

УДК 616.728.3-089.873.4: 611.084.1

Морфологічний стан тканин колінного суглоба щурів при змодельованому ендопротезуванні великогомілкової кістки

С.В. Малишкіна, О.А. Нікольченко,
С.Д. Шевченко, В.В. Басв

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І.Ситенка АМН України», Харків

The article deals with the results of a histological examination of the knee joint tissues after an experimental modelling of endoprosthesis in the proximal tibial epiphysis of laboratory rats with an uncompleted growth. It was found out that a unipolar endoprosthesis caused structural disturbances of the articular cartilage in the adjacent (not operated) femoral bone with the retained structure and height of the epiphysial cartilage. Animals of the control group (an injure of the epimetaphysis without any prosthetics) developed an osteochondrous adhesion in the knee joint, the defect area was filled with some fibrillar connective and fibroreticular tissues, the femur revealed pronounced destructive changes in the articular and epiphysial cartilages. The height of their epiphysial cartilage in the controls was reliably less versus the animals from the experimental and intact groups.

В статті представлені результати гистологічного дослідження тканин колінного суглоба після моделювання в експерименті ендопротезування проксимального епіфіза большеберцової кістки у лабораторних щурів з незавершеним ростом. Установлено, що при однополюсному ендопротезуванні в сусідній (неопераційованій) бедренній кістці мають місце порушення структури суглобового хряща, збереження строєння і висоти епіфізарного хряща. У живих контрольній групі (поврежденіе епіметафіза без протезування) в колінному суглобі спостерігається кістко-хрящове зрощення, зона дефекта заповнена волокнистою соединительною і фиброретиккулярною тканинами, в бедренній кістці виявлені виражені деструктивні зміни суглобового і епіфізарного хрящів. У контрольних живих тварин висота епіфізарного хряща була достовірно менше по порівнянню з живими тваринами експериментальної і інтактної груп.

Ключові слова: щури, які ростуть, колінний суглоб, ендопротезування, гістологія

Вступ

Проблема органозберігальних хірургічних втручань, при котрих ушкоджується наросткова зона кінцівки у дітей і спостерігається порушення її росту, є актуальною та значущою як у медико-біологічному, так і в соціальному аспектах. Наростковий хрящ (наросткова пластинка) забезпечує ріст кісток у довжину, обумовлює орієнтацію новоутворених кісткових трабекул енхондральної кістки, сприяє передачі та розподілу силових навантажень у довгій кістці, що росте. Як свідчать результати експериментальних досліджень, ушкодження епіфізарного хряща, які відрізняються об'ємом та топографією, призводять до різних за ступенем прояву порушень росту кінцівки та деформації довгих кісток [6, 9, 10, 11]. Тому стає зрозумілою особлива значимість встановлення межі та виду

допустимого хірургічного втручання на кістці в ділянці наросткового хряща. Питання можливості та доцільності застосування ендопротезів для заміщення післярезекційних суглобових дефектів у дітей залишаються дискусійними [8], а їх вирішення знаходиться у площині пошуку та забезпечення необхідних умов функціонування кінцівки.

Наросткові хрящі у кожному скелетному органі відрізняються розмірами зон та кількістю в них хондроцитів, частотою поділу та пулом клітин, що проліферують, розподілом їх в ізогенних групах [5]. Крім того, існують видові особливості структури та функціонування наросткових пластинок. Так, у щурів у період статевого дозрівання не відбувається «закриття» та припинення росту кісток, що робить цей вид тварин зручним об'єктом

для моделювання клінічної ситуації після резекції пухлини суглобового кінця та його ендопротезування в умовах незакінченого росту кінцівки.

Мета роботи — вивчити структурну організацію тканин колінного суглоба у щурів при змодельованому ендопротезуванні проксимального суглобового кінця великогомілкової кістки.

Матеріал і методи

Робота виконана на 15 білих щурах-самцях (3-місячного віку, живою масою 190–200 г) популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І.Ситенка АМНУ» у трьох групах: інтактні щури (n=5), щури контрольної групи — резекція частини епіфіза та наросткової зони проксимального відділу великогомілкової кістки із частковим збереженням виростків (n=5), щури дослідної групи (n=5) — аналогічна резекція з подальшою імплантацією моделі ендопротеза, який було виготовлено ТОВ «ІНМАЙСТЕРС» (рис. 1 а).

