

© Группа авторов, 2004

Морфофункциональная характеристика суставного хряща наружного мыщелка бедра при удлинении голени собак

В.И. Шевцов, Т.А. Ступина, М.М. Щудло, С.А. Ерофеев

The morphofunctional characteristic of the articular cartilage of femoral lateral condyle in the process of canine leg lengthening

V.I. Shevtsov, 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)

Производили удлинение голени в течение 28 дней с суточным темпом 1 мм в 1 серии за 60 приемов — автодистракция, во 2 серии за 8 приемов — ручные подкрутки. Проведено морфологическое и морфометрическое исследование суставного хряща. Установлено, что в суставном хряще собак обеих серий происходили аналогичные изменения: в конце дистракции отмечено уменьшение высоты хряща, дезорганизация межклеточного вещества поверхностной зоны, уменьшение объемной и численной плотности хондроцитов, повышение пролиферативной активности оставшихся клеток. В период фиксации в обеих сериях также отмечено уменьшение высоты хряща, очаги разволокнения, наблюдается тенденция увеличения численной, объемной плотности клеток, пула пролиферирующих хондроцитов. Интенсивность деструктивно-репаративных процессов была более выражена при ручной подкрутке. Через месяц после снятия аппарата наблюдалось восстановление структуры суставного хряща. Проведенные исследования позволили выявить общие закономерности морфофункционального состояния суставного хряща при удлинении голени в обеих сериях и показали, что применение автодистракции для суставного хряща было более щадящим.

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

Leg lengthening was performed during 28 days with 1 mm daily rate for 60 times (autodistraktion) in series 1 and for 8 times (manual manipulations) — in series 2. Morphological and morphometric studies of articular cartilage were made. It was established that the similar changes occurred in the articular cartilage of the dogs in both series: there was revealed decrease of the cartilage height at the end of distraction as well as disorganization of the intercellular substance in the superficial zone, decrease of the volume and numerical density of chondrocytes, increase of the proliferative activity of the remaining cells. The decrease of the cartilage height and the presence of the foci of fibrillation visualization were noted in both series in the period of fixation and the tendency was revealed towards increase of the numerical, volume density of cells and that of proliferating chondrocyte pool. The intensity of destructive-and-reparative processes was more marked in case of manual manipulations. The restoration of the articular cartilage structure was observed in a month after the device removal. The studies made allowed to determine the general regularities of the articular cartilage morphofunctional condition in both series during leg lengthening and they demonstrated autodistraktion use to be more sparing for the articular cartilage.

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

ВВЕДЕНИЕ

По литературным данным известно, что регулирующая роль механических факторов особенно существенна в отношении суставных хрящей, для которых механическая функция является главной [12, 18]. В настоящее время широко используются методики удлинения конечностей по Илизарову, при этом происходит вынужденное ограничение движений с созданием постоянного дополнительного давления в суставах [17]. Г.А. Илизаровым открыто неизвестное ранее явление активизации роста и регенерации тканей под влиянием напряжения

растяжения, создаваемого в них с помощью дистракционного аппарата [9]. Напряжение растяжения в тканях при удлинении конечности играет адаптогенную роль в восстановлении физиологической функции хряща: пролиферативный потенциал и уровень генной экспрессии дифференцированных клеток при дистракционном остеосинтезе существенно выше, чем при иммобилизации сустава [3]. В исследованиях, проведенных в РНЦ «ВТО», отмечены нарушения архитектоники суставного хряща, структуры и биосинтеза основных его компонентов,

регистрируются деструктивные изменения [4, 5, 7]. При гистохимическом изучении гликозаминогликанов суставного хряща использовали полук количественные методы, количество осадка красителя оценивали визуально в баллах [10].

В то же время работы по морфологии суставного хряща в условиях дозированного растяжения голени единичны, также в доступной литературе мы не встретили исследований, проведенных с помощью современных методов ко-

личественного анализа, которые позволили бы объективно оценить характер изменений и регенерации суставного хряща в данных условиях.

