

© С.Н. Лунева, 2004

Состояние хряща и кости коленного сустава собак в условиях удлинения голени

С.Н. Лунева

The status of canine knee cartilage and bone under leg lengthening

S.N. Luniova

Государственное учреждение

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)

У беспородных собак после удлинения голени на 30% методом Илизарова проводили физико-химические исследования хрящевой и костной тканей коленного сустава. Обнаружены дегенеративно-дистрофические изменения хрящевой ткани и снижение минерализации субхондральной губчатой костной ткани опытного и контралатерального суставов. Результаты работы свидетельствуют о глубокой перестройке процессов энергообмена и регенерации костной и хрящевой тканей зоны сустава при удлинении кости.

Ключевые слова: эксперимент, беспородные собаки, удлинение голени, метод Илизарова, коленный сустав, суставной хрящ, дегенеративно-дистрофические изменения, физико-химические исследования.

The physical-and-chemical studies of the knee cartilaginous and bone tissues were made in mongrel dogs after 30% lengthening of the leg using the Ilizarov technique. Degenerative changes of the cartilaginous tissue and decrease of mineralization in the subchondral spongy bone tissue of the experimental and contralateral joints. The results of the work demonstrated great reorganization of the processes of energy metabolism and that of regeneration of the bone and cartilage tissues of the articular zone during lengthening.

Keywords: experiment, mongrel dogs, leg lengthening, the Ilizarov technique, the knee (joint), articular cartilage, degenerative changes, physical-and-chemical studies.

ВЕДЕНИЕ

Удлинение длинных трубчатых костей в настоящее время является наиболее широко распространенным путем коррекции длины и формы конечности посредством чрескостно-дистракционного остеосинтеза (ЧДО). Поэтому внимание исследователей должно быть направлено не только на сокращение сроков лечения, но и на профилактику осложнений, в частности дегенеративных изменений в суставах образованных оперированными и сочленяющимися с ними костями. Исследования, ранее выполненные в

нашем центре, показали, что при удлинении костей голени методами ЧДО в оперированной и контралатеральной конечностях развиваются изменения механических свойств и химического состава суставного хряща [1, 2, 3]. Однако остаются неразработанными вопросы состояния губчатой кости суставов, прилегающих к оперированному сегменту. Поэтому нам представилось необходимым изучить в эксперименте состояние гиалинового хряща и костной ткани коленного сустава при удлинении голени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования послужили хрящи коленных суставов 6 беспородных собак (возраст — 1-2,5 года, длина голени — 19-21 см) с удлинением голени на 30% методом чрескостно-дистракционного остеосинтеза по Илизарову. Удлинение осуществляли с темпом 1 мм в сутки за 4 приема, которое начинали через 5 дней после наложения аппарата Илизарова. Оперативное вмешательство и послеоперацион-

ное ведение животных выполнено д.м.н. А.А. Ларионовым.

После эвтаназии животных и препарирования суставов измеряли податливость суставного хряща [4]. Хрящевую и костную ткани прецизионно взвешивали на электронных аналитических весах "Tekator" ("Sartorius", ФРГ), лиофильно высушивали на установке "Lyph Lock 4,5" ("Labconco", США) и, повторно взвешивая,

определяли в пробе содержание воды. В высушенных образцах хряща и кости после жесткой деградации влажным озолением или относительно мягкого кислотного гидролиза [5] определяли основные компоненты минеральной фазы и внеклеточного органического матрикса: кальций, неорганический фосфат, сульфат, гидроксипролин [6], гексозамины [7], уроновые кислоты [8], гексозы [9], а также показатели клеточной активности хондроцитов – содержание нуклеиновых кислот [10]. Кроме того,

