

© Группа авторов, 2001

Биохимические изменения структуры суставного хряща в условиях последовательного дистракционно-компрессионного остеосинтеза

А.В. Попков, Е.Л. Матвеева, С.Н. Лунева, С.А. Ерофеев, Д.А. Попков

Biochemical changes of articular cartilage structure during consecutive distraction-compression osteosynthesis

A.V. Popkov, E.L. Matveyeva, S.N. Luniova, S.A. Yerofeyev, D.A. Popkov

Государственное учреждение науки

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

Удлинение длинных трубчатых костей сопровождается увеличением компрессионных усилий и изменением распределения нагрузки на суставные поверхности смежных суставов. Изучение биохимических и биомеханических характеристик суставного хряща и синовиальной оболочки показало, что развитие патологических процессов в хрящевой ткани приводит к утрате таких механических свойств, как упругость, прочность, резистентность к сжатию, и резко ограничивает опорно-двигательную функцию конечности. В группах животных с разными режимами введения орозомукоида имеют место содружественные реакции биохимических изменений как в опытной, так и в контралатеральной конечности.

Ключевые слова: суставной хрящ, дистракционно-компрессионный остеосинтез, биохимические исследования.

Lengthening of long tubular bones is accompanied by increase of compression forces and distribution change of load on the articular surfaces of adjacent joints. Study of biochemical and biomechanical characteristics of articular cartilage and synovial membrane has demonstrated, that development of pathologic processes in the cartilaginous tissue leads to the loss of such mechanical properties as elasticity, strength, resistance to compression, sharply limits locomotor limb function. Associated reactions of biochemical changes both in experimental and contralateral limb take place in group of animals with different modes of orozomucoid introducing.

Keywords: articular cartilage, distraction-compression osteosynthesis, biochemical studies.

Удлинение длинных трубчатых костей сопровождается увеличением компрессионных усилий и изменением распределения нагрузки на суставные поверхности смежных суставов, а также вынужденным ограничением локомоции последних. Метаболизм одного из основных компонентов матрикса параартикулярных тканей - протеогликанов, а также состав минеральной фазы матрикса

меняются в условиях дистракции. Поэтому целью нашего исследования было изучение состояния вязко-упругих свойств, количество и агрегированность протеогликанов, состояние минеральной фазы матрикса суставного хряща, а также количество и агрегированность протеогликанов синовиальной оболочки коленного сустава собак.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Был исследован материал опытной и контралатеральной конечностей от 11 беспородных собак (средний вес $22,1 \pm 1,03$ кг), которым после закрытой флексии остеоклазии большеберцовой кости в средней трети проводили удлинение голени в течение 35 дней с темпом дистракции 1 мм при 4-кратной дробности. По завершении дистракции проводили одномоментную компрессию дистракционного регенерата - 1 серия опытов (4 животных). В ряде опытов наряду с компрессией регенерата собакам внутривенно вводился препарат «Орозин», содержащий 95% очищенного орозому-

коида сыворотки человека и 5% альбумина. В пяти случаях (вторая серия) препарат вводился внутривенно за 5 часов до компрессии, через 18 часов после нее и на 5-ые сутки. Однократная доза введения была 1,2 г сухого препарата в разведении на 10 мл физиологического раствора. Двум животным орозомукоид вводился еженедельно на протяжении всего эксперимента в той же дозировке (3 серия). Животных выводили из опыта внутривенным введением летальных доз тиопентала натрия и 10% раствора новокаина по окончании дистракции, через 1, 14, 21 день фиксации и 30 дней после снятия

аппарата. Изучали макроскопическую картину поверхности сустава, его вязко-упругие свойства, для чего был рассчитан показатель податливости [4], который выражался в мм на единицу приложенного усилия. Для определения микроколичеств минеральных компонентов измельченную хрящевую ткань подвергали влажному озоленю в колбах Кьельдаля в смеси 57% хлорной кислоты и уксусного ангидрида [1]. В озоленных пробах определяли концентрации кальция и хлоридов - на биохимических анализаторах "Corning 950", "Corning 920", фосфата [2]. На основе полученных данных рассчитывали показатель кальций/фосфаты, отражающий качественную характеристику минераль-