Учитывая эти положения, целью данной работы явилось изучение морфофункциональных характеристик суставного хряща в условиях дозированного растяжения голени с помощью современных методик (световая микроскопия полутонких срезов, компьютерная морфометрия).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами изучен суставной хрящ наружного мыщелка бедра 21 беспородной собаки I категории (длина голени 18-21 см) в возрасте 2-3 лет с массой тела 18-25 кг. Три интактные собаки составили контрольную группу. В опытных сериях после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей в течение 4-х недель осуществляли дозированное удлинение правой голени с темпом 1 мм в день (с 8 до 20 часов) за 60 приемов – автодистракция (1 серия, 9 животных) и за 8 приемов – ручные подкрутки (2 серия, 9 животных). Исследование проводили на этапах: через 28 дней дистракции, 30 дней фиксации и месяц после снятия аппарата.

После альдегидно-осмиевой фиксации образцы хряща дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, заключали в аралдит, при этом для получения репрезентативных препаратов при резко выраженной вертикальной анизоморфии суставного хряща кусочки ориентировали так, чтобы плоскость среза была перпендикулярна суставной поверхности. Полутонкие срезы толщиной 1,0 мкм готовили на ультратоме "Nova" фирмы LKB (Швеция) и окрашивали метиленовым синим или метиленовым синим-основным фуксином [15]. Микропрепара-

ты исследовали на фотомикроскопе фирмы "Opton" (Германия) с аппаратно-программным комплексом "ДиаМорф" (Москва). В программах той же фирмы изображения оцифровывали и морфометрировали. Измерения проводили в микрометрах после предварительной геометрической калибровки по оцифрованной с тем же увеличением шкале объект-микрометра. При оценке объемных отношений структур исходили из принципа A. Delesse (1847) $V_{Vi} = A_{Ai}$ [1, 11]. Определяли высоту (**h**) хряща и зон в его составе, в поле зрения подсчитывали число следов хондроцитов, площади их и межклеточного вещества, рассчитывали объемную ($V_{V_{хл}}$) и численную ($N_{A_{хл}}$) плотности всех хондроцитов, численную плотность пролиферирующих хондроцитов ($N_{A_{пхл}}$) и величину их пула – выраженное в процентах отношение $N_{A_{пхл}}/N_{A_{хл}}$ [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 и критерию Стьюдента [6, 16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

К концу дистракции большинство животных 1 серии пользовались удлиненной конечностью, приступая на нее в стойке или при ходьбе. При этом не было отмечено значительных ограничений движений в суставах, в коленном суставе определялась умеренная гибательная контрактура, амплитуда движений составляла 80-90° (норма 100-110°). Положение стопы было близко к физиологическому.

Суставной хрящ наружного мыщелка бедра макроскопически был гладким, жемчужно-белого цвета, при детальном рассмотрении можно было отметить сухость хрящевой поверхности. При количественном морфологическом исследовании отмечено истончение сус-

тавного хряща в среднем на 26% по сравнению с контролем (табл. 1). Сохранялась зональная структура, за исключением разрушения бесклеточной пластинки (lamina splendens). В части наблюдений межклеточное вещество поверхностной зоны теряло свою гомогенность, выглядело зернистым (рис. 1А), при окраске метиленовым синим наблюдалась слабая метахромазия. Обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) уменьшение численной плотности хондроцитов по сравнению с контролем (рис. 3). Выявлены пустые лакуны. Объемная плотность хондроцитов в 1,7 раза была ниже, чем в контроле (табл. 1).

