

Оценка численности хондроцитов в суставном хряще при дистракционном остеосинтезе голени в комбинации с наkostной пластиной

Т.А. Ступина, М.А. Степанов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курган, Россия

Estimation of the chondrocyte number in the articular cartilage by combined distraction osteosynthesis of the tibia (Ilizarov apparatus and plating)

T.A. Stupina, M.A. Stepanov

Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan, Russia

Введение. Представлен анализ численности хондроцитов в суставном хряще мыщелков бедра и блока таранной кости при дистракционном остеосинтезе голени в комбинации с наkostной пластиной. **Материалы и методы.** Семи беспородным собакам удлиняли голень с использованием аппарата Илизарова и наkostной пластины с темпом 1 мм за 4 приема на 14–16 % от исходной длины сегмента. Этапы исследования: 30 и 90 суток фиксации пластиной. Гистоморфометрия проведена по полутонким срезам суставного хряща с помощью фотомикроскопа «Оптон» (Германия), АПК «ДиаМорф» (Москва) и программы «ВидеоТест-Мастер-Морфология». Определяли долю хондроцитов (N_{ch} , %), долю пустых лакун ($NN_{em.lac}$, %) и изогенных групп ($NN_{is.gr}$, %) в общем объеме выборки из 200 лакун. Контроль – суставной хрящ 5 интактных собак. **Результаты.** Суставной хрящ обеих суставных поверхностей сохранял зональное строение, отмечено нарушение гомогенности суперфициальной части поверхностной зоны, деструкция части хондроцитов. В суставном хряще мыщелков бедра через 30 суток фиксации значения N_{ch} ниже контроля на 5,74 %, в 2,3 раза увеличена $NN_{em.lac}$, значения $NN_{is.gr}$ снижались до 2,06 %. Через 90 суток фиксации значения N_{ch} снижены относительно контроля на 3,73 %. Сохранились низкие значения $NN_{is.gr}$ – 4,3 %, высокие значения $NN_{em.lac}$ – 27,54 %. В суставном хряще блока таранной кости через 30 суток фиксации N_{ch} ниже контроля на 1,98 %, в 1,5 раза увеличена $NN_{em.lac}$, $NN_{is.gr}$ снижалась до 4,7 % относительно контроля. Через 90 суток фиксации значения $NN_{em.lac}$ оставались на том же уровне, что и на предыдущем сроке эксперимента. Значения $NN_{is.gr}$ сопоставимы с контролем. **Заключение.** Апробированная методика дистракционного остеосинтеза голени в комбинации с наkostной пластиной является малотравматичной для смежных суставов. Сопоставительный анализ количественных параметров суставного хряща выявил, что наиболее уязвимым оказался суставной хрящ мыщелков бедра.

Ключевые слова: комбинированный остеосинтез, аппарат Илизарова, пластина, суставной хрящ, хондроциты, морфометрия

Introduction The number of chondrocytes in the articular cartilage of the femoral condyles and talus junction surface in the conditions of distraction osteosynthesis of the tibia with the Ilizarov apparatus combined with plating was estimated. **Material and methods** Seven dogs underwent tibial lengthening at a daily rate of 1 mm for 4 steps and to 14–16 % of the initial length of the segment with the use of the Ilizarov apparatus and plating. Stages of the study were days 30 and 90 in the fixation phase when only plating was left. Histomorphometry of semi-thin sections of the articular cartilage was carried out with the help of an *Opton* photomicroscope (Germany), *DiaMorf* software complex (Russia) and *VideoTest-Master* morphology program. The proportion of chondrocytes (N_{ch} , %), the proportion of empty lacunae ($NN_{em.lac}$, %), and isogenic groups ($NN_{is.gr}$, %) were determined in the total sample volume of 200 lacunae. A control group was articular cartilage of five intact dogs. **Results** The articular cartilage of both articular surfaces retained the zonal structure. Disorder in the homogeneity of the superficial part of the surface zone and destruction of a part of chondrocytes were noted. In the articular cartilage of the femoral condyles, the N_{ch} value was lower than in the control animals by 5.74 %. $NN_{em.lac}$ was increased 2.3 times while $NN_{is.gr}$ values decreased to 2.06 % in the femoral condyle articular cartilage after 30 days of fixation period with the plate. After 90 days of fixation, the N_{ch} values were lower with respect to the controls by 3.73 %. Low values of $NN_{is.gr}$ (4.3 %) and high values of $NN_{em.lac}$ (27.54 %) were maintained. In the articular cartilage of the talus, N_{ch} was lower than in the control group by 1.98 %; $NN_{is.gr}$ increased 1.5 times and $NN_{em.lac}$ decreased to 4.7 % relative to controls after 30 days of fixation. After 90 days, the value of $NN_{em.lac}$ remained at the same level as in the previous experiment stage. The values of $NN_{is.gr}$ were comparable with the control group. **Conclusion** The technique of distraction osteosynthesis of the tibia in combination with plating is of low traumatic effect on the adjacent joints. A comparative analysis of quantitative parameters of the articular cartilage revealed that the most vulnerable site was the articular cartilage of the femoral condyles.