фракционировали протеогликаны (ПГ) по величине образуемых ими супрамолекулярных агрегатов [11] и определяли содержание каждой из выделенных фракций анализом на уроновые кислоты. Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики, применяемым для малых выборок, с принятием вероятности (р), равной 0,05. Достоверность различий между группами наблюдений оценивали с помощью критерия Т (парный критерий Вилкоксона).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При макроскопическом изучении суставной поверхности коленных суставов собак с 30% удлинением голени мы наблюдали матовый, шероховатый, с фиолетовыми пятнами, истонченный хрящ толщиной 1 мм и менее. При этом обнаружили снижение вязко-упругих свойств на 48% в хряще оперированной конечности и на 52% – в контралатеральной. Степень гидратированности ткани была одинакова в обеих конечностях и составила 94,4% от нормы.

При изучении химического состава хряща (табл. 1) было обнаружено статистически достоверное снижение концентрации ГУК на 30,4% в хряще оперированной конечности и на 34,6% – в контралатеральной. Значительно увеличивалась степень сульфатирования ГАГ, на что указывает возрастание отношения сульфаты/ГУК в 1,82 раза в хряще сустава оперированной и в 2,11 раза в хряще сустава контралатеральной конечности. Одновременно в этих же пробах материала в 2,4 раза возрастало содержание гексоз. Коэффициент гексозы/ГУК в 1,82 раза в хряще оперированной и в 2,11 раза в хряще контралатеральной конечности превысил нормальные значения.

При изучении степени минерализации матрикса хряща обнаружено её увеличение в 4,3 раза в оперированной и в 4 раза в контралатеральной конечности. За столь значительное возрастание степени минерализации хряща ответственен, в первую очередь, Са-компонент. Снижение концентрации Р было менее значительно.

При изучении биосинтетических и пролиферативных потенциалов хряща выяснилось, что при достоверном снижении концентрации ДНК и РНК, соотношение этих показателей увеличивалось. То есть при значительном, почти в 2 раза, уменьшении и пролиферативной и биосинтетической активности хондроцитов в клетке преобладают биосинтетические процессы.

На рисунке 1 показаны количественные соотношения фракций ПГ различной молекулярной массы и степени связи с остальными компонентами матрикса. Полученная нами картина распределения ПГ говорит о более существенных изменениях матрикса ХКС контралатеральной конечности. Так, доля ПГ, входящих в состав суперагрегатов, уменьшается в контралатеральной конечности более чем в 2 раза, в то же время как снижение доли ПГ данной группы в матриксе хряща оперированной конечности статистически недостоверно.

Кроме вышесказанного, сравнение отношений количества ГУК в выделенных фракциях ПГ из суставного хряща животных с удлинением голени и матрикса хряща интактных суставов показало, что в хряще как оперированной, так и контралатеральной конечности достоверно уменьшается доля мономеров ПГ. Количество агрегатов ПГ, не связанных с коллагеном, значительно увеличивается: на 40,2% – в хряще оперированной и на 47,0% – в хряще контралатеральной конечности.

Таблица 1

Механические свойства и химический состав хряща коленных суставов собак с 30% удлинением голени

Показатель	Оперированная конечность	Контралатеральная конечность	Интактный хрящ
Податливость	1,03±0,19	0,86±0,2	2,0 ± 0,12
H ₂ O	70,16±2,28	70,32±3,11	74,78±0,45
Са	33,54±1,23	28,91±2,03	10,50±1,51
Р	4,02±0,18	3,42±0,15	5,45±0,01
Са/Р	8,34±0,39	7,76±0,54	1,94±0,32
ГУК	16,74±1,5	15,73±1,39	24,03±2,86
Гексозы	30,60±3,8	33,22±2,35	14,96±2,50
Сульфаты	26,66±2,12	21,18±4,03	29,31±3,28
Сульфаты/ГУК	1,59±0,09	1,35±0,11	1,06±0,19
ДНК	0,3±0,07	0,27±0,04	0,56±0,21
РНК	2,43±0,13	2,56±0,3	4,19±0,31
РНК/ДНК	8,1±0,12	9,48±0,37	7,70±0,62

Примечание: податливость в мм/гс × 10⁻³; водный компонент в г/100 г ткани; РНК, ДНК в ммоль Р/100 г сухой ткани; остальные в ммоль/100 г сухой ткани; * - p < 0,05.

