

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАТРИКСА АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ ВЗРОСЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ СОБАК ПРИ УДЛИНЕНИИ КОНЕЧНОСТИ МЕТОДОМ ЧРЕСКОСТНОГО ДИСТРАКЦИОННОГО ОСТЕОСИНТЕЗА

Горбач Е.Н.

ФГБУ «РНЦ "ВТО" им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития России, Курган, Россия (640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6), gorbach.e@mail.ru

Проведено исследование содержания и распределения различных классов гликозаминогликанов, гликопротеинов, белковых компонентов в тканях ахиллова сухожилия взрослых беспородных собак в условиях удлинения голени на 15–17% методом Илизарова в ручном режиме с суточным темпом 1 мм за 4 приема. Ткани ахиллова сухожилия изучали по окончании периода distraction (28 суток), через 30 суток фиксации конечности аппаратом Илизарова и через 30 суток после его демонтажа. С использованием комплекса методов гистохимических исследований, рентгеновского электронно-зондового микроанализа, сканирующей электронной микроскопии выявлено, что растягивающая нагрузка с суточным темпом 1 мм за 4 приема не приводит к срыву механизмов саморегуляции и необратимым деформациям тканей ахиллова сухожилия. Пик биосинтетической активности и накопление компонентов, формирующих внеклеточный матрикс ахиллова сухожилия, приходится на постдистракционный период.

Ключевые слова: ахиллово сухожилие, чрескостный distraction остеосинтез, гликозаминогликаны, гликопротеины, фибрилlogenез.

HISTOCHEMICAL FEATURES OF ACHILLES TENDON MATRIX IN ADULT DOGS DURING LIMB LENGTHENING USING TRANSOSSEOUS DISTRACTION OSTEOSYNTHESIS

Gorbach E.N.

FSI Russian Ilizarov Scientific Centre Restorative Traumatology and Orthopaedics of the Ministry of Health and Social Development», Kurgan, Russia (640014, Kurgan, 6 M. Ulianova street) gorbach.e@mail.ru

The content and distribution of different classes of glucosamine glycans, glycoproteins, protein components in the Achilles tendon tissue of adult dogs was studied in the conditions of 15-17% lengthening from the initial tibial size with the Ilizarov method using manual regime of 1 mm produced with 4 steps. The Achilles tendon tissues were examined at the end of distraction (28 days), 30 days following fixation with the Ilizarov apparatus and 30 days after its removal. The study that used histochemistry method, radiographic electron probe microanalysis and scanning electron microscopy revealed that the stretching force of 1 mm for 4 increments did not break self-regulation mechanisms and does not result in irreversible deformities in the Achilles tendon tissues. The peak of biosynthetic activity and accumulation of the components that form extracellular matrix of the Achilles tendon is in the postdistraction period.

Key words: Achilles tendon, transosseous distraction osteosynthesis, glycosaminoglycans, glycoproteins, fibrillogenesis.

Введение

Изучение закономерностей гистогенеза сухожилий мышц конечности, удлиняемой методом чрескостного distraction остеосинтеза, представляет интерес как для ортопедической практики (успех коррекции укорочений конечности зависит от состояния ее мышечно-сухожильного комплекса [1]), так и в теоретическом аспекте (исследования,

посвященные морфогенезу соединительной ткани сухожилий, в данных условиях, несмотря на многолетний научный опыт, единичны и требуют дальнейшего изучения).

В отдельных публикациях ткань сухожилия рассматривают как высокоупорядоченный макромолекулярный композитный материал, состоящий в основном из коллагеновых волокон, погруженных в желеподобную матрицу из кислых мукополисахаридов [3]. Такая структура обеспечивает сухожилию высокие прочностные и эластические свойства [7]. Биомеханические свойства сухожилия формируют коллагеновые и эластические волокна, протеогликаны и гликопротеины, особенности цитоархитектоники клеток [6; 9]. Основную роль при этом играют коллагеновые волокна. Важное значение в формировании ткани сухожилия имеют сульфатированные гликозаминогликаны и протеогликановые комплексы. Протеогликановые мостики связывают друг с другом коллагеновые фибриллы, обеспечивая их лабильность и взаимостабилизацию [5]. Соединительная ткань, и в частности ее внеклеточный матрикс, – сложнейшая многокомпонентная система. Высокая степень организованности и упорядоченности ее межклеточного матрикса выражается специфическими количественными соотношениями образующих его биополимеров. Любые отклонения от этих специфических соотношений не могут не повлечь за собой нарушений структуры и функций соединительной ткани [4].

