

УДК 616.72-018.3-089.227.84:[004.352+612.086.3]-092.9

## СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ СУСТАВНОЙ ПОВЕРХНОСТИ НАРУЖНОГО МЫШЦЕЛКА БЕДРА ПРИ УДЛИНЕНИИ ГОЛЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ступина Т.А.

ФГБУ «Российского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган, e-mail: StupinaSTA@mail.ru

Методами сканирующей электронной микроскопии проведено исследование суставной поверхности наружного мыщелка бедра при удлинении голени у собак аппаратом Илизарова с темпом 1 мм за 8 приемов. Изменение рельефа суставной поверхности при дозированном удлинении голени вызвано деструкцией поверхностной зоны хряща. Степень выраженности изменений и их дискретность по суставной поверхности отражают степень травматичности применяемого режима distraction.

**Ключевые слова:** суставной хрящ, distraction остеосинтез, сканирующая электронная микроскопия.

## SCANNING ELECTRON MICROSCOPY IN STUDYING THE ARTICULAR SURFACE OF FEMORAL LATERAL CONDYLE FOR EXPERIMENTAL LEG LENGTHENING

Stupina T.A.

FSBI «Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: StupinaSTA@mail.ru

The study of the articular surface of femoral lateral condyle performed by scanning electron microscopy (SEM) in the process of canine leg lengthening using the Ilizarov fixator by 1 mm for 8 times. The change in the articular surface relief during graduated leg lengthening was caused by cartilage surface zone destruction. The severity degree of the changes and their discreteness along the articular surface reflect the degree of invasiveness of the distraction mode being used.

**Keywords:** articular cartilage, distraction osteosynthesis, scanning electron microscopy

В последние десятилетия сканирующая электронная микроскопия вошла во многие области науки и техники. Этот метод используют для изучения строения материалов в машиностроении, в электронной промышленности, в биологии, химии и медицине. Исследование морфологии биологических тканей, в том числе изображение поверхности, формы, определение размеров и границ необходимый этап в анализе современных исследований [3, 9, 10]. Преимущество сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) перед другими методами морфологического исследования заключается в возможности одновременного обзора сравнительно большой поверхности с выявлением топографических особенностей и наблюдением ультратонких деталей организации различных тканевых и клеточных элементов.

Из существующих на сегодняшний день методов ортопедического удлинения distraction остеосинтез по Г.А. Илизарову получил международное признание и широкое внедрение в практику, однако вплоть до настоящего времени при его применении остаётся нерешённой проблема функциональной реабилитации пациентов – в частности, восстановление объёма движений в суставах [1, 6]. При distraction остеосинтезе в суставах смежных

с удлинением сегментом методами световой микроскопии и биохимическими методами были выявлены деструктивные изменения хрящевой выстилки [4, 7, 8].

Волокнистая конструкция матрикса суставного хряща методом сканирующей электронной микроскопии подробно описана [9, 11]. Однако исследования состояния суставной поверхности и хондроцитов поверхностной зоны хряща с помощью сканирующей электронной микроскопии в обозначенных экспериментальных условиях отсутствуют.

### Цель исследования

С помощью сканирующей электронной микроскопии изучить состояние суставной поверхности и хондроцитов поверхностной зоны хряща наружного мыщелка бедра при удлинении голени у собак.

### Материалы и методы исследования

Исследован суставной хрящ наружного мыщелка бедренной кости 14 собак – 5 интактных (контроль) и 9 опытных, которым после закрытой флексии остеоклазии проводили удлинение голени в ручном режиме с темпом 1 мм за 8 приемов (эксперимент выполнен д.м.н. С.А. Ерофеевым). Содержание, оперативные вмешательства и эвтаназию животных передозировкой барбитуратов проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных»

(приказы №755 МЗ СССР от 12.08.1977г., №1179 МЗ СССР от 10.10.1983г., №267 МЗ РФ от 19.06.2003г.) и принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986). Манипуляции, проводимые на животных, рассмотрены и одобрены этическим комитетом «РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова». Исследование проводили через 28 дней distraction, 30 дней фиксации, 30 дней после снятия аппарата. Визуально оценивали состояние суставных поверхностей.