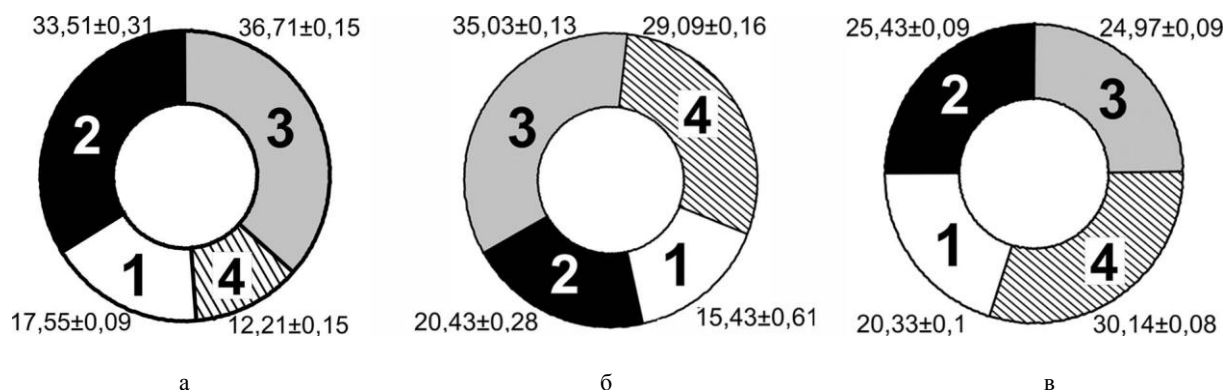


Рис. 1. Распределение фракций протеогликанов по степени агрегации в ХКС собак II-й серии эксперимента (1 – экстрагируемые 0,15М уксусом Na в течение 2 часов, 2 – экстрагируемые 0,15М уксусом Na в течение 24 часов, 3 – экстрагируемые 3М $MgCl_2$ в течение 48 часов, 4 – фракция протеолизата): а – контралатеральная конечность, б – оперированная конечность, в – интактная

При изучении степени однородности коллагена хрящей экспериментальных животных 2-ой серии нами получен дополнительный пик коллагена, не свойственный здоровой хрящевой ткани. Пик элюировался 0,75 М концентрации $NaCl$ и занимал площадь, равную 0,6% от совокупной площади коллагеновых фракций (рис. 2).

Соотношение коллагеновых фракций, выходящих при 0,1; 0,3 и 0,75 М $NaCl$, отличалось как по сравнению с хрящом здоровых животных, так и по сравнению с хрящом животных 1-ой серии эксперимента и составляло 5,7:82,65 :5,42 в хряще контралатеральной и 5,0 :73,40 :10,18 – в ХКС оперированной конечности. Дополнительный пик коллагена, выходящий при концентрации $NaCl$ 0,65 М, составил 6,14% в хряще контралатеральной и 12,09 % – в оперированной конечности.

Проведенные биохимические исследования губчатой костной ткани мышелков опытного и контралатерального суставов при удлинении

опытной голени на 30% от ее исходной длины прежде всего выявили снижение минерального компонента внеклеточного матрикса. Так, в головке оперированной конечности убыль содержания Ca составила 7,3%; P – 15%. Отношение Ca/P , характеризующее качественный состав минеральной фазы матрикса в костной ткани мышелков, в 2 раза превышало нормальные значения, что обусловлено, по нашему мнению, наличием фиксированного на органическом матриксе кальция. Кроме того, мы наблюдали достоверное изменение концентрации сульфата неорганического ($p_u < 0,05$). При этом отмечено достоверное расхождение между дисперсией нормальных значений и дисперсией значений как в оперированной, так и в контралатеральной конечности, что говорит о низкой степени варьирования признака и однородности наблюдаемых изменений минерального состава костной ткани мышелка у животных второй серии эксперимента.