Таблица 1

Количественные характеристики хрящевой ткани суставной выстилки бедренной кости при удлинении голени

Параметры	Контроль	Срок эксперимента					
		Д 28		Ф 30		БА 30	
		1 серия	2 серия	1 серия	2 серия	1 серия	2 серия
Vv (%) хондроцитов	9	5 ●●●	6,12 ●●●	8,23 —	8,34 —	8,38 ●●●	6,74 ●●●
NA _{хл} (M±m)	6,1±0,79	3,8±0,7 ●●●	6,2±0,4 ●●●	5,9±0,5 —	6,2±0,6 —	5,3±0,6 —	5,9±0,4 —
h поверхн. зоны хряща (мкм, M±m)	105±2	63±0,6 ***	77±1,4 ***	90±1,2 ***	100±1,1 ***	100±1,5 —	106±2,2 —
h хряща (мкм, M±m)	475±1,3	356±1,5 ***	369±2,5 ***	392±2,1 ***	415±2,1 ***	464±6,5 —	468±0,5 —

Примечание: *** достоверные различия между сериями по критерию Стьюдента ($p < 0,001$), ●●● достоверные различия между сериями по критерию Вилкоксона ($p < 0,05$), жирным шрифтом выделены достоверные различия с контролем ($p < 0,05$), для параметров Vv, NA – по критерию Вилкоксона, h хряща и его поверхностной зоны – по критерию Стьюдента; — различия между сериями не достоверны.

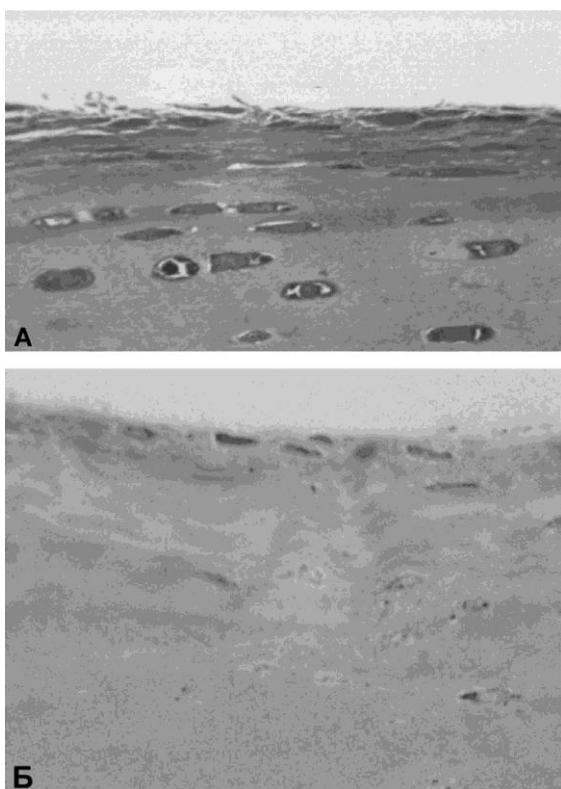


Рис. 1. Поверхностная зона суставного хряща через 28 дней дистракции. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Микрофото. Об.- 40; ок.- 12,5х. А - 1 серия опытов. Б - 2 серия опытов

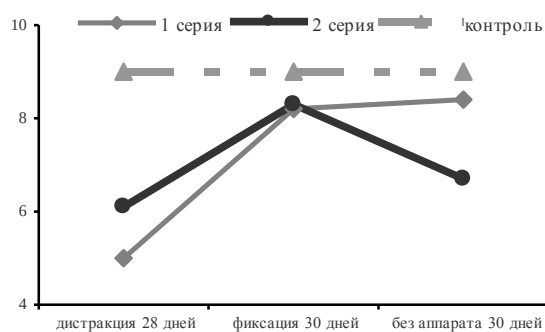


Рис. 2. Объемная плотность (%) хондроцитов в суставном хряще бедренной кости

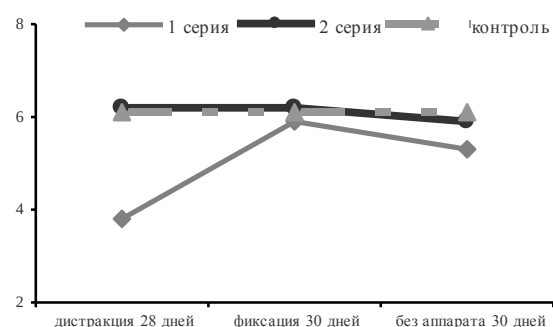


Рис. 3. Численная плотность хондроцитов в суставном хряще бедренной кости

В средней зоне отмечено увеличение количества двух-, четырехчленных изогенных групп, что указывало на повышение пролиферативной активности клеток. Величина пула пролиферирующих хондроцитов на 24% выше контроля (рис. 4).

