

© Т.А. Ступина, М.М. Щудло, 2009

УДК 611.018.3:616.72-018.3-001.5-89.84:004.9

Способ количественной оценки состояния суставного хряща на разных уровнях структурной организации

Т.А. Ступина, М.М. Щудло

A technique for quantitative evaluation of articular cartilage condition at different levels of structural organization

T.A. Stupina, M.M. Chtchoudlo

Федеральное государственное учреждение
«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий», г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

Разработан способ количественной оценки комплекса параметров суставного хряща на органном, тканевом и клеточном уровнях по полутонким срезам большой площади. Предлагаемый способ количественной оценки позволяет получить объективную информацию о степени реактивно-деструктивных изменений и восстановительных процессов в суставном хряще в условиях удлинения конечности, а также может быть рекомендован для обработки биопсийного материала с целью диагностики суставной патологии и изучения влияния различных факторов на состояние суставного хряща.

Ключевые слова: суставной хрящ, удлинение, компьютерная морфо- и стереометрия.

A technique for quantitative evaluation of the complex of articular cartilage parameters has been worked out at organic, tissue and cellular levels using half-thin sections of large area. The technique of quantitative evaluation proposed allows to get objective information on the degree of reactive-and-destructive changes and restorative processes in articular cartilage under limb lengthening, as well as it might be recommended for biopsy material processing for the purpose of joint pathology diagnostics and studying the influence of different factors on articular cartilage condition.

Keywords: articular cartilage, lengthening, computer-assisted morpho- and stereometry.

Длительное ограничение движений при дистракционном остеосинтезе создает проблему сохранения функции суставов [3]. На данный момент в вопросах суставной патологии существует необходимость разработки способов объективной комплексной количественной морфологической оценки репаративных и адаптационных изменений суставного хряща. Известны способы количественной оценки по целлюидиновым, парафиновым, полутонким и ультратонким срезам, позволяющие характеризовать состояние суставного хряща на определенном уровне структурной организации [2]. Работа с целлюидиновыми срезами не дает возможности четко дифференцировать зоны

хряща, изогенные группы клеток, проводить морфометрию без поправок на эффект Холмса [1]. Изготовить качественные 1-2 мкм парафиновые срезы суставного хряща проблематично, требуется более плотная заливочная среда (эпоксидные смолы), а использование полутонких эпоксидных срезов ограничивает их малая стандартная площадь — до 1 мм², затрудняющая получение репрезентативных выборок изображений для стереологических исследований.

Цель. Разработать способ количественной оценки комплекса параметров суставного хряща на органном, тканевом и клеточном уровнях структурной организации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследован суставной хрящ наружного мыщелка бедра собак (n=9), которым удлинляли голень аппаратом Илизарова на 28-30 мм (эксперимент выполнен д.м.н. С.А. Ерофеевым) в течение 10 суток с темпом 3,0 мм за 180 приемов (автодистракция). Перпендикулярные суставной поверх-

ности полутонкие эпоксидные срезы большой площади готовили на ультратоме "Nova" (LKB, Швеция), окрашивали метиленовым синим и основным фуксином. На фотомикроскопе "Opton" (Германия) с АПК "DiaMorph" (Москва) изображения препаратов оцифровывали, морфометрировали. В качестве контроля морфометрировали суставной хрящ интактных животных (n=3). Анализ цифрового материала проводили методами вариационной и непараметрической статистики в программе Microsoft Excel 97.

Т.А. Ступина — научный сотрудник экспериментального отдела травматологии и ортопедии, к.б.н.;

М.М. Щудло — ведущий научный сотрудник научно-медицинского отдела восстановительного лечения, д.м.н.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Универсальными, для определения абсолютных и относительных параметров структур суставного хряща, являются полутонкие срезы, позволяющие проводить светооптические исследования при больших увеличениях на клеточном и субклеточном уровнях. Учитывая, что толщина таких срезов (0,5-1 мкм) примерно равна 1/20 среднего диаметра изучаемых структур (диаметр хондроцитов 10-20 мкм) эффект Холмса сводится к минимуму. Для репрезентативности оценок параметров использовали срезы максимально большой площади от 4 до 8 мм². Так, полутонкие срезы суставного хряща площадью до 8 мм² при инструментальном увеличении 1250× позволяли оцифровать от 60 до 100 полей зрения с изображениями 120 и более клеток. Для оценки состояния суставного хряща на органном, тканевом и клеточном уровнях определяли комплекс параметров: толщина хряща (**h**, мкм); численная плотность хондроцитов (**NA_{хц}**) – характеризует численный состав хондроцитов, их гибель и репродукцию; объемная плотность хондроцитов (**VV_{хц}**, %) – характеризует степень дифференцировки клеток по зонам хряща; величина пула пролиферирующих хондроцитов (**ВППХц**, %) – характеризует пролиферативную активность (табл. 1). Для характеристики функциональной активности клеток