План експериментів, затверджений Комітетом з питань біоетики інституту (протокол № 20 від 15.09.2005 р.), роботу з лабораторними щурами проводили відповідно до вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин...» [4]. Тваринам під загальним знеболюванням (аміназин — 10 мг/кг, кетамін — 50 мг/кг) в умовах асептики латеральним доступом відкривали лівий колінний суглоб (наколінок зміщували у внутрішній бік та виконували артротомію). За допомогою стоматологічного бора створювали епіметафізарний дефект (діаметр 2–3 мм, глибина 10 мм) проксимального епіметафіза великогомілкової кістки — інтрамедулярно. У контрольних щурів дефект залишали без заміщення (рис. 1 б), а дослідним у дефект імплантували модель ендопротеза (рис. 1 в). Вправляли наколінок, пошарово ушивали тканини кінцівки кетгутом та обробляли 5% спиртовим

розчином йоду. Евтаназію тварин виконували шляхом передозування ефіру через 6 місяців після операції.

Обробку матеріалу (колінні суглоби) проводили, керуючись рекомендаціями Д.С.Саркісова, Ю.Л. Перова [8], за стандартними гістологічними методами з декальцинацією матеріалу у 5% азотній кислоті та заключенням у целоїдин. Металеві імпланти видаляли із кістки перед декальцинацією. Мікроскопічні дослідження виконували на фронтальних гістологічних зрізах (6–10 мкм), забарвлених гематоксиліном Вейгерта та еозином. Морфометричний метод був використаний для визначення висоти наросткового хряща (центральні та периферичні ділянки) стегнової та великогомілкової кісток за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15^х (об'єктив $\times 8$) [1]. Отримані цифрові дані були оброблені статистичними методами з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

У післяопераційному періоді всі піддослідні щури впродовж перших двох діб не навантажували оперовану кінцівку, а в період з 4-ї до 5-ї доби повністю відновлювали навантаження. Через 5–6 тижнів у тварин спостерігалось обмеження рухів у оперованому суглобі, а через 6 місяців відмічалось помітне клінічно вкорочення оперованої кінцівки.

При мікроскопічному дослідженні на препаратах колінного суглоба інтактних щурів виявляються виростки стегнової та великогомілкової кісток, а також бічний меніск, котрі покриті гіаліновим хрящем. В центральній частині латерального меніска розташована губчаста кістка (рис. 2 а). Гіаліновий хрящ виростків кісток колінного суглоба має характерну для норми структурну організацію. В ньому виділяється три зони (поверхнева, проміжна та глибока) із властивою для кожної зони будовою хондроцитів.



Рис. 1. Загальний вигляд моделі ендопротеза проксимального епіметафіза великогомілкової кістки щурів (а), фотовідбитки рентгенограм задніх кінцівок щура контрольної групи (б) та дослідної групи (в) через 6 місяців після операції

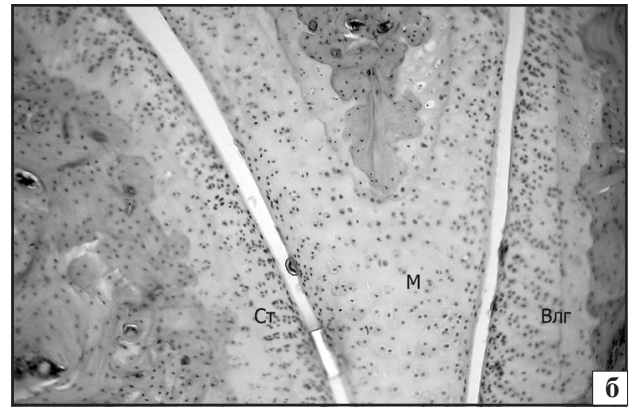
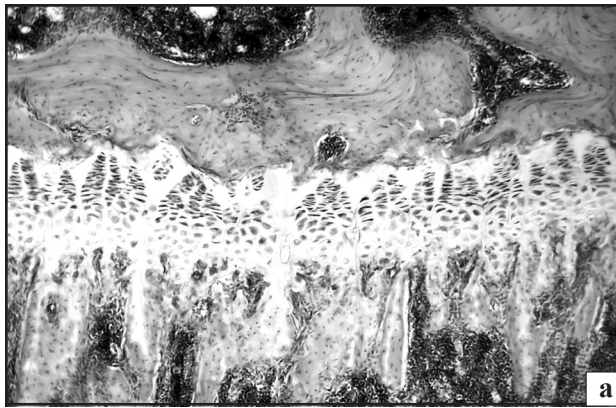


