

© Коллектив авторов, 2001

## ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СУСТАВНОГО ХРЯЩА И СУБХОНДРАЛЬНОЙ КОСТИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Л.Н. Михайлова, О.В. Оганесян, С.В. Иванников, Н.П. Омеляненко

Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва

*Методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии изучалось воздействие на суставной хрящ и субхондральную кость лазерного излучения максимальной мощности (до 70 Вт) от хирургической лазерной установки «Ламин-1» с длиной волны 1,06 мкм в воздушной среде. Полученные данные подтверждают результаты проведенных ранее авторами гистологических исследований, показавших, что зона термического поражения вокруг дефекта не выходит за рамки пограничных с ним участков, составляя от 0,8 до 1 мм. За пределами пограничной зоны суставной хрящ и субхондральная кость сохраняют свою ультраструктурную архитектуру. Это свидетельствует о малой травматичности лазерного воздействия с помощью установки «Ламин-1» и широких возможностях его использования при хирургических вмешательствах в травматологии и ортопедии.*

*Transmission and scanner electronic microscopy was used to study the influence of laser radiation upon the articular cartilage and subchondral bone. Laser radiation with maximum power (up to 70 W) was generated using surgical laser plant «Lamin-1» with 1.06 m wave length in air environment. Data obtained showed that zone of thermal lesion surrounding the defect ranged from 0.8 to 1.0 mm. Articular cartilage and subchondral bone outside the thermal lesion zone preserved specific ultrastructural architectonics. Those data gave evidence of a little traumatic effect of laser using «Lamin-1» and the possibilities of laser application for surgical interventions in traumatology and orthopaedics.*

В опубликованном нами ранее сообщении [1] представлены результаты гистологического изучения суставного хряща и субхондральной кости после воздействия лазерного излучения. Целью настоящего исследования, проведенного с помощью трансмиссионной (ТЭМ) и сканирующей (СЭМ) электронной микроскопии, было уточнение некоторых аспектов состояния структуры этих тканей.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил коленный сустав половозрелых кроликов породы шиншилла массой 2 кг. В работе использованы 24 кролика. На суставной хрящ коленного сустава и субхондральную кость дистального конца бедра с помощью установки «Ламин-1» наносили повреждающее воздействие лазерным лучом. Воздействию подвергали нагружаемую поверхность внутреннего мыщелка и ненагружаемую пателлофemorальную область. Все процедуры проводили в воздушной среде. Для определения степени повреждающего действия лазерного луча на окружающие ткани использовали максимальную рабочую мощность установки — 70 Вт. Животных выводили из опыта через 1, 2 и 3 нед после воздействия. При взятии на секции дистального конца бедренной кости ткани послойно рассекали до капсулы сустава.

Для ТЭМ недекальцинированные кусочки ткани фиксировали в 2,5% растворе глutarальдегида на каодилатном буфере pH 7,4 с последующей постфиксацией в осмиевой кислоте по методу Millonig [5]. Обезвоживание кусочков проводили в спирте возрастающей концентрации и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-8800 (Швеция) и изучали в электронном микроскопе EM-902 («Karl Zeiss», Германия).

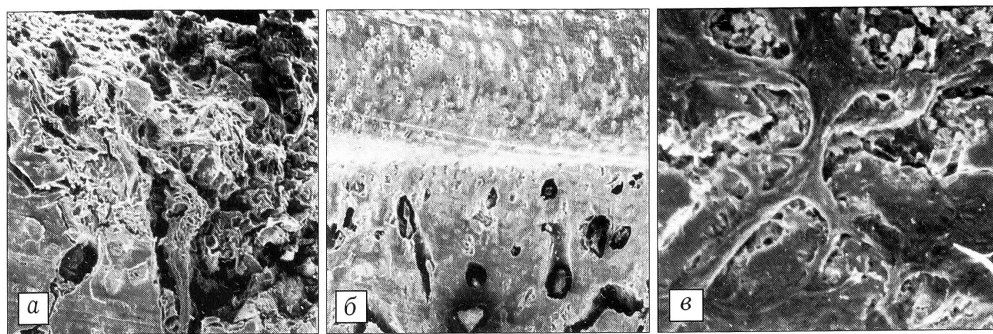
Для СЭМ образцы фиксировали в нейтральном 10% формалине pH 7,2. Затем отмывали их и «затачивали» поверхность на столике замораживающего микротомы.