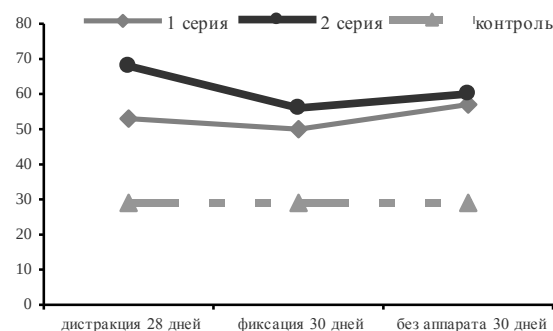


Рис. 4. Величина (%) пула пролиферирующих хондроцитов в суставном хряще бедренной кости

В базальной зоне было отчетливо выражена базофилия межклеточного вещества вокруг изогенных групп (территориальный матрикс), что косвенно свидетельствовало о повышении функциональной активности хондроцитов. Базофильная линия не нарушена.

Во 2 серии животные также пользовались удлиненной конечностью, приступая на нее в стойке или при ходьбе, но наблюдался слабо выраженный отек параоссальных тканей. В коленном

суставе определялась умеренная сгибательная контрактура. В большей части наблюдений стопа была близка к эквинусному положению.

Макроскопически суставной хрящ был матовый, местами шероховатый. Морфометрически отмечено достоверное ($p < 0,01$) уменьшение высоты хряща на 23% по сравнению с контролем. Численная плотность хондроцитов поверхностной зоны была незначительно ниже контроля (рис. 3), клетки уплощены. Объемная плотность хондроцитов была в 1,6 раза ниже, чем в контрольной серии (рис. 2). Бесклеточная пластинка была разрушена, межклеточное вещество поверхностной зоны теряло свою гомогенность, начала выявляться его фибриллярная структура (рис. 1Б). Окраска метиленовым синим выявляла слабую метахромазию межклеточного вещества в участках разволокнения. В средней зоне численная плотность клеток достоверно увеличивалась ($p < 0,05$) на 15% по сравнению с контролем за счет увеличения числа двух- и четырехчленных изогенных групп. Величина пула пролиферирующих хондроцитов была на 39% выше контроля (рис. 4).

Через 30 дней фиксации все собаки 1 и 2 серий практически полностью нагружали оперированную конечность, амплитуда движений в коленном суставе приближалась к норме и составляла 90-100°.

Макроскопически суставной хрящ был матовый, местами истончен, с бледно-фиолетовыми пятнами. При количественном исследовании в 1 серии отмечено достоверное ($p < 0,001$) уменьшение высоты хряща на 18% по сравнению с контролем (табл. 1). Отсутствовала бесклеточная пластинка, была нарушена гомогенность межклеточного вещества поверхностной зоны, выявлены участки разволокнения; часть хондроцитов отличалась большими размерами и округлой формой (рис. 5А).

В большинстве случаев при окраске метиленовым синим межклеточное вещество поверхностной зоны было ортохроматичным. В средней и базальной зонах была выражена слабая метахромазия территориального матрикса. Численная плотность хондроцитов на 7% меньше, чем в контроле. Обнаружено достоверное ($p < 0,05$) повышение объемной плотности хондроцитов по сравнению со сроком 28 дней дистракции (рис. 2), различия с контролем по этому параметру были недостоверны ($p > 0,05$). Величина пула пролиферирующих хондроцитов на 21% выше контроля (рис. 4). Базальная зона сохраняла обычное строение.