Рис. 2. Мікрофотографії препаратів шурів інтактної групи. Гематоксилін-еозин. Зб. 80: а) суглобові поверхні стегнової (Ст), великогомілкової (Влг) кістки колінного суглоба та бічний меніск (М); б) наростковий хрящ стегнової кістки колінного суглоба з чіткими колонками хондроцитів та характерною зональністю клітин у колонках

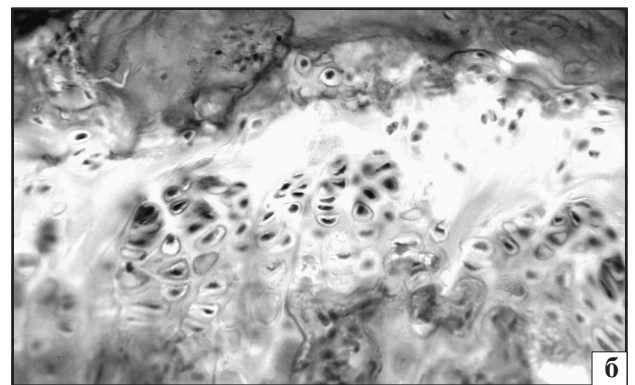


Рис. 3. Мікрофотографії препаратів шурів контрольної групи (резекція частини епіметафіза великогомілкової кістки). Гематоксилін-еозин: а) хрящова тканина без позиційної специфічності, яка заповнює суглобову щілину між стегною та великогомілковою кісткою. Зб. 200; б) ділянка наросткового хряща великогомілкової кістки з порушеною структурою колонок, дистрофічними змінами в хондроцитах. Території без клітин у зонах збереженого хряща та проліферації. Зб. 400

У наростковому хрящі обох кісток інтактних шурів чітко визначаються зони збереженого хряща, проліферації, зрілого (гіпертрофованого) хряща та зона хряща, який кальцифікується (рис. 2 б). Місцями у цій зоні спостерігаються кровоносні судини, що проростають з боку метафіза. Поблизу таких судин розташовуються осередки остеогенезу, а подекуди — ділянки резорбції хряща. У наростковому хрящі на периферії (в обох кістках) зони проліферації клітин та гіпертрофованого хряща мають більшу щільність клітин, ніж у центральних ділянках. Ці дані можуть свідчити про більшу функціональну активність периферичних ділянок наросткового хряща, ніж центральних. На різну активність периферичних та центральних ділянок наросткової пластинки вказується у дослідженнях Г.Г. Василика та L. Khaldi et al., які вивчали вплив травматичних ушкоджень наросткового хряща та довготривалої дії кальцитоніну на ріст довгих кісток експериментальних тварин [2, 11].

При виконанні морфометричних досліджень встановлено, що висота наросткового хряща дистального відділу стегнової кістки інтактних шурів

($432,5 \pm 13,2$ мкм) достовірно не відрізняється від висоти ($456,2 \pm 14,1$ мкм) хряща проксимального відділу великогомілкової кістки.

Шури контрольної групи — резекція частини епіметафіза великогомілкової кістки. На препаратах зрізів колінних суглобів контрольних шурів суглобова щілина практично не виявляється. На більшій частині її території вона заповнена хрящовою тканиною, яка розповсюджується із ушкодженого епіметафіза великогомілкової кістки (рис. 3 а). Хрящова тканина без позиційної специфічності зростається з менісками та суглобовим хрящем стегнової кістки. Лише на невеличких ділянках відмічається простір суглобової щілини.