Далее кусочки, не размораживая, отсоединяли от столика и подвергали обезвоживанию охлажденным спиртом (-10°C) возрастающей концентрации, смесью равных объемов 100% спирта и эфира, чистым эфиром. После вакуумирования образцы напыляли золотом в ионном напылителе (IB-3, фирма «Eico»). Затем образцы просматривали в микроскопе с высокой разрешающей способностью S-800 («Hitachi», Япония).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении образцов ткани в СЭМ через 7 дней после воздействия лазером было видно, что образовавшийся дефект проходит через всю толщу хрящевой пластинки и субхондральную кость. Сам дефект (зона деструкции) содержит волокнистые структуры и обуглившиеся фрагменты тканей (рис. 1, а). Некроз в пограничной зоне, как и при гистологическом исследовании [1], определяется в пределах 0,8–1 мм. Поверхность суставного хряща и в нагружаемых, и в ненагружаемых участках выглядит неровной. В этой зоне хрящевой пластинки наблюдаются деструктивные изменения хондроцитов и хрящевого матрикса, проявляющиеся в его гомогенизации. В субхондральной костной ткани в зоне некроза имеются участки, в которых отсутствуют остециты. В ней определяются также расширенные сосудистые каналы и костномозговые пространства, содержащие клеточно-волоконистую ткань.

В прилежащих к пограничной зоне участках хрящевой пластинки в поверхностном слое коллагеновые фибриллы и клеточные элементы сохраняют горизонтальное расположение. В среднем и основном слое суставного хряща коллагеновые фибриллы, подпадающие из базальной зоны, имеют в межтер-



**Рис. 1.** Суставной хрящ и субхондральная костная ткань после воздействия лазерного излучения. СЭМ (ув. 100).

*а* — волокнистые структуры и обуглившиеся фрагменты ткани в образовавшемся дефекте. 7-й день после воздействия; *б* — суставной хрящ и подлежащая субхондральная костная ткань в участках, прилежащих к пограничной с дефектом зоне. 7-й день после воздействия; *в* — субхондральная кость с расширенными сосудистыми и костномозговыми каналами. 21-й день после воздействия.

риториальных участках радиальную направленность, образуя перилакунарные области вокруг изогенных групп хондроцитов. Изогенные группы клеток располагаются перпендикулярно поверхностной зоне. Коллагеновые фибриллы матрикса базального слоя имеют преимущественно перпендикулярную ориентацию по отношению к субхондральной кости. В этом слое содержится небольшое количество клеточных элементов. Описанная картина соответствует нормальной архитектонике матрикса суставного хряща. В субхондральной костной ткани в этих же участках выявляются расширенные сосудистые каналы, содержащие эритроциты, и расширенные костномозговые пространства (рис. 1, б).

На 14-й день после лазерного воздействия ультраструктура суставного хряща как в пограничной зоне, так и в прилежащих к ней участках сходна с таковой в 7-дневный срок наблюдения. В подлежащей субхондральной кости сосудистые каналы и межбалочные пространства остаются расширенными.

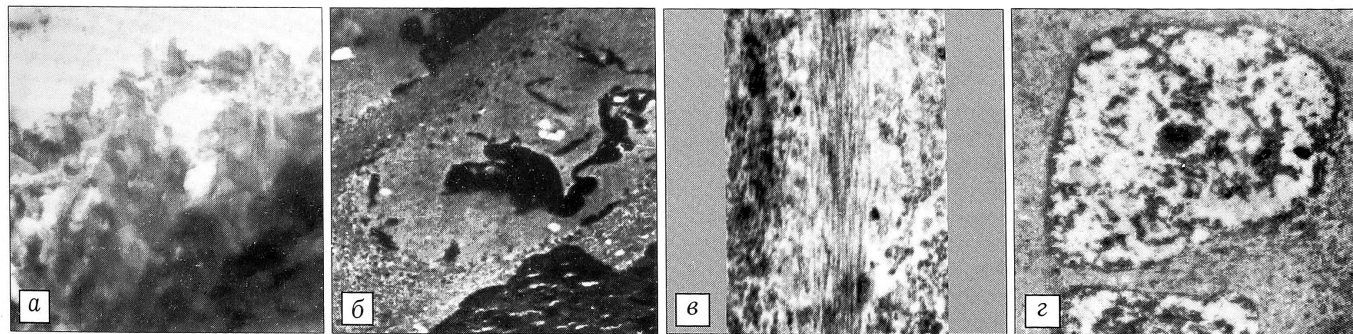
Через 21 день в пограничной зоне и за ее пределами поверхность суставного хряща в значительной своей части ровная. В прилежащих к пограничной зоне участках хондроциты и коллагеновые фибриллы в поверхностном слое хрящевой пластинки сохраняют горизонтальное расположение. В основном слое суставного хряща коллагеновые фибриллы и изогенные группы клеток имеют радиальную на-

правленность, как и на 7-й день наблюдения. Такая архитектоника хрящевого матрикса характерна для нормального суставного хряща. Описанная ультраструктура наблюдается и в нагружаемых, и в ненагружаемых участках суставного хряща.