Для сканирующей электронной микроскопии вскрывали коленный сустав и с передней поверхности наружного мыщелка бедра вырезали кусочки суставного хряща размером 2-3 x 5-6 мм. Затем материал обрабатывали по разработанному нами способу [5]. Фиксированные в альдегидном фиксаторе кусочки промывали в дистиллированной воде, затем материал дегидратировали в спиртах, пропитывали в камфене (3,3-диметил-2-метиленинбицикло [2, 2, 1] гептан), высушивали на воздухе, напыляли алюминием, медью или серебром в вакуумном напылителе «JEE-4 X/5 B» (Eiko, Япония) и ионном напылителе «IB-6» (Eiko, Япония) и изучали в сканирующем электронном микроскопе «JSM-840» (Jeol, Япония). Для описания топографической картины поверхности клеток использована классификация рельефных образований клеточной поверхности [2].

#### Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании суставного хряща интактных животных макроскопически отмечали блестящие гладкие суставные поверхности жемчужно-белого цвета. При изучении в СЭМ рельеф поверхности суставного хряща имел регулярную волнистость (рис. 1, А) и соответствовал описанной в литературе интактной суставной поверхности мыщелков бедренной кости [9]. При исследовании суставной поверхности на больших увеличениях были обнаружены лакуны без клеток, при этом очаги разволокнения не выявлены (рис. 2, А).

У экспериментальных животных к концу периода distraction суставной хрящ макроскопически был матовый, по боковым поверхностям мыщелков определялись эрозии. При исследовании с помощью СЭМ обнаружены участки со вскрытыми лакунами, часть из них не содержала клеток (рис. 1, Б). Через месяц фиксации голени в аппарате рельеф суставной поверхности наружного мыщелка бедра имел аномальную структуру. Отмечались очаги деструкции поверхностной зоны с разволокнением подлежащего коллагенового каркаса. У обнаженной суставной поверхности лакуны хондроцитов были вскрыты, среди них много пустых лакун (рис. 1, В). Через месяц после снятия аппарата отмечали гладкие суставные поверхности жемчужно-белого цвета. При исследовании в СЭМ деструкция сустав-

ной поверхности наружного мыщелка бедра была выражена в меньшей степени, чем на предыдущих этапах эксперимента. Определялись обширные участки с регулярной волнистостью, уменьшены частота встречаемости и объем участков разволокнения, выявлены участки, в которых были отмечены вскрытые клеточные лакуны, как пустые, так и с хондроцитами (рис. 1, Г).

Исследование поверхностной зоны суставного хряща с помощью СЭМ показало, что в контроле (у интактных животных) хондроциты имели узко- продолговатую форму (рис. 2, Б), микрорельеф клеточной поверхности складчатый, краевые микроворсины немногочисленны, клетки располагались в четко выраженных лакунах, вытянутых по направлению хода волокон (рис. 2,Б).

Для опытов с удлинением голени в неповрежденных участках суставной поверхности в более глубоких слоях поверхностной зоны были характерны хондроциты сферической формы (рис. 2 В, Г), причём наиболее часто такие формы встречались на этапе фиксации голени в аппарате. Хондроциты были увеличены в размерах и занимали всю клеточную лауну. Поверхность таких клеток имела смешанный тип микрорельефа, состоящего из складок и краевых микроворсинок, которые участвовали в формировании контакта с межклеточным веществом (рис. 2, В), отмечены хондроциты с пузырчатый типом микрорельефа (рис. 2, Г).

Известно, что по характеру и развитию органелл клетки поверхностной зоны хряща в норме относят к высокодифференцированным, но малоактивным хондроцитам, выполняющим роль механоцитов [9]. Форма и микрорельеф хрящевых клеток поверхностной зоны интактных животных, вероятно, обусловлены выполняемой функцией.

В условиях эксперимента выявлено разволокнение суставной поверхности. Известно, что разволокнение межклеточного вещества хряща происходит при уменьшении содержания протеогликанов. Хондроцит обладает значительной чувствительностью к содержанию протеогликанов в окружающем матриксе и быстро реагирует на их изменение [9, 12, 13].

Увеличение размеров хондроцитов в неповрежденных участках поверхностной зоны, изменение их формы и рельефа клеточной поверхности свидетельствовало об усложнении структуры хрящевых клеток и повышении их функциональной активности в условиях эксперимента.