У ділянці змодельованого дефекту великогомілкової кістки спостерігаються залишки зруйнованої субхондральної кістки, поряд з якими розташовуються осередки грануляційної тканини з розширеними кровоносними судинами, волокнистої сполучної та фіброретикулярної тканини. Наростковий хрящ відмічається лише на невеличких ділянках по периферії. Він представлений декількома колонками хондроцитів, які мають

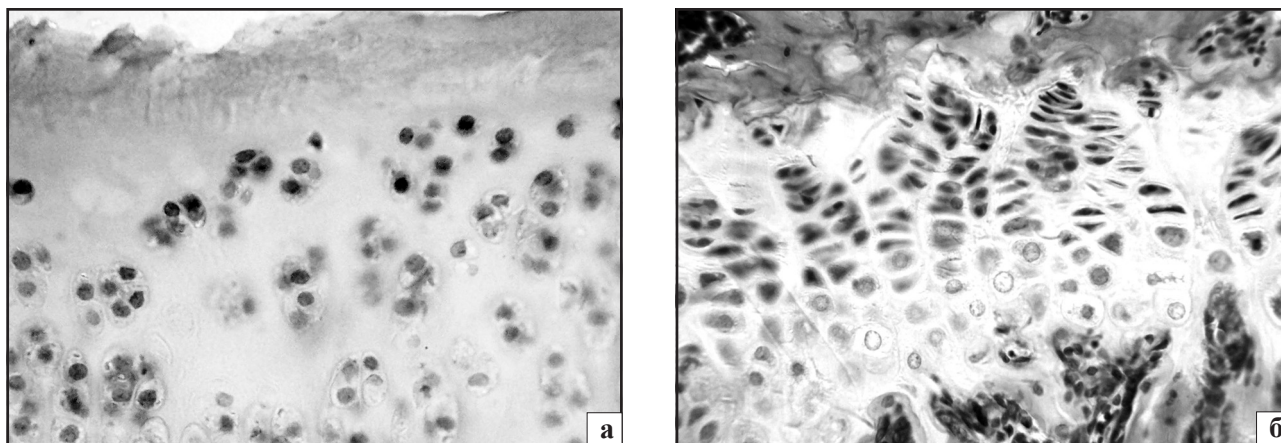


Рис. 4. Мікрофотографії препаратів щурів контрольної групи (резекція частини епіметафіза великогомілкової кістки). Ділянки хряща стегнової кістки. Гематоксилін-еозин. Зб. 400: а) суглобовий хрящ у ділянці збереженої суглобової щілини з вираженими деструктивними змінами у поверхневій зоні; б) ділянка збереженого наросткового хряща з колонками хондроцитів. Незначне порушення щільності хондроцитів у колонках. Кровоносні судини у зоні гіпертрофованих клітин

нерівномірну ширину та щільність клітин у зонах. Більш виражена зона гіпертрофованого хряща. Клітини зони збереженого хряща та проліферації практично відсутні (рис. 3 б).

Компактна кісткова тканина кортексу великогомілкової кістки з явищами перебудови — порушена її гістоархітектоніка, відмічаються поодинокі осередки резорбції, виповнені волокнистою тканиною. Місцями змінена орієнтація кісткових судинних каналів та остеонів. Деякі судинні канали розширені і виповнені волокнистою тканиною. Визначаються ділянки без остеоцитів.

Суглобовий хрящ стегнової кістки виявляється уздовж всієї суглобової поверхні. Структурна організація хряща мозаїчно змінена. Там, де суглобовий хрящ зростається з хрящовою тканиною, яка виповнює суглобову щілину, по його поверхні відмічається гіперплазія хондроцитів. Цитоархітектоніка інших зон хряща порушена. У ділянках збереженої суглобової щілини деструктивні зміни у суглобовому хрящі виявляються переважно у поверхневій зоні. Поверхня хряща нерівномірна, місцями розшарована, хондроцити на ділянках відсутні (рис. 4 а). Подекуди спостерігається порушення цілісності базофільної лінії.