определяли параметры: объемная плотность ядра (**VV_я**, в долях единицы); объемная плотность цитоплазмы (**VV_{цит}**, в долях единицы); ядерно-цитоплазматический индекс (**ЯЦИ**); минимальный и максимальный диаметры (**d_{min}**, **d_{max}**, мкм) клеток и их ядер; фактор формы (**Ff**, в долях единицы) клетки и ядра (табл. 2).

Таблица 1
Количественные характеристики суставного хряща на органном и тканевом уровнях

Параметры		VV _{хц} (%,M _{хц})	NA _{хц} (M±m)	h (мкм, M±m)	ВППХ _ц (%)
Контроль					
Контроль	I	6,1	8,2±0,99	475,5±1,3	14,5
	II	8,75	4,4±0,64		
	III	12,26	5,7±0,75		
3 мм за 180 приемов (автодистракция)					
10 дней дистракции	I	4,1*	8,01±0,6-	375,7±1,8 ***	22
	II	4,68*	5,31±0,68*		
	III	5,54*	4,03±0,45*		
30 дней фиксации	I	4,52*	5,52±0,37*	439,5±1,8 ***	31,3
	II	5,64*	4,5±0,32*		
	III	6,01*	4,61±0,36*		
30 дней без аппарата	I	5,84*	7,88±0,7*	446,8±1,6 ***	27,5
	II	8,38	5,68±0,36*		
	III	9,82*	6,46±0,43*		

Примечание: I – поверхностная, II – промежуточная, III – глубокая зоны хряща. При определении достоверности различий с контролем для **VV_{хц}**, **NA_{хц}** – использовали критерий Вилкоксона, для **h_{хр}** – критерий Стьюдента. Различия достоверны: *** – при p<0,001, * – при p<0,05.

Таблица 2
Количественные характеристики (M±m) хондроцитов суставного хряща на этапах эксперимента (автодистракция – 3 мм за 180 приемов)

Срок эксперимента		Контроль	Дистракция	Фиксация	Без аппарата
Поверхностная зона					
Vv ядра		0,42±0,01	0,29±0,01***	0,28±0,009***	0,32±0,01***
Vv цитоплазмы		0,58±0,01	0,71±0,01***	0,71±0,009***	0,678±0,01***
ЯЦИ		0,75±0,03	0,44±0,03***	0,409±0,01***	0,50±0,03***
Клетка	d min	1,28±0,25	3,19±0,46***	3,46±0,3***	3,43±0,46***
	d max	10,75±0,35	11,1±0,47	11,2±0,4	10,5±0,3
	Ff	0,47±0,015	0,61±0,02***	0,58±0,02***	0,62±0,02***
Ядро	d min	1,08±0,16	1,3±0,26	1,7±0,2***	2,2±0,23***
	d max	6,71±0,25	5,9±0,4**	5,7±0,26***	5,58±0,33***
	Ff	0,5±0,025	0,54±0,02	0,61±0,02***	0,67±0,03***
Промежуточная зона					
Vv ядра		0,21±0,01	0,19±0,01	0,19±0,007**	0,22±0,009
Vv цитоплазмы		0,79±0,01	0,80±0,01	0,81±0,007**	0,77±0,009
ЯЦИ		0,27±0,01	0,26±0,02	0,25±0,01**	0,29±0,01
Клетка	d min	5,8±0,83	6,02±0,78	7,02±0,55*	8,67±0,4***
	d max	13,1±0,43	11,2±0,46*	12,2±0,38	13,7±0,34
	Ff	0,7±0,015	0,75±0,01*	0,76±0,01*	0,79±0,01*
Ядро	d min	2,1±0,34	0,9±0,2***	1,8±0,33***	3,9±0,3***
	d max	6±0,25	4,7±0,4***	5,6±0,29	6,01±0,17
	Ff	0,7±0,02	0,48±0,04***	0,64±0,02*	0,8±0,03***
Глубокая зона					
Vv ядра		0,19±0,01	0,21±0,01	0,23±0,01**	0,20±0,01
Vv цитоплазмы		0,81±0,01	0,79±0,01	0,76±0,01**	0,79±0,01
ЯЦИ		0,25±0,01	0,27±0,01	0,33±0,02**	0,26±0,01
Клетка	d min	4,8±1,02	5,8±0,63	5,2±0,6	8,64±0,37***
	d max	12,4±0,4	11,2±0,44*	10,6±0,44***	13,4±0,39*
	Ff	0,69±0,02	0,75±0,01*	0,72±0,02**	0,79±0,01***
Ядро	d min	1,29±0,3	0,95±0,33	1,5±0,3***	3,1±0,37***
	d max	5,9±0,35	5,14±0,36*	5,13±0,37**	5,9±0,16
	Ff	0,6±0,035	0,5±0,03*	0,63±0,03	0,75±0,02***