Keywords: combined osteosynthesis, Ilizarov apparatus, plate, articular cartilage, chondrocytes, morphometry

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших проблем при удлинении конечности является нарушение функции смежных с оперированным сегментом суставов. Патологические изменения суставного хряща, в том числе при использовании метода управляемого чрескостного остеосинтеза, нередко осложняют лечение ортопедотравматологических больных [1]. В проведенных нами ранее исследованиях установлено, что при удлинении голени в суставном хряще смежных суставов наблюдаются изменения деструктивно-репаративного характера, степень выраженности которых зависит от условий удлинения [2, 3].

В суставном хряще количество хондроцитов едва достигает 2–3 % от общей массы. Соответственно и восстановление значительно снижается, пропорцио-

нально численности клеток. Хондроцитам принадлежит исключительная роль в поддержании состояния внеклеточного матрикса в процессах нормальной жизнедеятельности и развития дегенеративных заболеваний. Увеличение числа активно пролиферирующих и продуцирующих клеток – основной источник восстановительных процессов в суставном хряще [4].

Современные требования к качеству оказания медицинской помощи и комфортности лечения диктуют свои приоритеты, наиболее важными из которых являются качество жизни пациента и сокращение сроков стационарного лечения.

С целью сокращения периода нахождения пациента в аппарате и уменьшения частоты осложнений в экспе-

рименте апробирована методика дистракционного остеосинтеза голени в комбинации с наkostной пластиной [5].

Цель. Провести анализ численности хондроцитов

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на 7 беспородных собаках обоего пола, массой 12–15 кг в возрасте от 1 года до 5 лет. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию проводили в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник (приказ МЗ СССР №755 от 1977 г.). Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом «РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова».

Всем животным в условиях операционной под общим наркозом выполняли чрескостный остеосинтез костей правой голени аппаратом Илизарова. На границе средней и верхней трети голени осуществляли остеотомию берцовых костей. Через небольшой дополнительный разрез мягких тканей на уровне проксимального метафиза с медиальной поверхности сегмента устанавливали наkostную пластину оригинальной конструкции [5] на диафиз большеберцовой кости, предварительно отслоив мягкие ткани от кости. Конструкцию располагали от верхней до нижней трети голени, без контакта со спицами аппарата Илизарова. К проксимальному отломку большеберцовой кости пластину крепили при помощи 3-х винтов, а к дистальному ее фиксировали при помощи винта, проведенного только через верхнюю часть паза. Винт в пазе плотно к пластине не притягивали, чтобы он имел возможность скользить по пазу во время дистракции. Удлинение осуществлялось в ручном режиме с темпом 1 мм в сутки за 4 приема на 14–16 %

в суставном хряще мыщелков бедра и блока таранной кости при дистракционном остеосинтезе голени в комбинации с наkostной пластиной.

от исходной длины сегмента. Дистракцию продолжали в течение 21–28 суток в зависимости от длины голени. В день окончания дистракции аппарат снимали. Формирующийся регенерат располагался на уровне сплошной части пластины, что препятствовало возникновению деформаций на уровне регенерата после снятия аппарата. Животных выводили из опыта передозировкой тиопентала натрия через 30 и 90 суток фиксации пластиной.