Во 2 серии хрящ местами имел темно-фиолетовую окраску, был истончен, в некоторых случаях отмечали эрозии по боковой поверхности мыщелка. При количественном морфологическом исследовании выявлено уменьшение высоты хряща на 13% по сравнению с

контролем (табл. 1). Бесклеточная пластинка была разрушена, на поверхности хряща встречались открытые лакуны хондроцитов, как пустые, так и с обнаженными клетками. Матрикс поверхностной зоны терял гомогенность, выглядел зернистым, отмечено разволокнение (рис. 5Б).

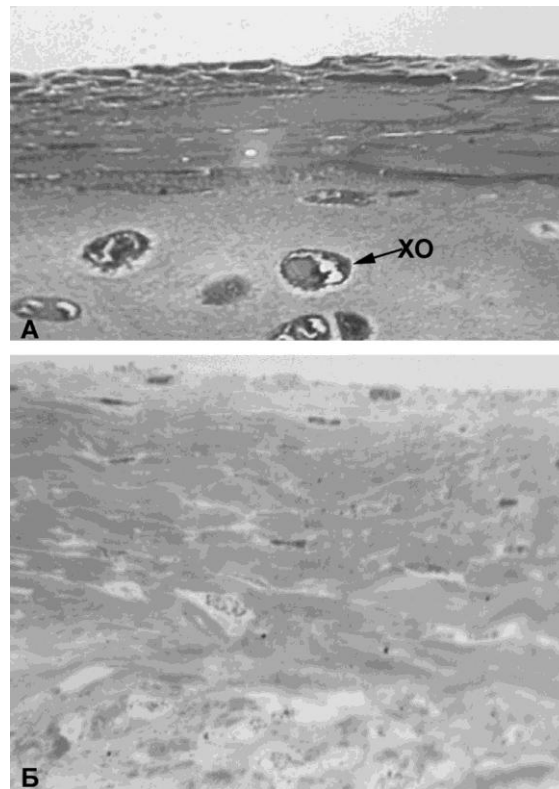


Рис. 5. Поверхностная зона суставного хряща через 30 дней фиксации. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Микрофото. Об. 40; ок. 12,5х. А - 1 серия опытов, стрелкой показан хондроцит округлой формы (ХО). Б - 2 серия опытов

В окрашенных метиленовым синим препаратах обнаруживалась метахромазия неодинаковой интенсивности в топографически различных участках межклеточного вещества. В поверхностной зоне с ее гранулярно-волокнистым матриксом мелкоочечные участки метахромазии выявлялись на поверхности демаскированных пучков коллагеновых волокон. В промежуточной зоне матрикс сохранял гомогенный вид, но небольшие ортохроматически окрашенные участки в нем соседствовали с обширными слабо метахроматичными полями. Глубокая зона отличалась выраженной высокоинтенсивной метахромазией территориального матрикса и присутствием в межтерриториальном матриксе участков с метахроматической реакцией как слабой, так и средней интенсивности.

Параллельно с признаками деструктивных процессов обнаружено увеличение пролиферации хондроцитов в поверхностной зоне. Величина пула пролиферирующих хондроцитов составляла 56% (рис. 4). Численная плотность клеток досто-

верно не отличалась от контроля. Базофильная линия отчетливо выражена, не нарушена.

Через месяц после снятия аппарата функция коленного сустава собак обеих серий эксперимента не отличалась от исходных значений, животные в полном объеме пользовались оперированной конечностью. Макроскопически в обеих сериях отмечали блестящие гладкие суставные поверхности жемчужно-белого цвета.

В 1 серии 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, бесклеточная пластинка сохранена, межклеточное вещество поверхностной зоны было гомогенным (рис. 6А), ортохроматичным. В средней зоне преобладали двух- и четырехчленные изогенные группы клеток. Величина пула пролиферирующих хондроцитов составляла 57%. Морфометрический анализ показал, что объемная и численная плотность хондроцитов по зонам существенно ($p > 0,05$) не отличалась от контроля (табл. 1). Базофильная линия была отчетливо выражена, непрерывна.