Субхондральна кістка потовщена. Проте щільність остеоцитів по поверхні кісткових трабекул незначна. Місцями вони відсутні. Кровоносні судини з боку епіфіза врастають у наростковий хрящ, який виявляється по всій ширині метафіза. В колонках хондроцитів відмічаються всі зони, проте щільність клітин у зонах по території хряща різна — частіше спостерігається зменшення їх щільності у зоні збереженого хряща та збільшення в зоні гіпертрофованого хряща (рис. 4 б). Подекуди кровоносні судини проростають у його товщу з боку діафіза (рис. 4 б). Зафіксовано достовір-

не зменшення висоти наросткового хряща при порівнянні з інтактними тваринами (інтакт — $432,5 \pm 13,2$ мкм; контроль — $392,4 \pm 11,4$ мкм; $P < 0,05$). Кортекс стегнової кістки має характерну для норми будову.

Ймовірно, що мала територія, котру займають залишки наросткової пластинки в оперованій великогомілкової кістці, та виражені деструктивні зміни у наростковому хрящі стегнової кістки можуть негативно впливати на ріст кістки у довжину. При рентгенометричному дослідженні, результати якого викладені нами у попередній статті, було встановлено, що резекція частини проксимального епіметафіза великогомілкової кістки призводить до порушення росту та зменшення довжини оперованої кінцівки [3].

Дослідні щури — ендопротезування проксимального епіметафіза великогомілкової кістки. На зрізах колінного суглоба дослідних щурів у великогомілкової кістці чітко виявляється місце розташування ендопротеза. Внутрішня стінка каналу у кістці представлена волокнистою тканиною, а ближче до суглобової поверхні — хрящовою тканиною з виражено нерівномірним розташуванням клітин. У структурі кортексу відмічаються реактивні зміни. По території вставних пластинок спостерігається збільшення базофільії цементних ліній та мозаїчне забарвлення матриксу. Переважають остеони дрібних розмірів. Місцями відмічається формування кістковомозкових просторів, заповнених червоним кістковим мозком.

Наростковий хрящ великогомілкової кістки зафіксований лише на периферії метафіза. Він представлений декількома колонками хондроцитів з порушеною структурою — відсутня позиційна специфічність розташування хондроцитів у колонках, змінене співвідношення клітин у колон-

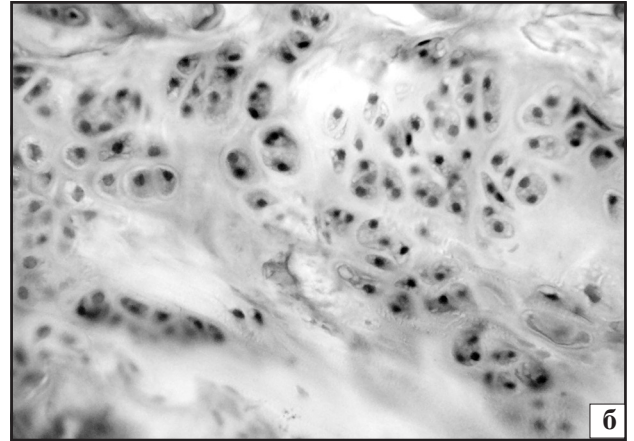
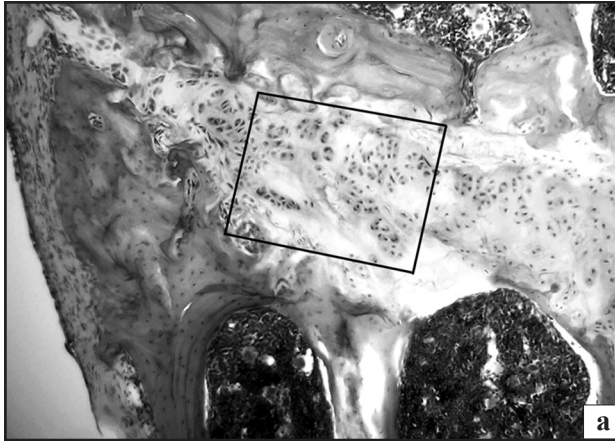