Ахиллово сухожилие играет важную роль в организации локомоторной функции конечности (ходьбе, беге, прыжках). Знание особенностей гистоструктурных изменений, происходящих в данном сухожилии на каждом из этапов чрескостного дистракционного остеосинтеза, очень важно для общей оценки функционального состояния конечности.

Цель настоящего исследования – провести комплексную оценку гистохимических процессов, объясняющих механизмы гистогенеза ахиллового сухожилия в разные периоды чрескостного дистракционного остеосинтеза по Г.А. Илизарову.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования послужило ахиллово сухожилие 14 взрослых (1–3 года) беспородных собак, которым осуществляли флексионную остеоклазию берцовых костей и через 5 суток после операции начинали удлинение голени путем осуществления ручных подкруток гаек по стержням (суточный темп удлинения – 1 мм за 4 приема) (эксперименты выполнены совместно с к.в.н. А.А. Емановым). Величина удлинения голени составляла $17,6 \pm 0,4\%$. Животных выводили из опыта через 28 суток дистракции, 30 суток фиксации, 30 суток после снятия аппарата. Уход, оперативные вмешательства, эвтаназию животных осуществляли в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения РФ к работе экспериментально-биологических клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных

животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». В качестве контроля исследовали ахиллово сухожилие 6 интактных собак.

Часть материала фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезвоживали и заливали в парафин. Сульфатированные гликозаминогликаны (ГАГ) на гистологических срезах ахиллова сухожилия выявляли окрашиванием их альциановым синим с рН 1,0, несulfатированные ГАГ – с рН 2,5. Постановкой ШИК-реакции выявляли гликопротеины. Для подтверждения специфичности выбранных методик параллельно проводили предварительное воздействие на контрольные срезы тестикулярной гиалуронидазой (для расщепления гликозаминогликанов в первом случае) и амилазой слюны (для расщепления гликогена при использовании ШИК-реакции). Для выявления суммарного белка срезы окрашивали бромфеноловым синим.

Другую часть фрагментов сухожилия фиксировали в смеси альдегидных фиксаторов, дегидратировали и заливали в аралдит. Поверхность блоков выравнивали стеклянными ножами, напыляли тонким слоем серебра или платины в вакуумном напылителе «JEE- 4 X/5 B» и ионном напылителе IB-6 для создания электро- и теплопроводности. При помощи рентгеновского электронно-зондового микроанализатора «INCA Energy 200», смонтированного на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840», определяли распределение и концентрацию серы (маркера сульфатированных ГАГ) в ахилловом сухожилии в различные периоды чрескостного дистракционного остеосинтеза, после чего поверхность блоков протравливали 5–10%-ным раствором этиолята Na и исследовали в сканирующем электронном микроскопе «JSM-840».

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методом вариационной статистики, применяемым для малых выборок, с принятием вероятности p , равной 0,05. Для оценки достоверности различий полученных результатов использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, для чего применяли программы: Microsoft Excel, версия 5.0 и программу AtteStat, разработанную в информационно-вычислительном центре ФГУН РНЦ «ВТО» им. акад. Илизарова Росздрава И.П. Гайдышевым.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные результаты показали, что при окрашивании ахиллова сухожилия интактных животных альциановым синим как при рН 1,0, так и при рН 2,5 наибольшее проявление альцианофилии наблюдалось в областях пери- и эпитединия, а также в оболочках сосудов микроциркуляторного русла. Собственно сухожильные пучки проявляли слабую, едва различимую альцианофильную реакцию. На поперечных гистологических срезах выявляли окрашивание сухожильных клеток.