Во 2 серии высота хряща была близка к высоте хряща интактных животных (табл. 1). Структура не нарушена, присутствовала бесклеточная пластинка (рис. 6Б), лишь в одном случае сохранялось разволокнение верхней 1/3 поверхностной зоны. Морфометрически обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) уменьшение объемной плотности клеток во всех зонах хряща по сравнению с контролем (рис. 2). Численная плотность клеток существенно не отличалась от контрольной серии ($p > 0,05$). Величина пула пролиферирующих хондроцитов составляла 60% (рис. 4).

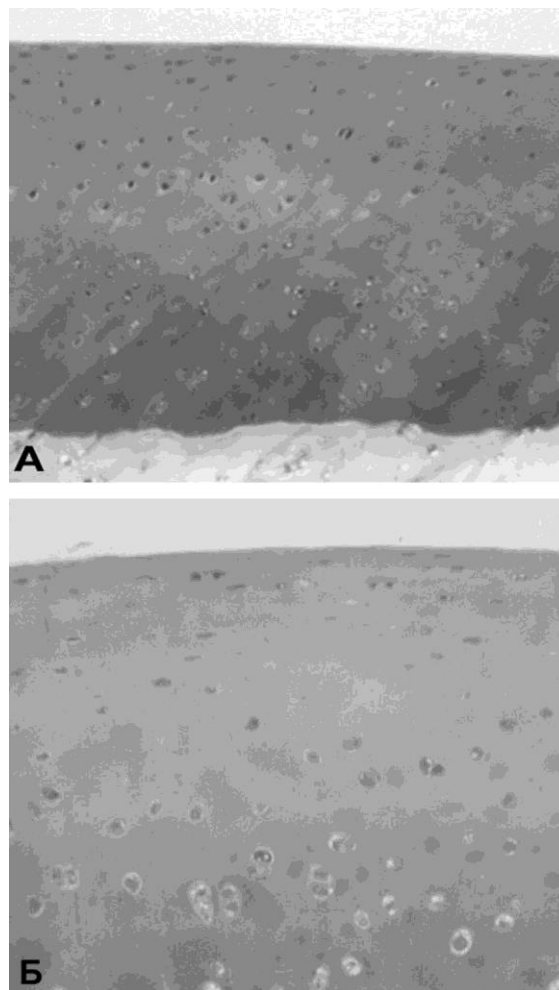


Рис. 6. Суставной хрящ через месяц после снятия аппарата, полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Микрофото. Об. 6,3; ок. 12,5х. А - 1 серия опытов, Б - 2 серия опытов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что в период удлинения голени в суставном хряще собак обеих серий происходили аналогичные изменения: в конце дистракции отмечено уменьшение высоты хряща, дезорганизация межклеточного вещества поверхностной зоны, разрушение бесклеточной пластинки, уменьшение объемной и численной плотности хондроцитов, которое сопровождалось повышением пролиферативной активности оставшихся клеток.

В период фиксации в обеих сериях также сохранялось сниженное значение высоты хряща, отмечены очаги разволокнения, наблюдалось увеличение численной, объемной плотности клеток по сравнению с предыдущим сроком эксперимента. По сравнению с контролем значения этих параметров оставались сниженными, увеличивался пул пролиферирующих хондроцитов, что свидетельствовало о повышении функ-

циональной и пролиферативной активности хондроцитов.

На протяжении всего эксперимента в обеих сериях отмечали метахромазию в участках разволокнения поверхностной зоны, что косвенно свидетельствовало о дезорганизации межклеточного вещества и увеличении концентрации освободившихся кислых групп гликозаминогликанов, дающих реакцию метахромазии [14].

Возможность анализировать интенсивность метахромазии позволяет в топографически различных участках хряща определять природу химических сдвигов, так как известна [13] зависимость устойчивости и степени выраженности реакции от плотности расположения свободных анионных групп в молекулах субстрата.

