

© Группа авторов, 2000

## **Морфология суставного хряща при последовательном дистракционно-компрессионном остеосинтезе голени**

**А.В. Попков, Т.А. Ступина, С.А. Ерофеев, Е.В. Осипова, Д.А. Попков**

## **Morphology of articular cartilage in leg consecutive distraction-compression osteosynthesis**

**A.V. Popkov, T.A. Stupina, S.A. Yerofeyev, E.V. Osipova, D.A. Popkov**

Государственное учреждение науки

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)

Выполнено две серии опытов: в первой – удлиняли голень и по окончании дистракции осуществляли компрессию регенерата, во второй серии, кроме удлинения и компрессии, внутривенно вводили орозин - однократно перед компрессией, многократно в период фиксации и многократно на протяжении всего эксперимента. Проведено морфологическое и морфометрическое исследование хрящевой ткани коленного сустава. Установлено, что в первой серии и при однократном введении орозина сохраняется общая структура хряща. Незначительно уменьшается высота хряща и его поверхностной зоны. В опытах с многократным введением орозина изменения суставного хряща более значительны и проявляются деструкцией поверхностной зоны, формированием очагов фибрилляции. Происходит увеличение пролиферативной активности клеток промежуточной и базальной зон хряща, что рассматривается как компенсаторная реакция, направленная на пластическое обеспечение репарации поверхностной зоны.

Ключевые слова: эксперимент, собака, голень, удлинение, дистракционно-компрессионный остеосинтез, орозин, суставной хрящ, морфология, морфометрия.

Two series of experiments were made: the first one, in which leg was elongated and compression of regenerate bone was made after compression, and the second one, in which, apart from elongation and compression, orozin was infused intravenously – once before compression, repeatedly – during fixation and repeatedly all over the experiment. Morphological and morphometrical study of the knee cartilaginous tissue was made. It is established, that general structure of cartilage is maintained in the first series and in case of single infusion of orozin. Height of the cartilage and its superficial zone is slightly decreased. Changes of articular cartilage are more considerable and manifested as destruction of the superficial zone, formation of fibrillation foci in the experiments with repeated infusion of orozin. There is an increase of cellular proliferative activity in the intermediate and basal zones of cartilage, that is considered to be a compensatory reaction, directed to plastic maintenance of the superficial zone reparation.

Keywords: experiment, dog, leg, elongation, distraction-compression osteosynthesis, orozin, articular cartilage, morphology, morphometry.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследования, ранее проведенные в РНЦ «ВТО», показали, что при чрескостном остеосинтезе изменения двигательного стереотипа в оперированной и контралатеральной конечностях нередко приводят к изменениям в суставном хряще, требующим определенного периода анатомо-функционального восстановления [1]. При удлинении конечности в основном проводились биохимические исследования хрящевой ткани коленного сустава [2]. При этом выявлены изменения в синтезе гликозаминогликанов и активация деструктивных процессов белковой части протеогликанов. Учитывая, что дегенеративно-дистрофические изменения суставного

хряща – многофакторный патологический процесс, наиболее полное представление о котором можно получить с помощью комплексного исследования [3], и нет работ, посвященных изучению структуры суставного хряща при удлинении конечностей, нами были проведены морфологические и морфометрические исследования, целью которых явилось изучение хрящевой ткани коленного сустава после удлинения конечности и последующей компрессии дистракционного регенерата.

В задачи исследования входила оценка следующих параметров: высоты суставного хряща наружного мыщелка бедренной кости, относи-

тельного объема хондроцитов, относительного объема межклеточного вещества, числа хондроцитов в тестовом поле зрения (численная плотность хондроцитов), численной плотности двух- и четырехчленных изогнутых групп, "суммарной

численной плотности пролиферирующих хондроцитов"\*.