После вскрытия коленного и заплюсневых суставов с мыщелков бедра и блока таранной кости перпендикулярно суставной поверхности с помощью скальпеля вырезали образцы суставного хряща размером $2-3 \times 4-5$ мм. Гистоморфометрические исследования проведены по серийным полутонким срезам суставного хряща с подлежащей субхондральной костью большой площади (до 8 мм^2) [6], которые окрашивали метиленовым синим-основным фуксином. Изображения микропрепаратов оцифровывали с помощью фотомикроскопа «Opton» (Германия) на АПК «ДиаМорф» (Москва) и анализировали в программе «ВидеоТест-Мастер-Морфология». Определяли долю хондроцитов ($N_{ch}, \%$), долю пустых лакун ($NN_{em.lac}, \%$) и изогенных групп ($NN_{is.gr}, \%$) в общем объеме выборки из 200 лакун. В качестве нормы морфометрировали суставной хрящ 5 интактных животных.

Цифровой материал анализировали по критериям вариационной и непараметрической статистики в программе AtteStat, версия 1.0 в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При светооптическом исследовании полутонких срезов в суставном хряще мыщелков бедра и блока таранной кости на всех сроках эксперимента выявлены однотипные изменения. Суставной хрящ обеих суставных поверхностей сохранял зональное строение (рис. 1, А, рис. 2, А), деструктивные изменения проявлялись нарушением гомогенности суперфициальной части поверхностной зоны и нарушением структуры части хондроцитов (рис. 1, Б, В; рис. 2, Б). Изогенные группы клеток встречались редко и были отмечены единично в промежуточной и поверхностной зонах. Отмечено увеличение частоты встречаемости пустых лакун в суставном хряще мыщелков бедра преимущественно в промежуточной и глубокой зонах, в суставном хряще блока таранной кости – в поверхностной зоне. Во всех наблюдениях целостность базофильной линии не нарушена.

При гистоморфометрическом анализе в суставном хряще мыщелка бедренной кости интактных животных доля хондроцитов составила 71,89 %, изогенных групп – 14,5 %, пустых лакун – 13,6 % (рис. 3). В срок 30 суток фиксации пластиной значения доли хондроцитов в общем объеме выборки достоверно ($p < 0,05$) ниже контроля на 5,74 %, в 2,3 раза увеличена доля пустых лакун. При этом отмечено снижение пролиферативной активности, доля изогенных групп составила 2,06 %. Через 90 суток фиксации пластиной по сравнению с предыдущим сроком доля хондроцитов незначительно увеличивалась, по сравнению с контролем этот показатель снижен на 3,73 %. Сохранялись низкие значения доли изогенных групп – 4,3 %, высокие значения ($p < 0,05$) доли пустых лакун – 27,54 %.

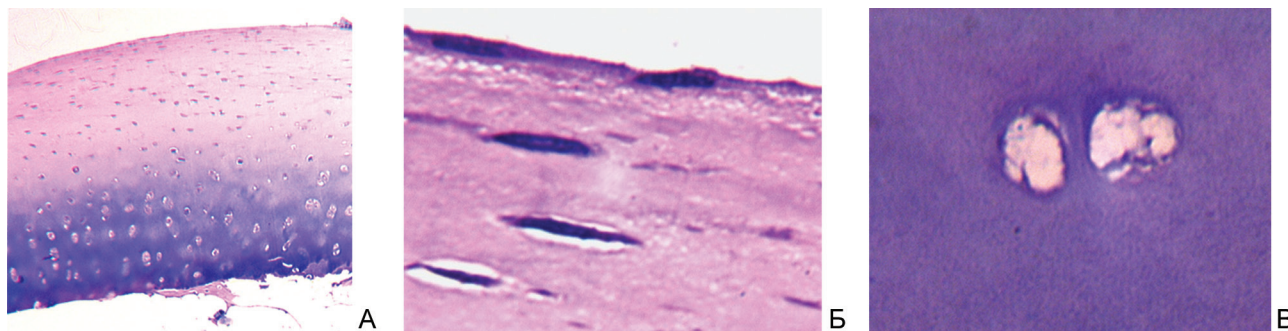


Рис. 1. Суставной хрящ мыщелка бедра, 90 суток фиксации пластиной. Полутонкие срезы, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. – 6,3; ок. – 12,5× (А). Об. – 100ММ; ок. – 12,5× (Б, В). А – общий вид. Б – поверхностная зона хряща. В – пустые лакуны в промежуточной зоне хряща