ной фазы. Содержание органических компонентов матрикса суставного хряща оценивали, определяя количество гексуроновых кислот [3] в экстрактах и протеолизатах ткани. Ткань экстрагировали 0,01 М ацетатным буфером pH 5,5 в течение 24-х часов на холоде, после чего подвергали папаиновому протеолизу при 56°C 24 часа. Рассчитывали соотношение фракций гликозаминогликанов (ГАГ), слабо и тесно связанных с матриксом. Содержание интерстициальной воды определяли взвешиванием на электронных аналитических весах фирмы "Tekator", (Швеция) до и после лиофильного высушивания ткани.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований нами были разделены на две группы: в первую вошли данные, полученные у собак, которым проводили компрессию регенерата и вводили однократно орозин в периоде фиксации (1 и 2 серии опытов); вторая группа включала результаты опытов, где собакам наряду с компрессией на протяжении всего эксперимента еженедельно внутривенно вводили орозин (3 серия). 1 и 2 серии опытов были объединены в одну группу вследствие того, что полученные в этих сериях результаты не имели достоверных различий.

Макроскопически на суставной поверхности опытной конечности у всех собак были выявлены признаки дегенеративных проявлений: истончение, изменение цвета суставного хряща, его расслаивание, а в некоторых случаях - эрозии по боковым поверхностям мыщелков, вплоть до субхондральной кости. На суставной поверхности контралатеральной конечности эти признаки выявлялись гораздо слабее или не выявлялись совсем.

При макроскопическом изучении хряща суставной поверхности коленных суставов собак с компрессией и введением орозомукоида в период фиксации мы наблюдали матовый, шероховатый, с бледно-фиолетовыми пятнами, истонченный хрящ толщиной 1 мм. При этом обнаружили снижение вязко-упругих свойств на 23,0% в хряще оперированной и на 9% - в хряще контралатеральной конечности.

При исследовании коленных суставов в группе животных с компрессией и введением орозомукоида в течение всего срока эксперимента состояние хряща характеризовалось следующей картиной: истонченный местами до появления поверхностных узур хрящ приобретал местами темно-фиолетовую окраску. Снижение вязко-упругих свойств составило 22,5% в хряще опытной и 17,5% - в хряще контралатеральной конечности. Степень гидратированности хряща была одинакова в обеих группах эксперимента и снижена на 6,5% по сравнению со

здоровой хрящевой тканью. Различия в содержании интерстициальной воды в хряще опытной и контралатеральной конечностей не достоверны.

У собак обеих групп эксперимента, выведенных из опыта на разных сроках, выявлены следующие закономерности: снижение общего количества протеогликанов (ПГ) и возрастание количества слабосвязанных ГАГ в хряще и синовиальной оболочке оперированной и контралатеральной конечностей. Данные показатели значительно отличались от нормы при фиксации и в период фиксации. Через 30 дней после снятия аппарата оба показателя существенно не отличались от нормы и в опытной, и в контралатеральной конечностях. В синовиальной оболочке достоверно отличались результаты данных тестов после 30 дней фиксации, а после снятия аппарата - имели тенденцию возврата к норме (рис. 1 и 2).

Проведенные исследования органической фазы матрикса хряща у животных с компрессией и введением орозомукоида как в период фиксации, так и в течение всего срока эксперимента, показали снижение на 40% содержания УК и увеличение в 2,2 раза в опытной и в 2,0 раза - в контралатеральной конечности доли ГАГ, слабосвязанных с матриксом, т.е. уменьшение содержания протеогликанов в суставном хряще сопровождалось изменением их агрегации. Увеличение количества экстрагируемых гликозаминогликанов свидетельствует о нарушении ковалентных и водородных связей между протеогликанами и коллагеном, что говорит о развитии деструктивных процессов в органической фазе матрикса суставного хряща. Очевидно, что сочетание двух процессов - снижение синтеза ПГ и усиление разрушения ПГ ферментами - приводит к снижению их содержания в хряще, что иллюстрируется уменьшением количества УК. Поскольку одной из функций ПГ является удержание интерстициальной воды в ткани, закономерным представляется и снижение степени гидратированности суставного хряща.

