



Цифровая колориметрическая стереология и электронно-зондовый микроанализ в изучении сульфатированных гликозаминогликанов в суставном хряще наружного мыщелка бедра при разных режимах удлинения голени в эксперименте

М.М. Щудло, Т.А.Ступина

ФГУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова Росмедтехнологий», ПНИЛ «Управляемые гисто- и органогенезы» Курганского филиала ЮУНЦ РАМН, Курган, Россия

РЕЗЮМЕ, ABSTRACT

Анализ содержания сульфатированных гликозаминогликанов и протеогликанов в межклеточном матриксе суставного хряща в разных условиях эксперимента позволяет прогнозировать активность и качество репаративных процессов (Укр.журнал телемедицины и мед.телематики.-2010.-Т.8,№2.-С.148-152).

Ключевые слова: суставной хрящ, матрикс

М.М. Щудло, Т.А. Ступина

ЦИФРОВА КОЛОРИМЕТРИЧНА СТЕРЕОЛОГІЯ ТА ЕЛЕКТРОННО-ЗОНДОВИЙ МІКРОАНАЛІЗ У ВИВЧЕННІ СУЛЬФАТОВАНИХ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ У СУГЛОБНОМУ ХРЯЩІ ЗОВНІШНЬОГО ВИРОСТКА СТЕГНА ПРИ РІЗНИХ РЕЖИМАХ ПОДОВЖЕННЯ ГОМІЛКИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

ФДУ «Російський науковий центр «Відновна травматологія та ортопедія» імені академіка Г.А. Ілізарова, ПНДЛ «Керовані гісто- і органогенези» Курганської філії ПУНЦ РАМН, Курган, Росія

Аналіз змісту сульфатованих глікозамінгліканів та протеогліканів у міжклітинному матриксі суглобного хряща в різних умовах експерименту дозволяє прогнозувати активність і якість репаративних процесів (Укр.журнал телемедицини та мед.телематики.-2010.-Т.8,№2.-С.148-152).

Ключові слова: суглобний хрящ, матрикс

М.М.Schudlo, T.A.Stupina

DIGITAL COLORIMETRIC STEREOLOGY AND ELECTRONIC PROBE MICROANALYSIS FOR INVESTIGATION OF THE CARTILAGE METABOLISM DURING TIBIA LENGTHENING (IN EXPERIMENT)

State Science Institution Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics», Scientific Center «Controlled Hysto- and Organogenesis», Kurgan State University, Kurgan, Russia

Analysis of the sulfatic glycoaminoglycan and proteoglycans in intercellular matrix of the joint cartilage allows to make prognosis of activity and quality of the reparation during bone lengthening (Ukr.z.telemed.med.telemat.-2010.-Vol.8,№2.-P.148-152).

Key words: joint cartilage, matrix

При дистракционном остеосинтезе в суставном хряще экспериментальных животных морфологически выявлены изменения, в разной степени выраженные в зависимости от режима удлинения [6]. Эта реакция явля-

ется каскадным процессом, в котором участвуют и клетки, и компоненты внеклеточного матрикса, в первую очередь сульфатированные гликозаминогликаны (сГАГ) в составе протеогликанов (ПГ), которые играют ос-

новную роль в поддержании гомеостаза хрящевых тканей, обеспечивают их прочность, архитектуру, межклеточные взаимодействия, митогенную активность и рецепторную функцию клеток [2]. Содержание сГАГ в образцах хряща можно оценивать по результатам рентгеновского электронно-зондового микроанализа серы [4]. В то же время полианионный характер ПГ позволяет

выявлять их гистохимически по метакроматическому (МТХ) окрашиванию и его колориметрическому анализу по оригинальной [5;7-8] технологии в полноцветных цифровых изображениях, переданных по телекоммуникационным каналам связи. Возможность сопоставления количественных данных, полученных с применением разных технологий, представляется наиболее интересной.

Цель исследования

Анализ содержания сГАГ в межклеточном матриксе суставного хряща наружного

мышцелка бедра при разных режимах удлинения голени в эксперименте.

Материал и методы

В качестве объекта использованы полутонкие (толщиной 1,0 мкм) большой площади (8-10 мм²) эпоксидные срезы суставного хряща наружного мышцелка бедра взрослых беспородных собак: интактных (контроль – К, n=3) и опытных (эксперименты выполнены д.м.н. С.А.Ерофеевым) через 30 суток фиксации после удлинения голени на 30 мм по 1 мм в сутки в двух режимах: серия О1 (n=3) – за 8 ручных подкруток и серия О2 (n=3) – за 60 включений автодистрактора. Окрашенные метиленовым синим препараты микрофотографировали и оцифровывали в программе Color с помощью АПК "ДиаМорф" (Москва), смонтированного на большом исследовательском фотомикроскопе Opton (Германия). Полноцветные (24 бит/пиксел) изображения транспортировали по локальной компьютерной