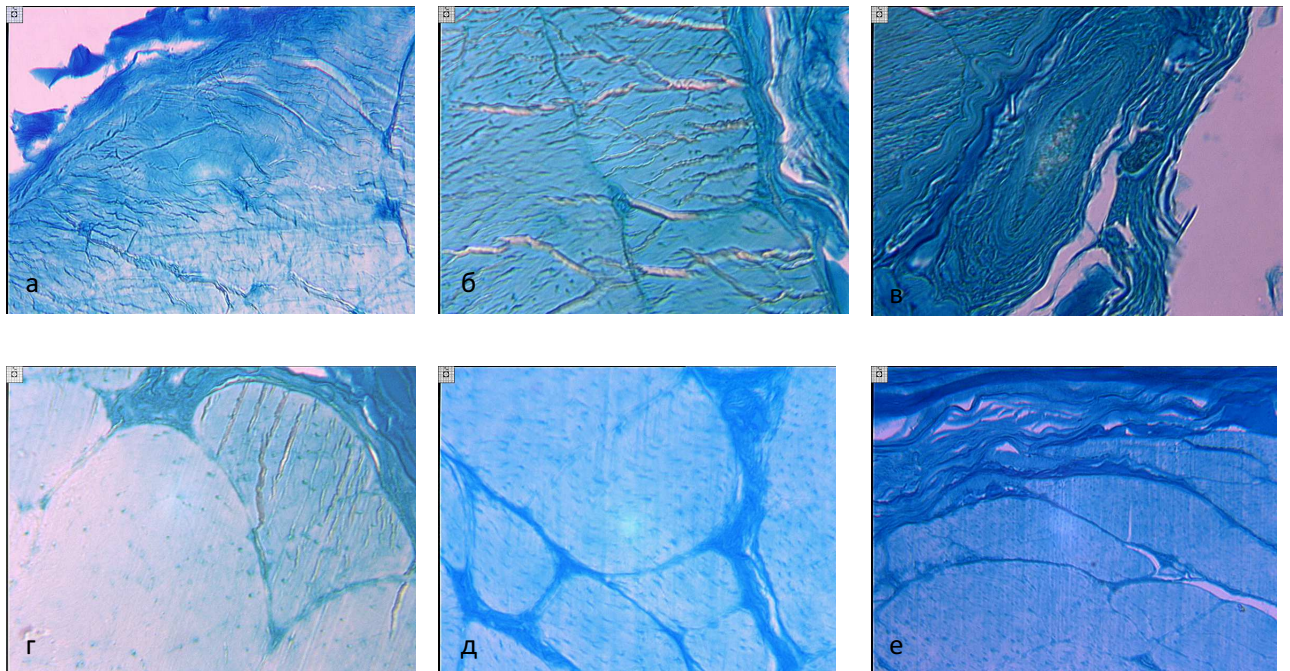


Рис. 1. Проявление альцианофилии в ахилловом сухожилии в различные периоды эксперимента: а, г – через 28 суток дистракции; б, д – через 30 суток фиксации; в, е – через 30 суток после снятия аппарата. Препараты окрашены альциановым синим (верхний ряд – при рН 1,0, нижний – при рН 2,5). Увеличение – 160х.

Через 28 суток дистракции отмечали усиление окраски как собственно сухожильных пучков, особенно в наружных участках, прилегающих к пучковым оболочкам, представленным рыхлой волокнистой соединительной тканью, так и самих сухожильных оболочек. Альцианофильная окраска была более выражена при рН 1,0 (рис. 1 а, г). В последующие периоды эксперимента мы наблюдали усиление альцианофилии всех структур, что свидетельствовало о накоплении в тканях сухожилия сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов (рис. 1 б, в, д, е).

Таблица 1 – Динамика содержания серы в тканях ахиллова сухожилия в различные периоды чрескостного дистракционного остеосинтеза

Этапы эксперимента	Содержание S (вес. %)			
	Интakтные животные	Дистракция 28 суток	Фиксация 30 суток	Без аппарата 30 суток
Среднее	0,43	0,63**	0,76*..	2,8*.
Ошибка среднего	0,16	0,12	0,06	0,63

* – при $p \leq 0,01$;

** – при $p \leq 0,05$ (по сравнению с контролем);

• – при $p \leq 0,01$;

.. – при $p \leq 0,05$ (по сравнению с предыдущим периодом).

Полученные данные подтверждали результаты рентгеновского электронно-зондового микроанализа (таблица 1), свидетельствующие о пролонгированном накоплении в тканях ахиллова сухожилия сульфатированных гликозаминогликанов.