Рассчитывали вторичные стереологические параметры: отношение относительного объема межклеточного вещества к относительному объему хондроцитов в поле зрения.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 18 взрослых беспородных собаках возрастом 1 - 3 года. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли согласно приказу МЗ СССР N 755, 1977 г. Под внутривенным наркозом на голень собаки накладывали аппарат Илизарова и выполняли закрытую флекссионную остеоклазию большеберцовой кости в средней трети диафиза. Через 5 дней после операции начинали удлинение голени в режиме 1 мм в сутки за 4 этапа в день (по 0,25 мм), дистракция осуществлялась 35 дней. По завершении дистракции производили одномоментную компрессию дистракционного регенерата. Эксперименты разделены на 2 серии: в первой было удлинение и компрессия; во второй - кроме этих мероприятий собакам внутривенно вводили орозин (3,68 гр. сухого вещества разводили в 300 мл 9% изотонического раствора натрия хлорида) [4]. Двум животным препарат вводился однократно перед компрессией, 4 – также перед компрессией и затем каждую неделю фиксации и еще 4 – еженедельно с начала эксперимента. Собак выводили из опыта через 1 день, 2 - 4 недели фиксации после компрессии и через месяц после снятия аппарата (1 серия).

Для морфологического и морфометрического исследований использовали суставные хрящи с мышечков бедренной кости. Образцы хряща обрабатывали по общепринятой методике [5], их фиксировали в смеси 2% глутаральдегида на фосфатном буфере при pH 7,4, постфиксировали в 1% растворе четырехокси осмия с добавлением 1,5% красной кровяной соли, дегидратиро-

вали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, заключали в аралдит. Полутонкие срезы хряща готовили на ультратоме "Nova" фирмы "ЛКВ" (Швеция), окрашивали метиленовым синим и полихромным (Б. Уикли 1975) [5], исследовали и фотографировали на фотомикроскопе фирмы "Opton" (Германия).

Компьютерный морфометрический анализ выполнен на аппаратно-программном комплексе "ДиаМорф" (Москва). Изображения полей зрения гистологических препаратов вводили в память компьютера с помощью цветной TV-камеры, установленной на оптическом микроскопе. По специально составленному макросу определяли высоту хряща, высоту поверхностной зоны, суммарную площадь хондроцитов, площадь межклеточного вещества. Измерения проводили в микрометрах, после предварительной геометрической калибровки по объект-микроскопу.

Для оценки объема структуры исходили из принципа A. Delesse(1847): доля площади среза, содержащая изучаемый объект, равна его доле в объеме исследуемого объекта [6]. Контролем служили аналогичные препараты хрящевой ткани мышечка бедренной кости интактных взрослых беспородных собак.

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке в программе Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента, проведя предварительно проверку на нормальность распределения изучаемых случайных величин.[7, 8].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных результатов исследований достоверно различаются две экспериментальные группы. В первую группу вошли результаты исследований структуры суставного хряща животных первой серии и собак с однократным введением орозомукоида. Во вторую группу объединили результаты исследований суставного хряща животных, которым многократно в период фиксации или на протяжении всего эксперимента вводили орозомукоид (орозин). Морфологический и морфометрический анализ выявил, что различия изучаемых величин внутри этих групп животных несущественны ( $p \geq 0,05$ ).

При морфологическом и морфометрическом анализе суставного хряща первой группы не выявлено значительных морфологических изменений по сравнению с суставным хрящом интактных животных (рис. 1).

У животных в срок 1 день фиксации после компрессии структура хряща не нарушена. Матрикс поверхностной зоны был гомогенным и базофильным. Наблюдается незначительное снижение интенсивности окраски метиленовым

\* С.Н. Асонова, Г.Н. Филимонова. Рационализаторское предложение. Способ оценки действия биологически-активных веществ на гистологических препаратах суставного хряща. № 49/96 от 20 января 1997 г.

синим межклеточного матрикса поверхностной зоны. Аналогичные изменения суставного хряща были отмечены и через 14 - 21 день фиксации (рис. 2).