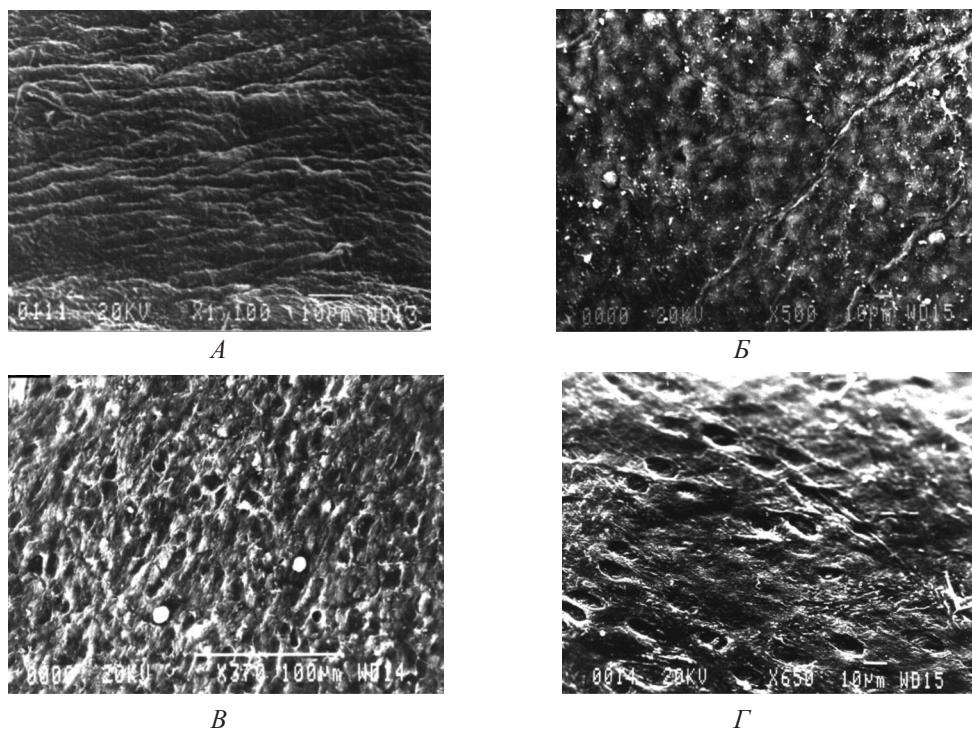


Рис. 1. Суставная поверхность наружного мыщелка бедра собаки. СЭМ. А – контроль. Увеличение 1100. Б – 28 суток дистракции. Увеличение 500. В – 30 суток фиксации. Увеличение 370. Г – 30 суток без аппарата. Увеличение 650