Результаты рентгеновского электронно-зондового анализа показали постепенное накопление серы в ахилловом сухожилии. Если условно ее содержание в сухожилии интактных животных принять равной 100%, то по окончании периода дистракции содержание серы было увеличено в среднем на 46,5% ($p \leq 0,05$), по окончании периода фиксации конечности в аппарате – на 76,7% ($p \leq 0,01$), что на 30,2% больше, чем в предыдущий период ($p \leq 0,05$). Через месяц после снятия аппарата содержание серы увеличивалось по сравнению с показателями интактных животных в 6,5 раза ($p \leq 0,01$), что в 3,68 раза было больше, чем в период фиксации конечности аппаратом ($p \leq 0,01$). Полученные количественные данные согласовывались с распределением серы на картах электронно-зондового микроанализа ахиллова сухожилия в характеристическом излучении данного химического элемента (рис. 2).

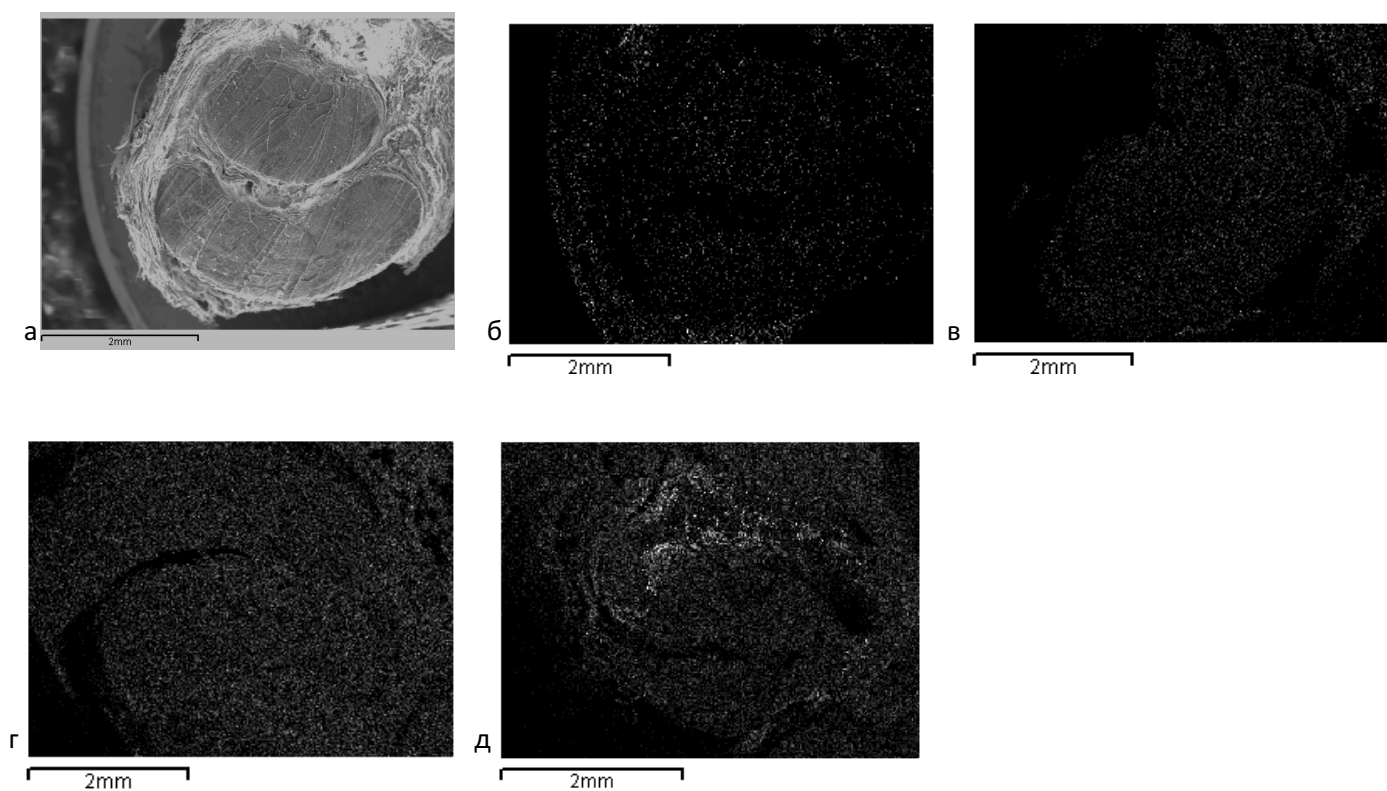


Рис. 2. Электронные изображения поперечно ориентированного фрагмента ахиллова сухожилия: а – электронная сканограмма ахиллова сухожилия; карты электронно-зондового микроанализа ахиллова сухожилия в характеристическом излучении серы; б –

сухожилие интактной собаки; в – через 28 суток удлинения голени по Илизарову; г – через 30 суток фиксации конечности в аппарате; д – через 1 месяц после снятия аппарата. Увеличение – 25х.