Рис. 1. Общий вид суставного хряща интактного животного (норма). Окраска метиленовым синим-основным фуксином, микрофото; об. - 2,5х, ок. - 10х

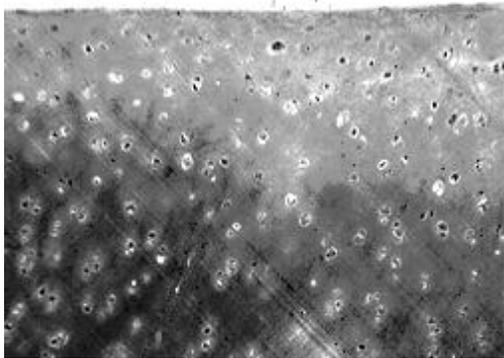


Рис. 2. Уменьшение высоты поверхностной зоны в срок 14 дней фиксации (1 группа опытов). Окраска метиленовым синим-основным фуксином; микрофото; об. - 6,3х, ок. - 10х

К четырем неделям фиксации определяли отчетливое увеличение толщины слоя со сниженной базофилией в поверхностной зоне хряща. Почти полностью исчезало окрашивание межклеточного матрикса, что косвенно свидетельствовало о снижении содержания гликозаминогликанов (ГАГ) [3]. Через месяц после снятия аппарата на полутонких срезах суставного хряща наблюдалось увеличение интенсивности окраски метиленовым синим межклеточного матрикса поверхностной зоны, что косвенно свидетельствовало об активизации биосинтеза ГАГ хондроцитами [3], репаративных процессов и восстановлении структуры хряща (рис. 3).

У всех животных выявлено достоверное уменьшение ( $p \leq 0,001$ ) высоты поверхностной зоны и высоты хряща (табл. 1.). Обнаружено незначительное увеличение относительного объема хондроцитов по сравнению с контролем. Это подтверждается результатами расчета вторичного стереологического параметра - отношением относительного объема межклеточного

вещества к относительному объему хондроцитов в поле зрения (табл. 2.). Увеличение численной плотности клеток происходило за счет увеличения количества двух- и четырехчленных изогенных групп (табл. 3.). Наибольшая концентрация клеток типична для слоя, непосредственно прилежащего к поверхностной зоне. В глубокой части промежуточной зоны изогенные группы складываются в колонки. В базальной зоне суставного хряща межклеточное вещество кальцинируется и прокрашивается более интенсивно, чем межклеточное вещество поверхностной и промежуточной зон. Базофильная линия отчетливо выражена, извилистая, непрерывная.

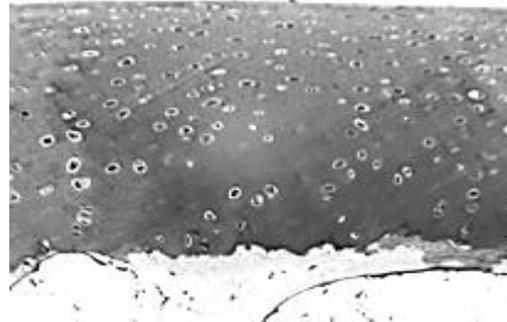


Рис. 3 Восстановление структуры, увеличение интенсивности окраски поверхностной зоны суставного хряща через месяц после снятия аппарата (1 группа опытов). Окраска метиленовым синим; микрофото; об. - 6,3х, ок. - 10х

При исследовании суставного хряща животных второй группы после 2 - 3 недель фиксации отмечаются следующие изменения: нарушается гомогенность межклеточного матрикса поверхностной зоны, происходит деструкция коллагенового каркаса, которая сопровождается фибрилляцией - разволокнением матрикса хряща (рис. 4). У всей группы выявлено достоверное уменьшение высоты поверхностной зоны ( $p \leq 0,001$ ) (табл. 1).

Таблица 1.

Высота суставного хряща бедренной кости (мкм)

Параметры	Срок эксперимента		
	инт. серия	1 группа	2 группа
Высота поверхн. зоны (мкм)	105±2	80,1±1,17*	72±1,62*
ПТО,%	1,9	1,4	2,2
Высота хряща.(мкм)	475±1,3	380±1,9*	418±1,2*
ПТО,%	0,2	0,5	0,2

Различия с интактными достоверны

\* -  $p \leq 0,001$  (Критерий Стьюдента)

Клеточная плотность в участках фибрилляции хряща меньше, чем в интактном хряще и в хряще животных первой группы. В отдельных случаях на поверхности хряща встречаются открытые лакуны хондроцитов, как пустые, так и с обнаженными клетками (рис. 4). Отмечается высокая пролиферативная активность клеток промежуточной и базальной зон, за счет двух-, трех-, четырех-, пятичленных изогенных групп

хондроцитов (табл. 3, рис. 5). Отмечается увеличение величины пула пролиферирующих хондроцитов от общего числа хондроцитов - с 29% интактной серии до 38% - в первой и 46% - во второй группах. Выявлены достоверные различия значений ( $p \leq 0,001$ ) относительного объема хондроцитов и отношения относительного объема межклеточного вещества к относительному объему хондроцитов суставного хряща по сравнению с интактной серией (табл. 2.). Относительный объем хондроцитов возрастал в основном за счет двучленных изогенных групп.