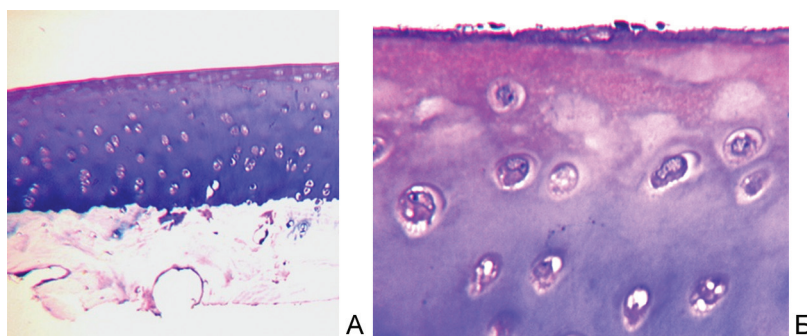


Рис. 2. Суставной хрящ блока таранной кости. 90 суток фиксации пластиной. Полутонкие срезы, окраска метиленовым синим-основным фуксином. А – общий вид. Об. – 6,3; ок. – 12,5 $\times$. Б – пустые лакуны в поверхностной зоне хряща. Об. – 40; ок. – 12,5 $\times$

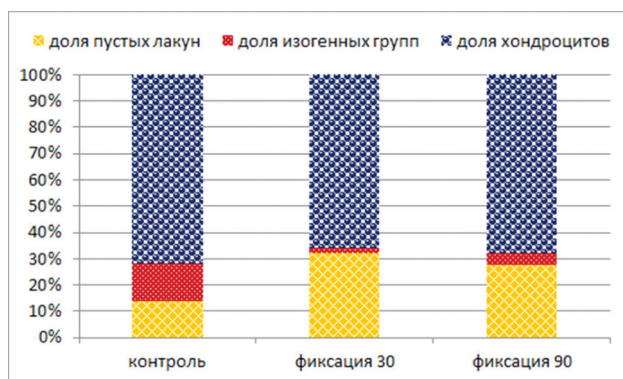


Рис. 3. Морфометрические показатели суставного хряща мыщелка бедра

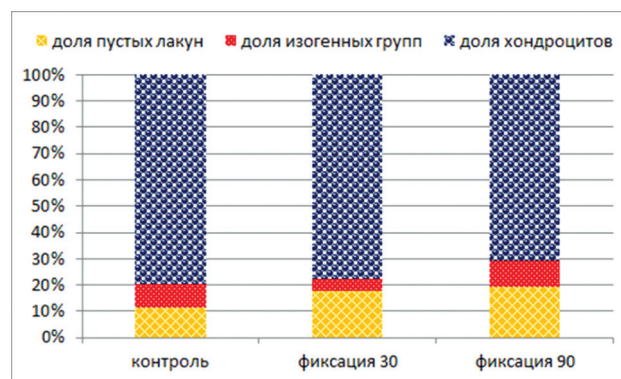


Рис. 4. Морфометрические показатели суставного хряща блока таранной кости

В суставном хряще блока таранной кости интактных животных доля хондроцитов составила 79,3 %, изогенных групп – 9,9 %, пустых лакун – 10,8 %. В срок 30 суток фиксации пластиной доля хондроцитов в общем объеме выборки ниже ($p > 0,05$) контроля на 1,98 %, в 1,5 раза увеличена доля пустых лакун. Доля изогенных

групп снижалась до 4,7 % относительно контроля. Через 90 суток фиксации пластиной значения доли пустых лакун оставались на том же уровне, что и на предыдущем сроке эксперимента. Отмечено увеличение пролиферативной активности хондроцитов, значения доли изогенных групп сопоставимы с контролем.

ДИСКУССИЯ

Таким образом, при светооптическом исследовании полутонких срезов в суставном хряще мыщелков бедренной кости и блока таранной кости в условиях удлинения голени с темпом 1 мм в сутки за 4 приема в комбинации с наkostной пластиной выявлены сходные изменения: нарушение гомогенности межклеточного вещества верхней суперфициальной части поверхностной зоны и деструкция части хондроцитов. Суставной хрящ обеих суставных поверхностей сохранял зональное строение, целостность базофильной линии не нарушена.