При анализе гистологических препаратов интактных животных, окрашенных бромфеноловым синим, выявили, что наибольшая интенсивность окрашивания соответствовала собственно сухожильной ткани пучков, а также пери- и эпитеднию в области, прилежащей непосредственно к пучкам. Их наружные участки были окрашены слабее. Усиленное окрашивание, соответствующее накоплению белковых компонентов, было характерно для стенок сосудов. Через 28 суток distraction отмечали усиление бромфенолового окрашивания эндо-, пери- и эпитедния ахиллова сухожилия. Интенсивность окраски пучков визуальна не изменялась. Через 30 суток фиксации данные изменения выявлялись в большей степени. Через 30 суток после снятия аппарата отмечали усиление интенсивности окрашивания как в области сухожильных пучков, так и в области их оболочек, состоящих из рыхлой волокнистой соединительной ткани.

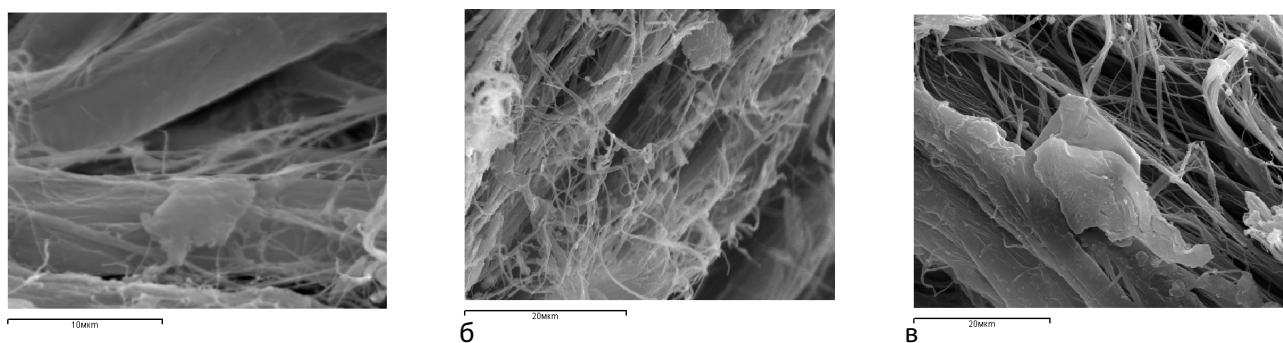


Рис. 3. Выраженность фибриллогенеза в различные периоды эксперимента: а – через 28 суток distraction; б – через 30 суток фиксации конечности в аппарате; в – через 30 суток после снятия аппарата. Электронные сканограммы. Увеличение: а – 3000х; б, в – 1500х.

Полученные данные свидетельствовали о том, что выраженность процесса фибриллогенеза в ахилловом сухожилии определялась уже в период distraction и усиливалась в постдистракционный период, что мы связываем с новообразованием волокнистых структур, перестройкой фибриллярного остова сухожилия в ответ на микроповреждения отдельных коллагеновых волокон, биодеградация которых являлась естественным стимулятором биосинтетических процессов [2]. Полученные гистохимические данные соответствовали картинам фибриллогенеза, полученным методом сканирующей электронной микроскопии в различные периоды эксперимента, также подтверждающим компенсаторное усиление процесса фибриллогенеза в постдистракционный период (рис. 3).

При постановке ШИК-реакции у интактных животных отмечалось интенсивное окрашивание сухожильных пучков. Окружающие их прослойки рыхлой волокнистой соединительной ткани имели менее интенсивную окраску. В пучках содержание ШИК-положительных веществ (гликопротеинов) усиливалось от центра к периферии. Оболочки сосудов эпи- и перитендиния окрашивались с достаточной интенсивностью. Через 28 суток дистракции проявление ШИК-реакции в эпи- и перитендинии незначительно увеличивалась. Через 30 суток фиксации незначительно усиливалась окраска как пучков, так и рыхлой волокнистой соединительной ткани эпи- и перитендиния.

Через 1 месяц после снятия аппарата области повреждения сухожильных волокон не визуализировались, окраска пучков соответствовала таковой у интактных животных, оболочки сохраняли более высокую интенсивность окрашивания. В слое эпитединия, непосредственно окружающего сухожильную ткань, проявление ШИК-реакции было интенсивнее, чем в наружных участках.