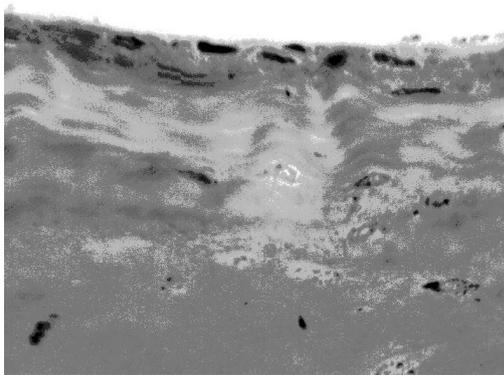


Рис. 4. Вростание капилляров со стороны субхондральной кости в базальную зону хряща (2 группа опытов, 14 дней фиксации). Окраска метиленовым синим-основным фуксином; микрофото; об. - 6,3х, ок. - 10х

Таблица 2.

Относительный объем хондроцитов и межклеточного вещества в суставном хряще бедренной кости ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ )

Параметры	Срок эксперимента		
	Инт. серия	1 группа	2 группа
Vvx ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ )	86,25±1,79	88±2,18	95±1,8*
ПТО, %	2,08	2,4	1,8
Vvm.к.в. ( $\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$ )	5581,1±28,9	5592±36,3	5581,4±27
ПТО, %	0,5	0,6	0,4
Vvm.к.в. / Vvx	64,7±1,71	62±1,98	58,8±1,42*

Различия с интактными достоверны  
\* -  $p \leq 0,001$  (Критерий Стьюдента)

Таблица 3.

Численная плотность хондроцитов, двух- и четырехчленных изогенных групп

Параметры	Срок эксперимента		
	Инт. серия	1 группа	2 группа
На хондр. ( $\text{мкм}^{-2}$ )	5,52±0,28	5,9±0,3	6±0,27
ПТО, %	4,1	5	4,5
На2чл. из. групп, %	24	29	41
На4чл. Из. групп, %	5	9	5
Насинт. Пула хондр. %	29	38	46

У двух собак этой группы (после компрессии, 2 недели фиксации) отчетливо выражены изменения состояния базофильной линии, проявляющиеся в образовании разрывов, щелей, проникновении сосудов в хрящ (рис. 6). Эти изменения свидетельствуют о нарушении гомеостаза всей

базальной зоны, в первую очередь ее трофики со стороны кости и, вероятно, связаны с какими-то индивидуальными особенностями.

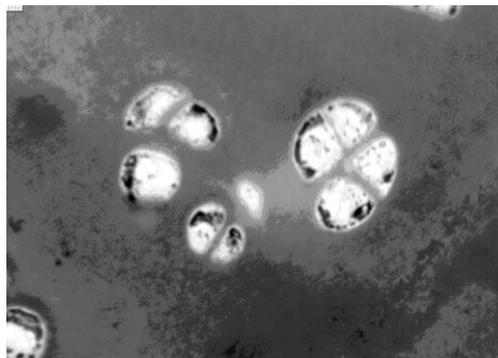


Рис. 5. Изогенные группы клеток в промежуточной зоне суставного хряща (2 группа опытов, фиксации 20 дней). Окраска метиленовым синим-основным фуксином; микрофото; об. - 40х, ок. - 10х