Рис. 5. Мікрофотографії препаратів дослідних шурів (ендопротезування проксимального епіметафіза великогомілкової кістки). Ділянка наросткового хряща великогомілкової кістки шура. Гематоксилін-еозин: а) порушення структури колонок хондроцитів. Зб. 80; б) виражені дистрофічні і деструктивні зміни хондроцитів у колонках. Зб. 400

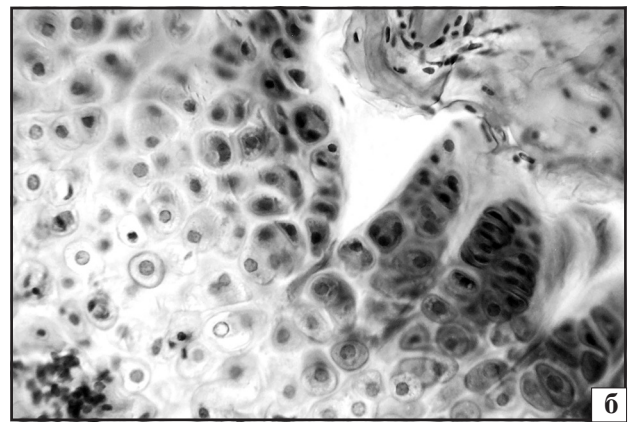
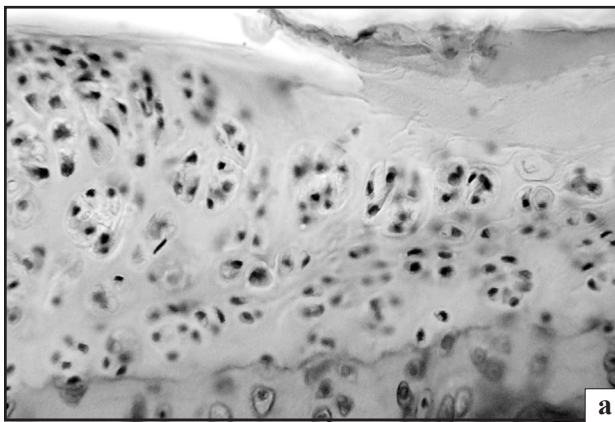


Рис. 6. Мікрофотографії препаратів дослідних шурів (ендопротезування проксимального епіметафіза великогомілкової кістки). Ділянки хряща стегнової кістки. Гематоксилін-еозин: а) суглобовий хрящ стегнової кістки з деструкцією поверхневої зони та порушеною цитоархітектонікою. Зб. 200; б) наростковий хрящ з чіткою структурою колонок хондроцитів та характерним співвідношенням клітин у зонах. Зб. 400

ках. Визначити належність хондроцитів до певних його зон практично неможливо (рис. 5). Відмічається розшарований хрящовий матрикс без хондроцитів.

У кісткових трабекулах метафіза спостерігаються післятравматичні реактивні зміни — мікротріщини, ділянки без хондроцитів, виражена базофілія матриксу.

Сформована поблизу ендопротеза хрящова тканина місцями глибоко проникає у суглобову щілину і зростається з менісками та суглобовим хрящем стегнової кістки. В таких ділянках його структурна організація порушена, особливо у поверхневій зоні, де виявляються поперечні тріщини, ділянки без хондроцитів (рис. 6 а). Базофільна лінія спостерігається уздовж всієї суглобової поверхні. Фронт остеогенезу був нерівномірним лише на невеликих територіях. В таких місцях у зоні хряща, який кальцифікується, розташовуються кровоносні судини та осередки остеогенезу. Проте вони не порушують базофільну лінію. Суб-

хондральна кістка потовщена, її кісткові трабекули широкі і короткі. Наростковий хрящ стегнової кістки спостерігається по ширині всього метафіза. Він має характерну для норми будову з рівномірно розташованими серед кісткової тканини колонками хондроцитів, в яких чітко виявляється зональність та характерне співвідношення клітин у зонах (рис. 6 б). Подекуди у товщі гіпертрофованого хряща відмічаються кровоносні судини та осередки енхондрального кісткоутворення, що свідчить про ріст кістки у довжину. Висота наросткового хряща достовірно не відрізняється від показників інтактних тварин, проте більша за висоту хряща у контрольних тварин (контроль — $392,4 \pm 11,4$ мкм; дослід — $441,7 \pm 15,8$ мкм; $P < 0,05$).