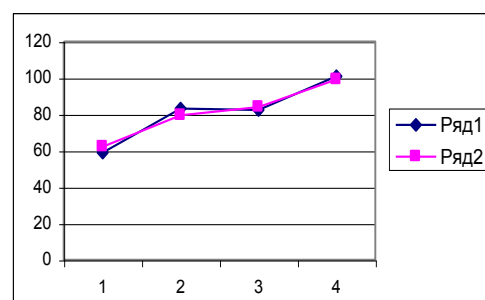
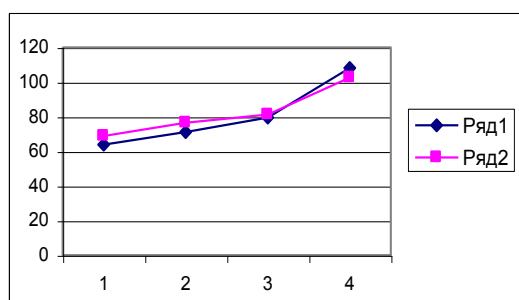


Рис. 1. Изменение общего количества ПГ в % от нормы: а) в суставном хряще б) в синовиальной оболочке. Ряд 1 - опытная конечность; ряд 2 - контралатеральная конечность. По оси абсцисс сроки эксперимента: 1- конец distraction; 2-начало фиксации; 3-конец фиксации; 4- после снятия аппарата.

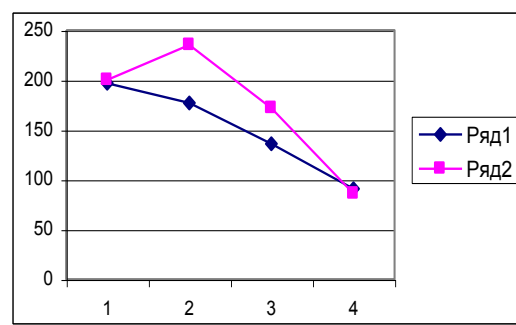
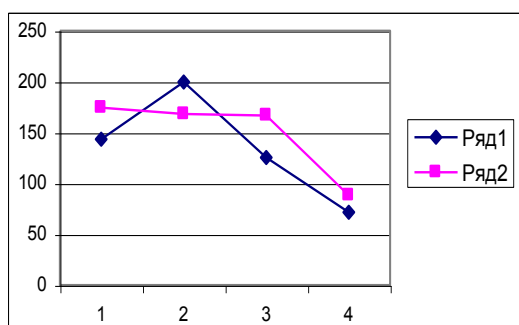


Рис. 2. Изменение количества слабосвязанных ГАГ в % от нормы: а) в суставном хряще б) в синовиальной оболочке. Ряд 1 - опытная конечность; ряд 2 - контралатеральная конечность. По оси абсцисс сроки эксперимента: 1- конец distraction; 2- начало фиксации; 3-конец фиксации; 4- после снятия аппарата.

Таким образом, в суставном хряще опытной и контралатеральной конечностей собак обеих групп эксперимента общее количество ПГ и доля слабосвязанных ГАГ изменялись синхронно. После снятия аппарата у собак эти величины возвращались к нормальному уровню.