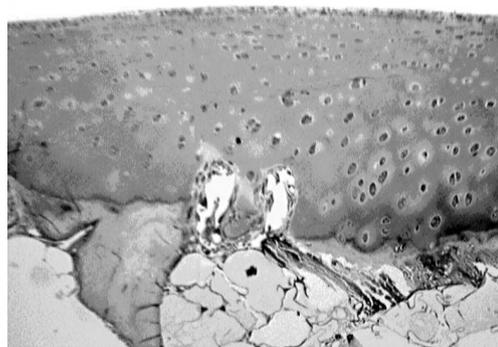


Рис. 6. Разволокнение поверхности хряща, открытые лакуны хондроцитов с обнаженными клетками (2 группа опытов, 14 дней фиксации). Окраска метиленовым синим; микрофото; об. - 40х, ок. - 10х

Таким образом, при удлинении конечностей с последующей одномоментной компрессией дистракционного регенерата у животных первой экспериментальной группы сохраняется общая структура и глубокая зона хряща. Незначительно уменьшается высота хряща и его поверхностной зоны. Во второй экспериментальной группе изменения суставного хряща более значительны, чем в первой, и проявляются деструкцией поверхностной зоны, формированием очагов фибрилляции. Происходит увеличение пролиферативной активности клеток промежуточной и базальной зон хряща, что рассматривается как компенсаторная реакция, направленная на пластическое обеспечение репарации поверхностной зоны. В результате многократного введения орозомукоида, одним из свойств которого является улучшение микроциркуляции [4], наблюдается вращание капилляров со стороны субхондральной кости в базальную зону хряща. Проникновение в хрящ сосудов приводит к усилению окислительных и гидролитических процессов. Хрящевая ткань, не приспособленная к аэробному типу энергетического обмена, в этих

условиях постепенно некротизируется и в дальнейшем кальцифицируется. Дальнейшие более длительные наблюдения, возможно, раскроют патогенез дегенеративно-дистрофических забо-

леваний суставов, в основе которых лежат изменения кровообращения и метаболизма базального слоя суставного хряща.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Изменения показателей углеводного компонента протеогликанов тканей коленного сустава при удлинении голени у собак / Е.Л. Матвеева, Т.В. Русова, С.А. Ерофеев, А.А. Шрейнер // Гений ортопедии. – 1997. - №1. - С.71-73.
3. Павлова В.Н. и др. Хрящ / В.Н. Павлова, Т.Н. Копьева, Л.И. Слуцкий, Г.Г. Павлов. - М.: Медицина, 1988. - 320 с.
4. Лютков А.Г., Алешкин В.А., Саломатин В.В. Орозин - препарат для лечения ожогов из крови человека // Производственная трансфузиология в России на рубеже XXI века: Материалы науч.-практ. конф. – М, 1999. – С. 9–10.
5. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. - М.: Мир, 1975. - 324 с.
6. Непомнящих Л.М. и др. Морфометрия и стереология гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Г.И. Непомнящих. - М.: Наука, 1986. - 159 с.
7. Автандилов Г.Г. и др. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблчанский, В.Г. Губенко. - М.: Медицина, 1981. - 189 с.
8. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. - М.: Медицина, 1975. - 295 с.

Рукопись поступила 24.12.99.

## Вышли из печати



**В.И. Шевцов**

### **Биобиблиографический указатель**

(к 60-летию со дня рождения)

**Курган, 1998. – 116 с.**

Биобиблиографический указатель трудов Владимира Ивановича Шевцова включает краткий биографический очерк, перечень основных этапов научно-практической деятельности ученого и врача и библиографию его трудов с 1964 по 1998 гг. Хронологический порядок библиографических записей раскрывает творческий путь В.И. Шевцова и отражает новые шаги в развитии метода чрескостного остеосинтеза в вертебрологии, ангиологии, онкологии и т.д., а также в области фундаментальных исследований.

Указатель имеет сквозную нумерацию. Именной указатель в конце книги познакомит читателя с соавторами ученого.

Серия указателей трудов "Школа Илизарова: библиография ученого" будет регулярно выходить к знаменательным датам и других учеников академика Г.А. Илизарова. Цель издания - познакомить травматологов, ортопедов, ангиологов, онкологов и врачей других областей медицины с наследием школы Илизарова. Указатель окажет помощь работникам медицинских и массовых библиотек в пропаганде метода чрескостного остеосинтеза по Илизарову и представит интерес для широкого круга читателей.