Костная ткань субхондральной зоны характеризуется губчатым строением с наличием остеоида, что свидетельствует о происходящих репаративных

процессах. Сосудистые каналы и межбалочные пространства расширены. Просветы сосудистых каналов заполнены эритроцитами (рис. 1, в).

Изучение в ТЭМ ультратонких срезов нагружаемых и ненагружаемых участков хрящевой пластинки показало, что через 7 дней после лазерного воздействия в пограничной с дефектом зоне поверхность суставного хряща разрыхлена. Коллагеновые фибриллы хрящевого матрикса, лежащие под поверхностным слоем, имеют плотную гомогенную структуру (рис. 2, а). В лакунах хондроцитов всех слоев хряща видны лишь небольшие остатки коагулированных клеточных элементов (рис. 2, б). Края костных структур подлежащей субхондральной кости выглядят «оплывшими». Сам дефект содержит белковые массы, тонкие волокнистые структуры и остатки обуглившихся тканей. В участках, прилежащих к пограничной зоне, в поверхностном слое хряща наряду с дистрофически-измененными волокнистыми структурами определяются поперечноисчерченные коллагеновые фибриллы, располагающиеся параллельно поверхности. Их внутренняя тонкая структура сходна со структурой неизмененных коллагеновых фибрилл хрящевого матрикса нормального суставного хряща (рис. 2, в). В хондроцитах этих участков хрящевой пластинки продолжают выявляться дистрофические изменения в виде уплотнения цитоплазматических и ядер-



**Рис. 2.** Ультраструктурные изменения суставного хряща на 7-й день после воздействия лазерного излучения. ТЭМ.

*а* — разрыхленная поверхность суставного хряща в пограничной с дефектом зоне (ув. 20000); *б* — коагулированные органеллы хондроцитов в пограничной с дефектом зоне (ув. 3000); *в* — коллагеновые фибриллы поверхностного слоя хрящевой пластинки в прилежащих к зоне воздействия участках (ув. 12000); *г* — хондроциты поверхностного слоя, расположенные в участках, прилежащих к пограничной зоне (ув. 3000).

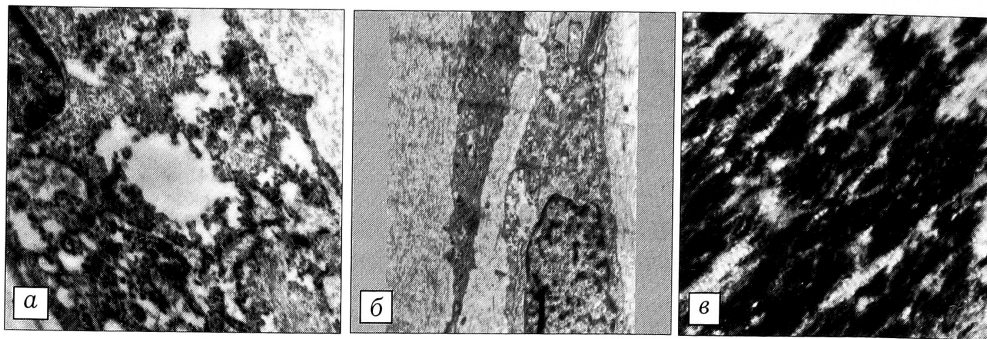
ных структур (рис. 2, г). Иногда среди уплотненных цитоплазматических органелл встречаются мелкие одиночные канальцы гранулярного эндоплазматического ретикулума.

Через 14 дней после воздействия лазером ультраструктурная картина суставного хряща и подлежащей субхондральной кости сходна с таковой 7-дневного срока наблюдения.