Интенсивность деструктивно-репаративных процессов была выше при ручной подкрутке, что, вероятно, связано с большей, чем при автодистракции, величиной одномоментного удли-

нения и более выраженным снижением двигательной активности, результатом которого является изменение величины и периодичности циклических нагрузок на суставной хрящ и неизбежное нарушение диффузионно-нагрузочного механизма снабжения его трофическими и пластическими веществами [8]. По результатам биохимических исследований, степень деструктивных изменений гиалинового хряща определяется темпом и дробностью тракции.

У животных 2 серии на протяжении всего эксперимента уменьшение высоты хряща происходило в меньшей степени, чем в 1 серии, что, вероятно, обусловлено более выраженной дезорганизацией межклеточного вещества поверхностной зоны, накоплением и перераспределе-

нием гидрофильных гликозаминогликанов, в результате чего возникает набухание основного вещества и коллагеновых волокон [14].

Через месяц после снятия аппарата высота хряща в обеих сериях была близка к высоте хряща интактных животных. Возврат к двигательному стереотипу способствовал восстановлению структуры суставного хряща.

Таким образом, проведенные патоморфологические исследования и анализ количественных данных позволили выявить общие закономерности изменений морфофункционального состояния суставного хряща при удлинении голени в обеих сериях и показали, что применение автодистракции для суставного хряща было более щадящим.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов, Г.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблунчанский, 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. Грачева, Л.И. Механохимия суставного хряща при коррекции патологии опорно-двигательного аппарата: Дис... канд. хим. наук / Л.И. Грачева. - Курган, 1992. - 154с.
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. Биохимический тест на изменение суставного хряща при удлинении конечности / Л.И. Грачева, А.В. Попков, С.А. Ерофеев // Ортопед., травматол. - 1994. - №4. - С. 111-111.
6. Гайдышев, И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник / И.П. Гайдышев. - СПб.: Питер, 2001. - 752с.
7. Дегенеративно-дистрофические изменения суставного хряща и способ их фармакологической коррекции / К.С. Десятниченко, С.Н. Лунова, А.А. Ларионов, С.Н. Асонова // Гений ортопедии. - 1998. - № 1. - С. 28 - 32.
8. Дедух, Н.В. Скелетные ткани: Руководство по гистологии / Н.В. Дедух, Е.Я. Панков. - СПб.: СпецЛит, 2001. - Т.1. - 496 с.
9. Илизаров, Г.А. Значение факторов напряжения растяжения в генезе тканей и формообразовательных процессах при чрескостном остеосинтезе / Г.А. Илизаров // Чрескостный остеосинтез в ортопедии и травматологии: Сб. науч. тр. - Курган, 1984. - Вып. 9. - С. 4-41.
10. Морфология суставного хряща при остеоартрозе / Т.Н. Копьева, О.Б. Бельская, М.Г. Астапенко, А.Г. Арутюнов // Архив патологии. - 1986. - №2. - С. 40-46.
11. Непомнящих, Л.М. Морфометрия и стереология гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушников, Г.И. Непомнящих. - М.: Наука, 1986. - 159с.
12. Хрящ / В.Н. Павлова, Т.Н. Копьева, Л.И. Слуцкий, Г.Г. Павлов. - М.: Медицина, 1988. - 320 с.
13. Пирс, Э. Гистохимия / Э. Пирс. - М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1962. - 964 с.
14. Серов, В.В. Соединительная ткань / В.В. Серов, А.Б. Шехтер. - М.: Медицина, 1981. - 312 с.
15. Уикли, Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. - М.: Мир, 1975. - 324 с.
16. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. - М.: Медицина, 1975. - 295с.
17. Биохимические и биомеханические изменения суставного хряща при многоэтапном удлинении конечности у собак / В.И. Шевцов, С.Н. Лунова, А.А. Ларионов и др. // Гений ортопедии. - 1996. - № 2-3. - С. 147-148.
18. Trias, A. Effect of persistent pressure on the articular cartilage / A. Trias // J. Bone Jt. Surg. - 1971. - Vol. 2. - P. 376-386.

Рукопись поступила 05.01.03.