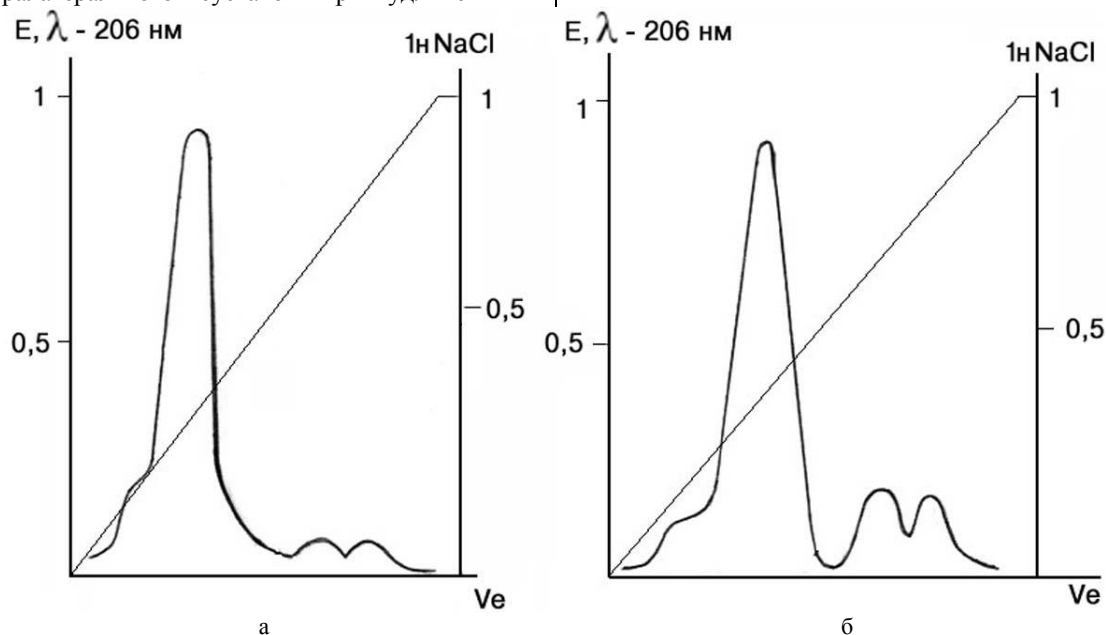


Рис. 2. Хроматографические профили коллагена хряща собак с удлинением голени на катионообменнике: а – контралатеральная конечность, б – оперированная конечность

При изучении показателей органической фазы матрикса кости мы не обнаружили достоверного изменения средней величины исследуемых показателей (табл. 2). Однако наблюдалось достоверное изменение значений дисперсии по F – критерию Фишера ($P_F < 0,05$) как между костной тканью интактных и опытных животных, так и между оперированной и контралатеральной конечностями. Это является свидетельством того, что степень варьирования показателей в опытной и контралатеральной конечностях увеличилась, т.е. ответная реакция на удлинение носила разнонаправленный характер.

Таблица 2

Химический состав губчатой кости коленного сустава собак с 30% удлинением голени от её исходной длины (2-я серия)

Показатель	Оперированная конечность	Контралатеральная конечность
H ₂ O	8,31±0,45*	8,55±0,51*
Ca	17,04±0,73*•	17,99±0,58*
P	10,68±1,30*•	10,33±0,95*•
Ca/P	1,59±0,64*•	1,74±0,15•
Общие липиды	20,13±1,17	20,86±1,05
Гексозамины	5,00±0,08	5,20 ±0,41
ГУК	26,05±2,19	23,2 ±3,14
Гексозы	1,62±0,17	1,50±0,18
Сульфаты	0,39±0,016	0,55±0,11
Сиаловые кислоты	0,35±0,05	0,38±0,03