На 21-й день после лазерного воздействия в пограничной с дефектом зоне в средних и базальных слоях хрящевой пластинки сохраняются хондроциты с признаками дистрофически-измененной цитоплазмы. В уплотненной гиалоплазме некоторых хондроцитов обнаруживаются уплощенные и расширенные каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума (рис. 3, а). Наличие элементов гранулярного эндоплазматического ретикулума в хондроцитах указывает на их участие в процессах синтеза. В участках, прилежащих к пограничной зоне, поверхность суставного хряща довольно ровная. В поверхностном слое хрящевой пластинки коллагеновые фибриллы и хондроциты располагаются параллельно поверхности суставного хряща (рис. 3, б). Хондроциты удлиненной формы, с небольшими цитоплазматическими отростками, обладают всеми присущими этим клеткам органеллами, не обнаруживающими дистрофических изменений, и сходны по ультраструктуре с хондроцитами нормального суставного хряща.

В основном слое хрящевой пластинки наблюдаются изогенные группы хондроцитов. Хондроциты, лежащие в лакунах, имеют нормальную ультраструктуру. Появление изогенных групп можно рассматривать как признак репарации хрящевой ткани. В базальных слоях этих участков хрящевой пластинки хрящевые клетки малочисленны. Хондроциты, находящиеся в лакунах, не отличаются ультраструктурно от хондроцитов нормального хряща. Поперечноисчерченные коллагеновые фибриллы хрящевого матрикса по внутренней структуре и расположению также сходны с таковыми нормального хрящевого матрикса. Ультраструктурная организация субхондральной костной ткани не отличается от нормальной (рис. 3, в).

Таким образом, проведенное электронно-микроскопическое исследование подтвердило полученные нами ранее гистологические данные о том, что лазерное излучение максимальной мощности (до 70 Вт) от хирургической лазерной установки «Ламин-1» с рабочей длиной волны 1,06 мкм в воздушной среде эффективно рассекает суставной хрящ и субхондральную кость. При этом зона термического поражения вокруг образующегося дефекта не выходит за пределы пограничных с ним участков, составляя



**Рис. 3.** Хрящевые клетки и субхондральная костная ткань на 21-й день после воздействия лазерного излучения. ТЭМ.

а — дистрофические изменения цитоплазматических структур хондроцита средних слоев хрящевой пластинки в пограничной с дефектом зоне (ув. 12000); б — хондроциты поверхностного слоя хрящевой пластинки вблизи от пограничной зоны (ув. 4400); в — субхондральная костная ткань в участках, прилежащих к пограничной зоне (ув. 12000).

от 0,8 до 1 мм. Увеличения размеров дефекта в течение всех сроков наблюдения (от 7 до 21 дня) не отмечено. За пределами пограничной зоны все слои суставного хряща и субхондральная кость сохраняли нормальную ультраструктурную организацию. Ультраструктурные исследования показали также, что наряду с дистрофическими изменениями в цитоплазме хондроцитов в участках, прилежащих к пограничной с дефектом зоне, происходит пролиферация клеточных элементов, выражающаяся в образовании изогенных групп хондроцитов и знаменующая собой процессы репарации.

В зарубежной литературе имеются работы по изучению хряща человека после воздействия лазерами, работающими в импульсном или непрерывном режиме [2–4, 6, 7]. Воздействие осуществлялось во влажной среде. Полученные данные аналогичны результатам наших исследований. Однако нужно отметить, что в нашей работе воздействие проводилось в воздушной среде при максимальной мощности излучения 70 Вт. Поэтому, сопоставляя наши данные с данными других авторов [4, 7], можно с полным основанием считать, что лазерное воздействие максимальной мощности от установки «Ламин-1», работающей одновременно в трех режимах излучения, является малотравматичным и перспективным для использования при хирургических вмешательствах в травматологии и ортопедии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Михайлова Л.Н., Иванников С.В., Омеляненко Н.П. // Вестн. травматол. ортопед. — 1996. — № 4. — С. 62–64.
2. Abelow S.P. // Orthopedics. — 1993. — Vol. 16, N 5. — P. 551–556.
3. Grifka J., Boenke S., Schreiner C., Lohnert J. // Knee Surg. Sports Traum. Arthroscopy. — 1994. — Vol. 2, N 2. — P. 88–93.
4. Miller D.V., O'Brein S.J. // Arthroscopy. — 1989. — Vol. 5, N 4. — P. 245–253.
5. Millonig G. // J. Appl. Physiol. — 1961. — Vol. 32. — P. 1637.
6. Trauner K., Nishioka N., Patel D. // Am. J. Sports Med. — 1990. — Vol. 18, N 3. — P. 316–320.
7. Whipple T.L., Marotta T.J., May T.C. et al. // Lasers Surg. Med. — 1987. — Vol. 7. — P. 184–188.