Проведенный анализ литературных данных о патогенезе дегенеративно-дистрофических поражений суставов не позволяет дать определенный ответ на вопрос: какие изменения претерпевает минеральная фаза матрикса пораженного хряща, т.к. сообщения на эту тему носят весьма фрагментарный характер. У животных с удлинением голени, компрессией и введением орозомукоида в период фиксации увеличение содержания минеральных компонентов составило: кальция – в 1,5 раза в суставном хряще оперированной конечности и более чем в 2 раза – в контралатеральной; фосфатов – на 8,2% в оперированной конечности, на 21,8% – в контралатеральной. Отношение кальция к фосфатам в этой серии эксперимента изменено незначительно: в хряще оперированной конечности на 25% выше таковых значений в здоровом хряще, и приближаются к нормальным в хряще контралатеральной конечности.

У животных с удлинением голени, компрессией и введением орозомукоида в течение всего срока эксперимента изменение концентрации минеральных веществ происходило в другой закономерности: концентрация кальция увеличилась почти в 2 раза в хряще опытной и более чем в 1,5 в

хряще контралатеральной конечности. Отношение кальция к фосфату, характеризующее качественный состав минеральной фазы матрикса в хряще опытной конечности почти в 2 раза превысило нормальные значения и составило 3,45. Среди известных соединений величина отношения Ca/P колеблется от 0,5 (CaHPO_4) до 1,67 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$) с промежуточными значениями 1,33 ($\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3$) и 1,5 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Как следует из наших данных, в нормальном хряще значение этого показателя составляет 1,95. Исходя из этого, можно предположить, что помимо ортофосфата в гиалиновом хряще присутствуют другие соединения кальция, в первую очередь, сульфат кальция. В ранее проведенном эксперименте *in vitro* мы проверили возможность присутствия в хрящевой ткани сульфата кальция как отдельной фазы, так и кальция, связанного с сульфатами ГАГ. Для этого образцы хряща диализовали в течение 48 часов против BaCl_2 . При определении в противодиализате концентрации сульфатов выяснили, что в дегенеративно измененном хряще в несколько раз уменьшается количество фильтруемых соединений сульфатов, причем общее количество сульфатов в ткани возрастает. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что увеличение отношения Ca/P в хряще оперированной конечности животных с компрессией и введением орозомукоида в течение всего срока эксперимента происходит главным образом за счет кальция, фиксированного на органическом матриксе, и связано с повышением сульфатных групп в ткани, что говорит о глу-

боком дегенеративном изменении хряща.

Полученные нами результаты, показывающие уменьшение доли УК более чем на 40% в опытной и контралатеральной конечностях и значительное возрастание ПГ при неоднократном увеличении степени минерализации, согласуются с данными других авторов. Так, существует мнение, что на стадии кальцификации ядрами роста кристаллов выступают ПГ [5, 6]. Другие авторы [7, 8] при изучении кальцификации хряща выявили, что вопреки способности связывать кальций, агрегаты ПГ являются ингибиторами кальцификации. Помимо этого, имеются сведения, что прерывистое сдавливающее усилие управляет не только синтезом ПГ, но и процессом кальцификации матрикса хряща [9].

Для деструктурированной хрящевой ткани характерным является преобладание ПГ с короткими звеньями (низкомолекулярные). В связи с этим мы сочли необходимым исследовать распределение ГАГ и ПГ, в состав которых они входят во фракциях различной молекулярной массы, т.е. агрегированности. Распределение фракций ПГ по степени агрегации в хряще коленных суставов животных с удлинением голени, компрессией и введением орозомукоида в течение всего срока эксперимента показало, что отмечается увеличение доли мономеров и ПГ низкой степени агрегации в 1,8 раза в опытной и в 2,1 раза в контралатеральной конечностях. Можно высказать предположение, что увеличение доли ГАГ, слабосвязанных с матриксом, при постоянном введении орозомукоида объясняется выраженной способностью этого гликопротеина связываться с коллагеном и участвовать в его пространственном формировании [10]. Следовательно, увеличение компрессионной нагрузки на суставные хрящи при удлинении голени сопровождается не только развитием деструктивных процессов в органической фазе матрикса суставного хряща в результате снижения синтеза ПГ и усиления разрушения ПГ ферментами, но и нарушением связывания ГАГ и протеогликанов с коллагеном на фоне постоянно-

го введения орозомукоида.