Примечание: водный компонент в г/100 г ткани; остальные в г/100 г сухой ткани; * - $P_U < 0,05$; • - $P_F < 0,1$

Изучение активности фосфомоноэстераз показало дальнейшее усиление костного обмена, при этом наиболее значимые изменения были обнаружены нами в губчатой ткани мышечков контралатеральной конечности, где наблюдалось превалирование активности кислой щелочной фосфатазы (ТрКФ) над костной (КЩФ) и общей щелочной фосфатазой (ЩФ) (рис. 3).

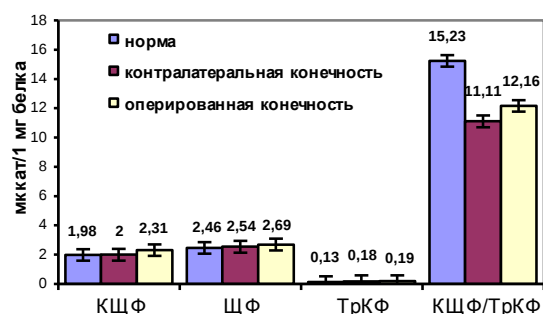


Рис. 3. Изменение активности фосфомоноэстераз после удлинения голени на 30%

Исследование ферментных систем, связанных с процессами энергообеспечения костной ткани мышечков животных с удлинением голени на 30% от ее исходной длины, показано на рисунке 4.

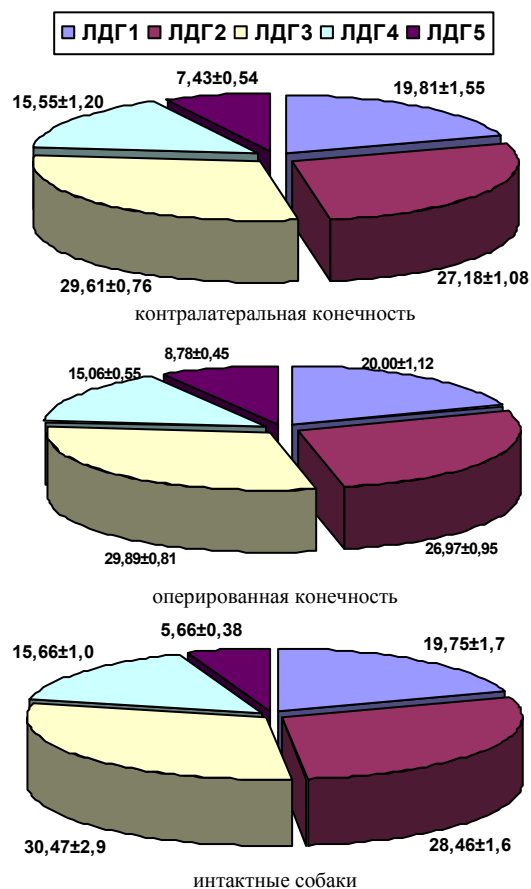


Рис. 4. Изоферментная активность собак после удлинения голени (в % от общей активности)

К моменту конца фиксации и снятия аппарата Илизарова мы обнаружили достоверные изменения активности ЛДГ₅ как в оперированной, удлиняемой конечности, так и в контралатеральной, по сравнению с величинами здоровых животных (рис. 4). Кроме того, мы обнаружили достоверные изменения в общей активности данного фермента и величины Н и М субъединиц от нормальных значений (табл. 3).

Накопление молочной (МК) и пировиноградной кислот (ПВК) в костной ткани мышечков удлиненной и контралатеральной конечностей свидетельствовало о перераспределении процессов энергетического механизма в сторону анаэробных процессов (табл. 3).