При рентгенометричному дослідженні (результати викладені у нашій попередній статті) було встановлено, що протезування проксимального епіметафіза великогомілкової кістки супроводжувалося достовірним збільшенням довжини кінцівки у порівнянні з контролем [3].

Висновки

Резекція значної частини проксимального епіметафіза великогомілкової кістки зі збереженням кортексу та незначної території суглобової поверхні на периферії призводить до кістково-хрящового зрощення у колінному суглобі. У суглобовому хрящі стегнової кістки виявляються виражені деструктивні зміни із заміщенням ділянок гіалінового хряща волокнистим. Наростковий хрящ дистального відділу стегнової кістки спостерігається по всій ширині, проте має порушення структурної організації. Відмічається достовірне зменшення його висоти. В оперованій кістці наростковий хрящ збережений лише частково і представлений декількома колонками хондроцитів з вираженими деструктивними змінами. Зафіксовані зміни структурної організації суглобового та наросткового хрящів стегнової кістки, а також наросткового хряща великогомілкової кістки є причиною порушення росту кінцівки.

При ендопротезуванні проксимального епіметафіза великогомілкової кістки наростковий хрящ неоперованої (стегнової) кістки збережений по всій ширині і практично без змін структурної організації. Його висота не відрізняється від показника в інтактних тварин та більша за висоту у тварин контрольної групи. Місцями відмічаються ділянки енхондрального остеогенезу. Це свідчить про наявність росту стегнової кістки, що й було зафіксовано при рентгенометричному дослідженні. Проте однополюсне ендопротезування призводить до порушення структури суглобового хряща проти-лежної кістки, що у подальшому може бути причи-

ною розвитку деструктивних змін у субхондральній кістці та наростковому хрящі.

Література

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1990. — С. 384.
2. Васылык Г.Г. О влиянии росткового хряща на рост трубчатых костей в длину / Г.Г. Васылык // Ортопед., травматол. — 1971. — № 5. — С. 24–27.
3. Вплив ушкодження епіфіза та наросткової пластинки кістки на подальший ріст кінцівки після ендопротезування (експериментальне дослідження) / С.Д. Шевченко, В.В. Баєв, С.В. Малишкіна, О.А. Нікольченко // Ортопед., травматол. — 2008. — №4. — С. 62–66.
4. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. — (Міжнародний документ Ради Європи). — Режим доступу до документа: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137
5. Житников А.Я. Зона пролиферации эпифизарного хряща костей конечностей животных с разными темпами и продолжительностью роста // Вісник ортопед., травматол. та протез. — 2007. — № 3. — С. 69–72.
6. Зайченко И.Л. Влияние разных повреждений эпифизарного хряща на рост костей / И.Л. Зайченко // Ортопедия и травматология. — 1940. — № 2. — С. 62–68.
7. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 544 с.
8. Протезирование детей с дефектами конечностей / Под ред. В.И. Филатова. — Л.: Медгиз, 1981. — 280 с.
9. Campbell C.J. The effects produced in the cartilaginous epiphyseal plate of immature dogs by experimental surgical traumata / C.J. Campbell, A. Grisolia, G. Zanconato // J. Bone Joint Surg. — 1959. — Vol. 41-A, № 7. — P. 1221–1242.
10. Key J.A. A study of experimental trauma to the distal femoral epiphysis in rabbits / J.A. Key, L.T. Ford // J. Bone Joint Surg. — 1958. — Vol. 40-A, № 4. — P. 887–896.
11. Morphometric changes in the epiphyseal plate of the growing and young adult male rat after long-term salmon calcitonin administration / L. Khaldi, T. Karachalios, A. Galanos, G.P. Lyritis // Calcif. Tissue Inter. — 2005. — Vol. 76, № 6. — P. 426–432.