Распространенность остеоартроза варьирует в различных суставах, голеностопный сустав имеет очень низкую распространенность заболевания по сравнению с коленным суставом [7, 8].

Гистоморфометрический метод позволил выявить различия состояния суставного хряща мыщелков бедра и блока таранной кости. Так, количественный анализ показал, что у интактных животных процессы гибели хондроцитов интенсивнее выражены в суставном хряще мыщелков бедра, чем в суставном хряще блока таранной кости (выше показатели $NN_{em.lac.}$), эта же закономерность прослеживалась и в эксперименте. Наиболее уязвимым в данных условиях эксперимента

оказался суставной хрящ мыщелков бедра. Степень травматизации суставного хряща мыщелков бедренной кости характеризует большее, чем в суставном хряще блока таранной кости увеличение $NN_{em.lac.}$ на всех сроках эксперимента, при этом значения $NN_{is.gr}$ резко снижены, в большей степени снижена и численность хондроцитов.

В проведенных нами ранее исследованиях при дистракционном остеосинтезе голени аппаратом Илизарова в режиме 1 мм за 4 приема в срок эксперимента 30 суток фиксации аппаратом процессы гибели хондроцитов в суставном хряще мыщелков бедра были менее выражены [9].

Поскольку хондроциты – единственный тип клеток, формирующих хрящ и поддерживающих динамическое равновесие между синтезом и деградацией внеклеточного матрикса [4], разрушение хряща связано, прежде всего, со смертью хондроцитов, а затем уже с потерей матрикса. Соответственно восстановительные процессы определяются степенью активации биосинтетической активности выживших хондроцитов, их пролиферации, постпролиферативного восстановления биосинтетической активности и участием в реорганизации матрикса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что апробированная методика distractionного остеосинтеза голени в комбинации с наkostной пластиной является малотравматичной для смежных суставов, сохраняется зональное строение хряща,

целостность базофильной линии. Сопоставительный анализ количественных параметров суставного хряща выявил, что наиболее уязвимым в данных условиях эксперимента оказался суставной хрящ мыщелков бедра.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевцов В.И., Меньшикова Т.И., Щуров В.А. Теоретические предпосылки и практические последствия увеличения длины нижних конечностей у больных с ахондроплазией // Рос. журнал биомеханики. 2000. Т. 4, № 3. С. 74-79.
2. Морфо-функциональная характеристика суставного хряща наружного мыщелка бедра при удлинении голени собак / В.И. Шевцов, Т.А. Ступина, М.М. Щудло, С.А. Ерофеев // Гений ортопедии. 2004. № 1. С. 39-44.
3. Ступина Т.А., Щудло М.М. Оценка регенераторных возможностей суставного хряща при различных условиях удлинения смежного сегмента конечности в эксперименте // Гений ортопедии. 2010. № 3. С. 84-88.
4. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение / под ред. В.Н. Павловой, Г.Г. Павлова, Н.А. Шостак, Л.И. Слущкого. М., 2011. 552 с.
5. Степанов М.А., Антонов Н.И., Борзунов Д.Ю. Экспериментальное обоснование комбинированного distractionного остеосинтеза наkostной пластиной и аппаратом Илизарова // Гений ортопедии. 2016. № 4. С. 71-75.
6. Ступина Т.А., Щудло М.М. Способ изготовления препаратов недекальцинированного суставного хряща с подлежащей субхондральной костью для многоцелевых исследований // Бюллетень эксперимент. биологии и медицины. 2014. Т. 157, № 3. С. 388-390.
7. Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in the superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage / B.L. Schumacher, J.L. Su, K.M. Lindley, K.E. Kuettner, A.A. Cole // Anat. Rec. 2002. Vol. 266, No 4. P. 241-248.
8. Thomas R.H., Daniels T.R. Ankle arthritis // J. Bone Joint Surg. Am. 2003. Vol. 85-A, No 5. P. 923-936.
9. Ступина Т.А., Щудло М.М. Структурная адаптивность и репаративные возможности суставного хряща в зависимости от условий удлинения смежного сегмента конечности // Травматология и ортопедия России. 2011. №4(62). С. 62-68.