Результаты исследований, полученных гистохимическими методами, методами сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского электронно-зондового микроанализа, показали постепенное усиление коллагенообразования на всех сроках эксперимента, что является следствием репаративного процесса, направленного на восстановление коллагенового каркаса. Выявленная в данном исследовании динамика содержания ШИК-позитивных компонентов в тканях ахиллова сухожилия связана с формированием фибриллярного матрикса. По теории L. Robert и R. Robert [10], сиалогликопротеины являются матрицей для ориентированного отложения коллагена, эластина и базальных мембран. Известно, что многие гликопротеины связаны с протеогликанами и являются посредниками в агрегации последних с коллагеновыми фибриллами [8].

Выявленное неравномерное распределение ГАГ в тканях ахиллова сухожилия: усиление альцианофилии в оболочках, незначительное ослабление окраски в центральной части пучков связано с перерастяжением волокнистых структур и репаративными процессами, вызванными частичной деструкцией отдельных коллагеновых волокон.

Период окончания фиксации, очевидно, являлся критическим по напряженности адаптационных процессов во внеклеточном матриксе и подтверждающим активное накопление сульфатированных гликозаминогликанов. После снятия аппарата преобладало накопление несulfатированных ГАГ, превосходящее таковое у интактных животных, что свидетельствовало об обратимом характере изменений, наблюдаемых в предыдущие периоды эксперимента.

Таким образом, полученные результаты показали, что удлинение голени методом чрескостного дистракционного остеосинтеза на 17,6% в данном эксперименте не приводит к срыву механизмов гомеостатической саморегуляции и необратимым деформациям тканей ахиллова сухожилия. Пик биосинтетической активности и накопление компонентов, формирующих внеклеточный матрикс ахиллова сухожилия, приходится на постдистракционный период.

Список литературы

1. Кочутина Л.Н. Гистогенетические особенности регенерации скелетной мышцы при дистракционном остеосинтезе по Г.А. Илизарову / Л.Н. Кочутина, И.П. Кудрявцева // *Гений ортопедии*. – 1996. – № 2–3. – С. 135–136.
2. Пуликов А.С. Особенности реакций соединительной ткани в норме и патологии // *Морфология*. – 2002. – Т. 121. – № 2-3. – С. 129.
3. Слесаренко Н.А., Борхунова Е.Н., Алекперова В.Г. Морфофункциональные характеристики сухожилий и костно-сухожильных соединений пальца у рысистых лошадей. – СПб. : Лань, 2005. – 96 с.
4. Содержание и метаболизм гликозаминогликанов в органах и тканях белых крыс различного возраста / А.Н. Зимницкий [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2004. – Т. 50. – Вып. 6. – С. 593.
5. Соединительная ткань в детском возрасте / под ред. проф. Р.Р. Кильдияровой. – Ижевск, 2009. – 142 с.
6. Тендология – учение о форме и строении сухожилий // *Актуальные проблемы морфологии* : сб. науч. трудов под ред. проф. Н.С. Горбунова. – Красноярск, 2003. – С. 49-51.
7. Benjamin M. The histology of tendon attachments to bone in man / M. Benjamin, E.J. Evans, L. Copp // *J. Anat.* – 1986. – Vol. 149. – № 6. – P. 89-100.
8. Fibrillogenesis in tendon healing: an experimental study / A. Gigante, N. Specchia, S. Rapali, A. Ventura, L. de Palma // *Boll Soc Ital Biol Sper.* – 1996. – Vol. 72. – № 7-8. – P. 203-210.
9. Pimentel S.B. Cellular aspects of elastogenesis in the elastic tendon of the chicken wing / S.B.Pimentel, H.F.Carvalho // *Cell Biol Int.* – 2003. – Vol. 27. – № 7. – P. 579-586.
10. Robert L. Structural glycoproteins of connective tissue their role in morphogenetic and immunopathology / L. Robert, B. Robert // *In: Connective tissue, biochemistry and pathophysiology*. – Berlin, 1974. – P. 240-256.

Рецензенты

Ирьянов Ю.М., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории морфологии. ФГБУ «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. акад. Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Курган.

Стогов М.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник клинико-экспериментального лабораторного отдела. ФГБУ «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. акад. Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Курган.