Таким образом, было установлено, что при удлинении голени возврат к обычному двигательному стереотипу способствует реституции метаболизма протеогликанов в тканях сустава. Полученные в ходе исследования данные о динамике развития дегенеративно-дистрофических изменений хрящевой ткани при нарушениях стереотипа движений в суставах в условиях удлинения голени, при удлинении голени и компрессии, а также при удлинении голени, компрессии и введении орозомукоида, указывают на необходимость учитывать состояние суставного хряща конечностей и предупреждать развитие в нем патологических процессов. Целенаправленное изучение биохимических и биомеханических характеристик суставного хряща и синовиальной оболочки показало, что развитие патологических процессов в хрящевой ткани приводит к утрате таких механических свойств, как упругость, прочность, резистентность к сжатию, и резко ограничивает опорно-двигательную функцию конечности. В группах животных с разными режимами введения орозомукоида имеют место содружественные реакции биохимических изменений как в опытной, так и в контралатеральной конечности, а процессы имеют одну и ту же направленность.

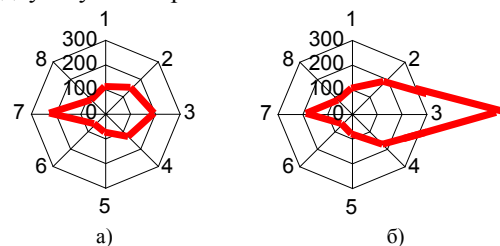


Рис. 3. Биохимические показатели суставного хряща оперированной конечности в группах собак в % от нормы: 1 - фосфаты; 2 - кальций; 3 - хлориды; 4 - кальций/фосфаты; 5 - вода; 6 - уоновые кислоты; 7 - слабосвязанные ГАГ; 8 - вязко-упругие свойства. а) с удлинением голени, компрессией и введением орозомукоида в период фиксации; б) с удлинением голени, компрессией и введением орозомукоида в течение всего срока эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические исследования зрелой костной ткани и дистракционного регенерата кости: Информационное письмо / Сост.: К.С. Десятниченко. - Курган, 1992. - 13 с.
2. Грибанов Г.А., Базанов Г.А. Модификация ультрамикроопределения общего и неорганического фосфора с помощью малахитового зеленого // Лабораторное дело. - 1976. - N 19. - С. 527-530.
3. Bitter, Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction // Anal. Biochem. - 1962. - Vol. 4. - P. 330-334.
4. Способ определения вязко-упругих свойств суставного хряща: Метод. рекомендации / ВКНЦ "ВТО"; Сост.: Л.И. Грачева, А.А. Утенькин. - Курган, 1991. - 15с.
5. Ali S.Y. Calcification of cartilage // In: Cartilage / Ed Hall B.K.. - New York, 1993. - Vol. 1. - P. 343-378
6. Isolation and characterization of a 35.000 molecular weight subunit fetal cartilage matrix protein / H.U. Choi, L.H. Tang, T.L. Johnson et al. // J. Biol. Chem. - 1983. - Vol. 258, N 1. - P. 655-661
7. Buckwalter J.A. Proteoglycan structure in calcifying cartilage // Clin. Orthop. - 1983. - N 172. - P. 207-232.
8. Greenwald R.A., Moy W.W., Seibold J. Functional properties of cartilage proteoglycans // Semin. Arthritis. Rheum. - 1978. - Vol. 8, N 1. - P. 53-67.
9. Holt C. The method for the determination of serum glycoproteins // Klin. Wschr. - 1954. - Vol. 35. - P. 66-67.
10. Саломатин В.В. Роль α 1-кислого гликопротеина в патогенезе термических поражений и перспективы его лечебного применения: Автореф. дис... д-ра. мед. наук. - Челябинск, 1993. - 40 с.

Рукопись поступила 17.01.01.