REFERENCES

1. Shevtsov V.I., Men'shchikova T.I., Shchurov V.A. Teoreticheskie predposylki i prakticheskie posledstviia uvelicheniia dliny nizhnikh konechnostei u bol'nykh s akhondroplaziei [Theoretical prerequisites and practical consequences of increasing the lower limb length in patients with achondroplasia]. *Ros. Zhurnal Biomekhaniki*, 2000, vol. 4, no. 3, pp. 74-79. (In Russian)
2. Shevtsov V.I., Stupina T.A., Shchudlo M.M., Erofeev S.A. Morfo-funktsional'naiia kharakteristika sustavnogo khriashcha naruzhnogo myshchelka bedra pri udlinenii goleni sobak [Morphofunctional characteristic of articular cartilage of the femoral lateral condyle during canine leg lengthening]. *Genij Ortopedii*, 2004, no. 1, pp. 39-44. (In Russian)
3. Stupina T.A., Shchudlo M.M. Otsenka regeneratsionnykh vozmozhnostei sustavnogo khriashcha pri razlichnykh usloviakh udlineniia smezhnogo segmenta konechnosti v eksperimente [Estimation of articular cartilage regeneration potentials under different conditions of experimental lengthening of limb adjacent segment]. *Genij Ortopedii*, 2010, no. 3, pp. 84-88. (In Russian)
4. Pavlova V.N., Pavlov G.G., Shostak N.A., Slutskii L.I., eds. Sustav: morfologiya, klinika, diagnostika, lechenie [The joint: morphology, diagnosis, treatment]. M., 2011, 552 p. (In Russian)
5. Stepanov M.A., Antonov N.I., Borzunov D.Iu. Eksperimental'noe obosnovanie kombinirovannogo distraktsionnogo osteosinteza nakostnoi plastinoy i apparatom Ilizarova [Experimental rationale of combined distraction osteosynthesis using an internal plate and the Ilizarov fixator]. *Genij Ortopedii*, 2016, no. 4, pp. 71-75. (In Russian)
6. Stupina T.A., Shchudlo M.M. Sposob izgotovleniia preparatov nedekal'tsinirovannogo sustavnogo khriashcha s podlezhashchei subkhondral'noi kost'iu dlia mnogotsелеvykh issledovaniy [A technique for making the preparations of non-calcified articular cartilage with underlying subchondral bone for multi-purpose research]. *Bulleten' Eksperiment. Biologii i Meditsiny*, 2014, vol. 157, no. 3, pp. 388-390. (In Russian)
7. Schumacher B.L., Su J.L., Lindley K.M., Kuettner K.E., Cole A.A. Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in the superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage. *Anat. Rec.*, 2002, vol. 266, no. 4, pp. 241-248.
8. Thomas R.H., Daniels T.R. Ankle arthritis. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 2003, vol. 85-A, no. 5, pp. 923-936.
9. Stupina T.A., Shchudlo M.M. Strukturnaia adaptivnost' i reparatornye vozmozhnosti sustavnogo khriashcha v zavisimosti ot uslovii udlineniia smezhnogo segmenta konechnosti [Structural adaptability and reparative potential of articular cartilage depending on the conditions of adjacent limb segment lengthening]. *Travmatologiya i Ortopediya Rossii*, 2011, no. 4(62), pp. 62-68. (In Russian)

Рукопись поступила 20.02.2017

Сведения об авторах:

1. Ступина Татьяна Анатольевна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган, Россия, старший научный сотрудник лаборатории морфологии, д. б. н.; e-mail: StupinaSTA@mail.ru
2. Степанов Михаил Александрович – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган, Россия, ведущий научный сотрудник экспериментальной лаборатории, к. в. н.

Information about the authors:

1. Tat'iana A. Stupina, Ph.D. of Biological Sciences, Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan, Russia, Laboratory of Morphology; e-mail: StupinaSTA@mail.ru
2. Mikhail A. Stepanov, Ph.D. of Veterinary Sciences, Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan, Russia, Experimental Laboratory