Примечание: проверка различий проведена с помощью критерия Вилкоксона: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

ВЫВОДЫ

Разработанный способ количественной оценки комплекса параметров суставного хряща на органном, тканевом и клеточном уровнях по перпендикулярным суставной поверхности полутонким срезам большой площади у экспериментальных и интактных животных позволяет без дополнительных технических и материальных затрат получить объективную информацию о степени

реактивно-деструктивных изменений и восстановительных процессов в суставном хряще в условиях удлинения конечности, а также может быть рекомендован для обработки биопсийного материала с целью диагностики суставной патологии и изучения влияния различных факторов на состояние суставного хряща.

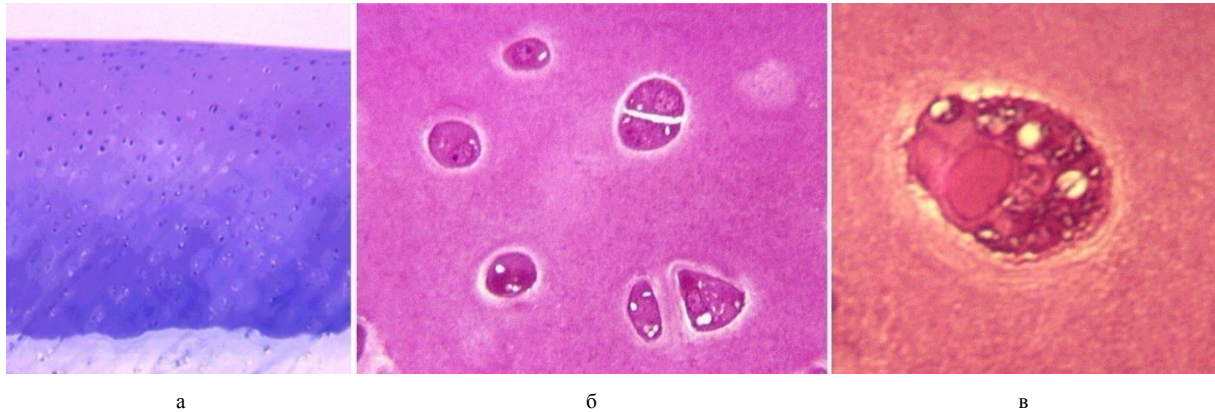


Рис. 1. Полутонкий срез суставного хряща, окраска метиленовым синим-основным фуксином: а - об. - 6,3, ок. - 12,5×; б - об. - 40, ок. - 12,5×; в - об. - 100МИ, ок. - 12,5×

ЛИТЕРАТУРА

1. Проблема эффекта Холмса в количественной телепатологии / М. М. Щудло [и др.] // Известия Челяб. науч. центра. - 2003. - Вып. 1 (18). - С. 1-5.
2. Хрящ / В. Н. Павлова [и др.]. - М. : Медицина, 1988. - 320 с.
3. Шевцов, В. И. Оперативное удлинение нижних конечностей / В. И. Шевцов, А. В. Попков. - М. : Медицина, 1998. - 192 с.

Рукопись поступила 12.08.08.