Таблица 3

Показатели гликолиза в костной ткани здоровых собак до и после удлинения голени на 30%

Показатель	Кость интактных животных	Оперированная конечность	Контралатеральная конечность
ЛДГ, Мккат/г ткани	2,80±0,13	3,60±0,21*	2,94±0,50
Н:М	1,56±0,12	1,43±0,01*	1,50±0,05
МК, ммоль/г ткани	7,60±0,62	10,24±0,96*	9,13±0,56*
ПВК, ммоль/г ткани	0,35±0,01	0,40±0,04*	0,35±0,03
МК/ПВК	21,71±0,98	25,6±1,12*	26,08±0,79*

* - $p < 0,05$.

Следовательно, представленные результаты указывают на общую закономерность: при нарушении стереотипа движений в суставе в условиях общей метаболической реакции организма на остеотомию и последующее удлинение голени на 30% от её исходной длины, вызывающее компрессионные воздействия на коленный сустав, в хряще экспериментальных животных отмечаются выраженные и дегенеративно-дистрофические изменения, выражающиеся в значительном снижении вязко-упругих свойств хряща, снижении его пролиферативных потенций и общей дегенерации матрикса. Изменения

костной ткани мышечков затрагивали прежде всего изменения степени минерализации матрикса и нарушения однородности коллагена. Накопление продуктов анаэробного гликолиза, увеличение активности ТрКФ свидетельствовало о глубокой перестройке процессов энергообеспечения и ремоделирования костной ткани, что приводило к усилению фазы катаболизма. Патологические изменения хряща и костной ткани контралатерального сустава возникали вследствие перераспределения нагрузки между конечностями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимические изменения структуры суставного хряща в условиях последовательного дистракционно-компрессионного остеосинтеза / А.В. Попков, М.Е. Матвеев, С.Н. Лунова и др. // Гений ортопедии. - 2001. - № 3. - С.53 - 56.
2. Грачева, Л.И. Влияние напряжения растяжения на механохимические характеристики удлиняемой конечности / Л.И. Грачева, Л.С. Кузнецова // Вопр. мед. хим. - 1993. - Т. 39, Вып. 6. - С. 47-52.
3. Лунова, С.Н. Дегенеративно-дистрофические изменения в суставном хряще в условиях чрескостного остеосинтеза и способ их фармакологической коррекции: Автореф. дис...канд. биол. наук / С.Н. Лунова. — Уфа, 1998. — 27 с.
4. Способ определения вязко-упругих свойств суставного хряща: Метод. рекомендации / ВКНЦ "ВТО"; Сост.: Л.И. Грачева, А.А. Утенькин. - Курган, 1991. - 15 с.
5. Функциональные биохимические исследования в клинике ортопедии и травматологии: Методические рекомендации / ВКНЦ "ВТО"; Сост.: К.С. Десятниченко, Л.И. Грачева, Л.С. Кузнецова. - Курган, 1990. - 27 с.
6. Berman, J. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline / J. Berman, R. Loxly // Anal. Chem. - 1963. - Vol. 35, N 12. - P. 1961-1965.
7. Elson, J.A. Colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine / J.A. Elson, N.T. Morgan // Biochem. J. - 1933. - N 27. - P. 182-183.
8. Bitter, T. A modified uronic acid carbazole reaction / T. Bitter, H.M. Muir // Analyt. Biochem. - 1962. - Vol. 4. - P. 330-334.
9. Holt, C. The method for the determination of serum glycoproteins / C. Holt // Klin. Wschr. - 1954. - Bd. 35. - S. 66-67.
10. Збарский, И.Б. Химия и биология нуклеиновых кислот / И.Б. Збарский, С.С. Дебов. - Л., 1968. - С. 80-81.
11. Косягин, Д.В. Осаждение гликозаминогликанов этанолом, их очистка и исследование / Д.В. Косягин // Лаб. дело. - 1989. - N 8. - С. 34-36.

Рукопись поступила 15.01.03.