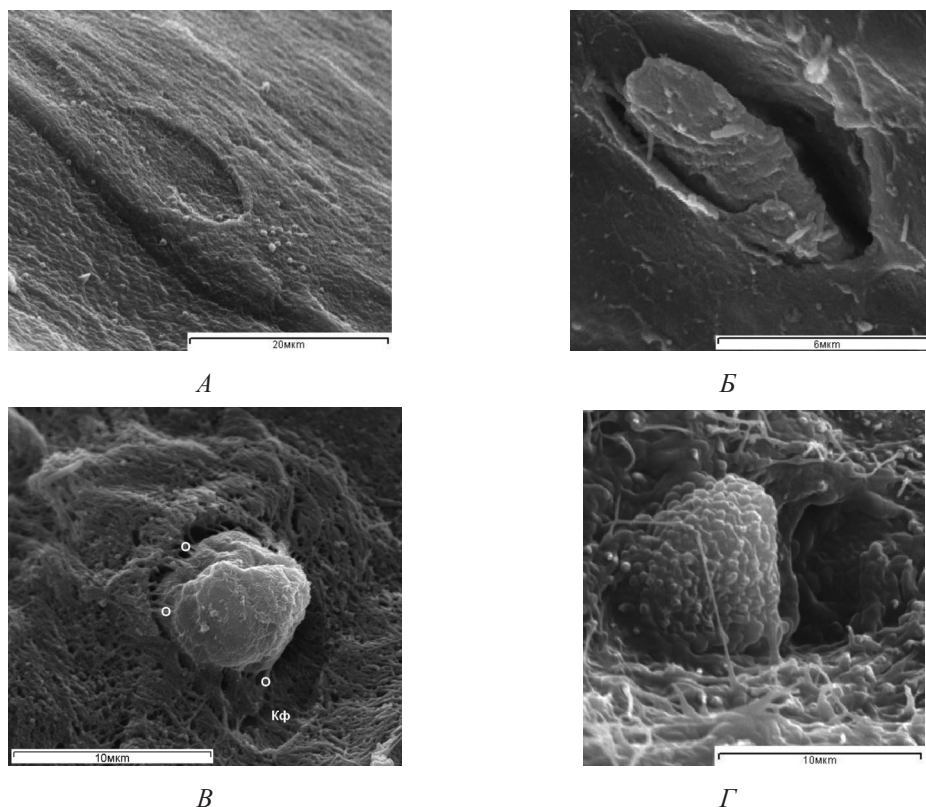


Рис. 2. Поверхностная зона суставного хряща наружного мыщелка бедра собаки, СЭМ. А – контроль, пустая лакуна. Увеличение 2300. Б – контроль, хондроцит имеет складчатый тип микрорельефа. Увеличение 8500. В – 30 суток фиксации, хондроцит имеет смешанный тип микрорельефа, состоящего из складок и микроворсинок, многочисленные отростки (О) контактируют со стенкой лакуны. Коллагеновые фибриллы лакуны (Кф). Увеличение 4300. Г – 30 суток фиксации, хондроцит имеет пузырчатый тип микрорельефа. Увеличение 4500



### Заключение

Изменение рельефа суставной поверхности наружного мыщелка бедра при дозированном удлинении голени вызвано деструкцией поверхностной зоны хряща. Степень выраженности изменений и их дискретность по суставной поверхности отражают степень травматичности применяемого режима distraction. Полученные с помощью СЭМ данные о состоянии суставного хряща необходимо учитывать в клинике с целью предупреждения развития в нем патологического процесса.

### Список литературы

1. Аранович А.М., Диндиберя Е.В., Климов О.В., Новиков К.И. Ошибки и осложнения при удлинении голени у больных ахондроплазией // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 1. – С. 36–37.
2. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов [под ред. О.В. Волковой, В.А. Шахламова, А.А. Миронова] М.: Медицина, 1987. – 464 с.
3. Ганцев Ш.Х., Соломенный С.В., Ишмуратова Р.Ш., Кзыргалин Ш.Р., Халикова Л.В., Сафаров И.М., Хатмуллин А.А. Применение растровой электронной микроскопии высокого разрешения в наноанатомических исследованиях брюшины [Электронный ресурс] // Креативная онкология и хирургия. – 2014. – № 1. – URL: <http://eoccosurg.com/primenenie-rastrovoj-e-lektronnoj-mikroskopii-vy-sokogo-razresheniya-v-nanoanatomicheskikh-issledovaniyah-bryushiny>.
4. Матвеева Е.Л., Русова Т.В., Ерофеев С.А., Шрейнер А.А. Изменения показателей углеводного компонента протеогликанов тканей коленного сустава при удлинении голени у собак // Гений ортопедии – 1997. – № 1. – С. 71–73.
5. Патент РФ №2008150910/12, 20.08.2010. Силантьева Т.А., Горбач Е.Н., Ирьянов Ю.М., Ступина Т.А., Варсегова Т.Н. Способ подготовки образцов биологических тканей для исследования в сканирующем электронном микроскопе // Патент России № 2397472. 2008. Бюл. № 23.
6. Попков А.В., Попков Д.А. Особенности функционального восстановления после оперативного лечения детей с врожденным укорочением нижних конечностей // Гений ортопедии. – 2008. – № 1. – С. 19–26.
7. 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.
8. Ступина Т.А., Щудло М.М. Суставной хрящ: изменения при чрескостном distractionном остеосинтезе, физиологическая и репаративная регенерация // Гений ортопедии. – 2012. – № 4. – С. 137–141.
9. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение [под ред. В.Н. Павловой, Г.Г. Павлова, Н.А. Шостак, Л.И. Слуцкого]. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011. – 552 с.
10. Ясников И.С., Нагорнов Ю.С., Горбачев И.В., Микеев Р.Р., Садовников П.С., Шубчинская Н.Ю., Аминаров А.В. Сканирующая электронная микроскопия как метод изучения микроскопических объектов электролитического происхождения // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 1 (часть 3). – С. 758–764.
11. Clark J.M. The organization of collagen fibrils in the superficial zone of articular cartilage // J. Anatomy. – 1990. – Vol. 171. – P. 117–130.
12. Hesse J. Zur Regenerationsfähigkeit von Gelenknorpel // Anat. Anz. – 1989. – Vol. 168. № 1. – P. 64.
13. Takahashi I., Onodera K., Bae J.W. Agerelated changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats // J. Mol. Histology. – 2005. – Vol. 5. – P. 355–366.