аппарате. Интенсивность деструктивных изменений была выше при удлинении голени с темпом 2,0 за 4 приема. О включении механического компонента в патогенез свидетельствует локализация деструктивных изменений в участках высокой нагрузки (разволокнение поверхностной зоны хряща, проникновение сосудов в глубокую зону со стороны субхондральной кости).

В неповрежденных участках хондроциты демонстрировали реактивные изменения адаптивного характера, проявляющиеся активизацией пролиферативных и биосинтетических процессов, за счет которых происходила регенерация хряща. Выраженность процессов пролиферации и биосинтеза в суставном хряще при разных режимах distraction различна и зависит от степени повреждения. При удлинении конечности с темпом 2,0 мм в суставном хряще более выражены пролиферативные процессы, при автодистракции – биосинтетические.

Таблица

Количественные характеристики суставного хряща наружного мыщелка бедра при удлинении голени у собак

Параметры	Контроль	Срок эксперимента					
		Конец distraction		30 суток фиксации		30 суток без аппарата	
		1 серия	2 серия	1 серия	2 серия	1 серия	2 серия
h хряща (мкм, $M \pm m$)	475,5 \pm 1,3	549,6\pm2,1	375,7\pm1,8	336,5\pm3,8	439,5\pm1,8	382,3\pm1,4	446,8\pm1,6
$NA_{хц}$ ($M \pm m$)	6,1 \pm 0,79	4,69\pm0,38	5,78\pm0,51	6,63\pm0,56	4,9\pm0,48	5,77\pm0,59	6,67\pm0,49
ВПШХц	14,5	32,29	22,1	29,9	29,5	27,53	23,7

Примечание: жирным шрифтом выделены достоверные различия с контролем, для параметров $NA_{хц}$ – по критерию Вилкоксона при ($p < 0,05$), h хряща – по критерию Стьюдента при ($p < 0,001$).

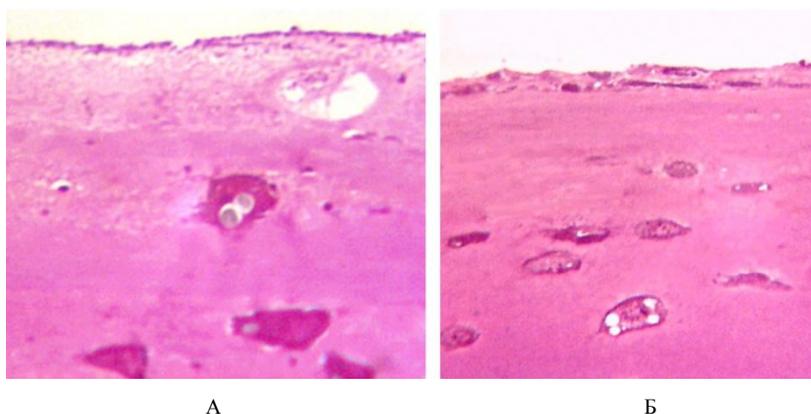


Рис. 4. Поверхностная зона через месяц после снятия аппарата. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином: А – 1 серия. Об. – 100ММ, ок. – 12,5 \times ; Б – 2 серия. Об. – 40, ок. – 12,5 \times

Разработанные и апробированные в эксперименте методики удлинения являются методом выбора. Методика «веерной» тракции отломков актуальна в тех случаях, когда при нарушении целостности кости, со стороны внедрения долата, происходит значительное разрушение костного вещества. Наблюдаемые при этом изменения суставного хряща необходимо учитывать в

клинической практике, создавая условия для предупреждения развития в нем патологического процесса. Высокодетальная автодистракция с темпом 3,0 мм позволяет снизить травматизацию смежных суставов и обеспечивает высокую эффективность адаптационных реакций, направленных на восстановление структуры суставного хряща.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдышев И. П. Анализ и обработка данных : спец. справочник / И. П. Гайдышев. СПб. : Питер, 2001. 752 с.
2. Грачева Л. И., Ерофеев С. А. Суставной хрящ в условиях варьирования дробности дистракции голени собак по Илизарову // Физиологические механизмы адаптации человека и животных : материалы II съезда физиологов Уральского региона. Свердловск, 1990. С. 135-136.
3. Дьячкова Г. В. Мышечно-фасциальный аппарат голени при удлинении ее по методу Илизарова в эксперименте // Лечение ортопедо-травматологических больных в стационаре и поликлинике методом чрескостного остеосинтеза, разработанным в КНИИЭКОТ : тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. : в 2-х ч. Курган, 1982. Ч. 2. С. 176-179.
4. Клинико-физиологические и морфологические характеристики адаптивной перестройки в мягкотканых структурах удлиняемой конечности / В. И. Калякина [и др.] // Значение открытий Г. А. Илизаровым общебиологических закономерностей в регенерации тканей : сб. науч. тр. Курган, 1988. Вып. 13. С. 63-70.
5. Стецула В. И., Веклич В. В. Основы управляемого чрескостного остеосинтеза. М. : Медицина, 2003. 224 с.
6. Удлинение нижних конечностей в автоматическом режиме / В. И. Шевцов [и др.] // Гений ортопедии. 1999. № 3. С. 20-24.
7. Хрящ / В. Н. Павлова [и др.]. М. : Медицина, 1988. 320 с.
8. Хэм А., Кормак Д. Гистология. М. : Мир, 1983. Т. 3. 293 с.
9. Шевцов В. И., Попков А. В. Оперативное удлинение нижних конечностей. М. : Медицина, 1998. 192 с.
10. Candolin T., Videman T. Surface Changes in the Articular Cartilage of Rabbit Knee during Immobilization. A Scanning Electron Microscopic Study of Experimental Osteoarthritis // Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. Pathology. 1980. Vol. 88. P. 291-297.
11. Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells / S. H. Elder [et al.] // J. Orthop. Res. 2000. Vol.18. P. 78-86.
12. Knee range of motion in isolated femoral lengthening / J. E. Herzenberg [et al.] // Clin. Orthop. Relat. Res. 1994. No 301. P. 49-54.
13. Knee joint reaction force during tibial diaphyseal lengthening : a study on a rabbit model / L. Yang [et al.] // J. Biomech. 2004. Vol. 37, No 7. P. 1053-1059.
14. Maffulli N., Nele U., Matarazzo L. Changes in knee motion following femoral and tibial lengthening using the Ilizarov apparatus : a cohort study // J. Orthop. Sci. 2001. Vol. 6, No 4. P. 333-338.
15. 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. Vol. 66, No 4. P. 313-316.
16. Rapid and large - scale formation of chondrocyte aggregates by rotational culture / K. S. Furukawa [et al.] // Cell Transplant. 2003. Vol. 12, No 5. P. 475-479.

Рукопись поступила 09.10.09.

Сведения об авторах:

1. Ступина Татьяна Анатольевна – ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий», старший научный сотрудник экспериментального отдела травматологии и ортопедии, к.б.н.;
2. Щудло Михаил Моисеевич – ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий», ведущий научный сотрудник научно-медицинского отдела восстановительного лечения, д.м.н.