сети и анализировали в программах Adobe Photo-Shop и DiaMorph разных версий. Для выделения и колориметрической планиметрии орто- и метакроматически окрашенных участков межклеточного матрикса использовали технологии, основанные на известном [Щудло М.М. & Н.А., 2006] принципе группировки оттенков цифрового цвета. С помощью рентгеновского электронно-зондового микроанализатора "INKA Energy 200" (Oxford Instruments Analytical, Англия), смонтированного на сканирующем электронном микроскопе "JSM-840" (Jeol, Япония), в образцах суставного хряща тех же животных определяли концентрацию серы (S) как массовую долю – весовые % (ω). Цифровой материал анализировали в программе Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Неравномерное содержание серы в зонах суставного хряща (в поверхностной – наименьшее, в глубокой – наибольшее) выявлено при электронно-зондовом микроанализе как у интактных (ωSK), так и у опытных (ωSO1 и ωSO2) животных (рис.1). В поверхностной зоне ωSK составляет 0,34%, в про-

межуточной – 0,42% и в глубокой – 0,50% (интервалы = 0,08%). Достоверное (p<0,05) снижение концентрации серы во всех зонах хряща выявлено в опытах: ωSO1 и ωSO2 в поверхностной зоне составляют 0,15% и 0,2%; соответственно в промежуточной – 0,22% и 0,25%; в глубокой – 0,3% и 0,33%.

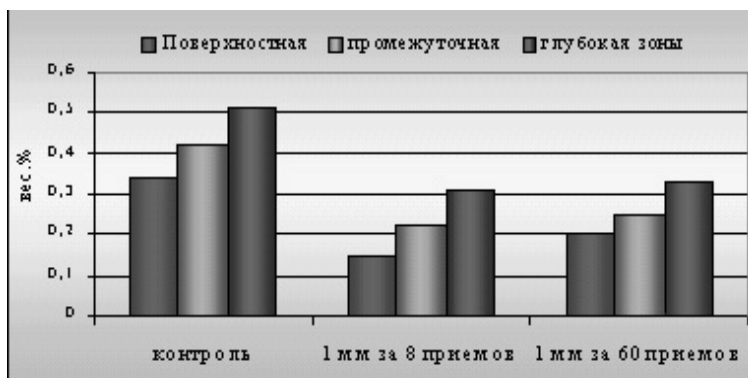


Рисунок 1. Содержание серы в суставном хряще на этапе фиксации

Как видим, у экспериментальных животных изменились интервалы только между значениями ωS поверхностной и промежуточной зон до 0,07 в серии O1 и до 0,05 – в серии O2, тогда как величина интервала между ωS промежуточной и глубокой зон сохранилась, равно как и направленность поверхностно-глубинного градиента концен-

трации серы (рис.2). Такой же направленности поверхностно-глубинный градиент интенсивности МТХ-реакции обнаружен в микропрепаратах суставного хряща: в поверхностной зоне наряду с ортохроматически окрашенными структурами визуализируются очаги γ -метахромазии слабой интенсивности (γ МТХ+).

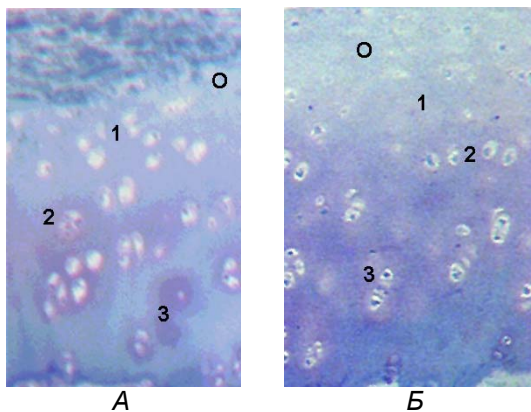


Рисунок 2. Цифровые полноцветные изображения микропрепаратов суставного хряща. Полутонкие срезы, окраска метиленовым синим. Об.- 6,3; ок.- 12,5х. А - серия O1. Б - серия O2. 0 – ортохроматически и 1,2,3 – метахроматически окрашенные участки межклеточного матрикса

Реакция средней интенсивности (γ МТХ++) характерна для межтерриториального матрикса промежуточной и глубокой зон, а территориальный матрикс последней интенсивно метахроматичен (γ МТХ+++). Как в препаратах, так и в их цифровых изображениях границы между разноокрашенными

участками, особенно орто- и γ МТХ+, смазаны и визуально определяются с трудом.

Примененная технология колориметрического анализа полноцветных цифровых изображений микропрепаратов позволила получить четкие цветовые характеристики всех перечисленных участков (рис.3).

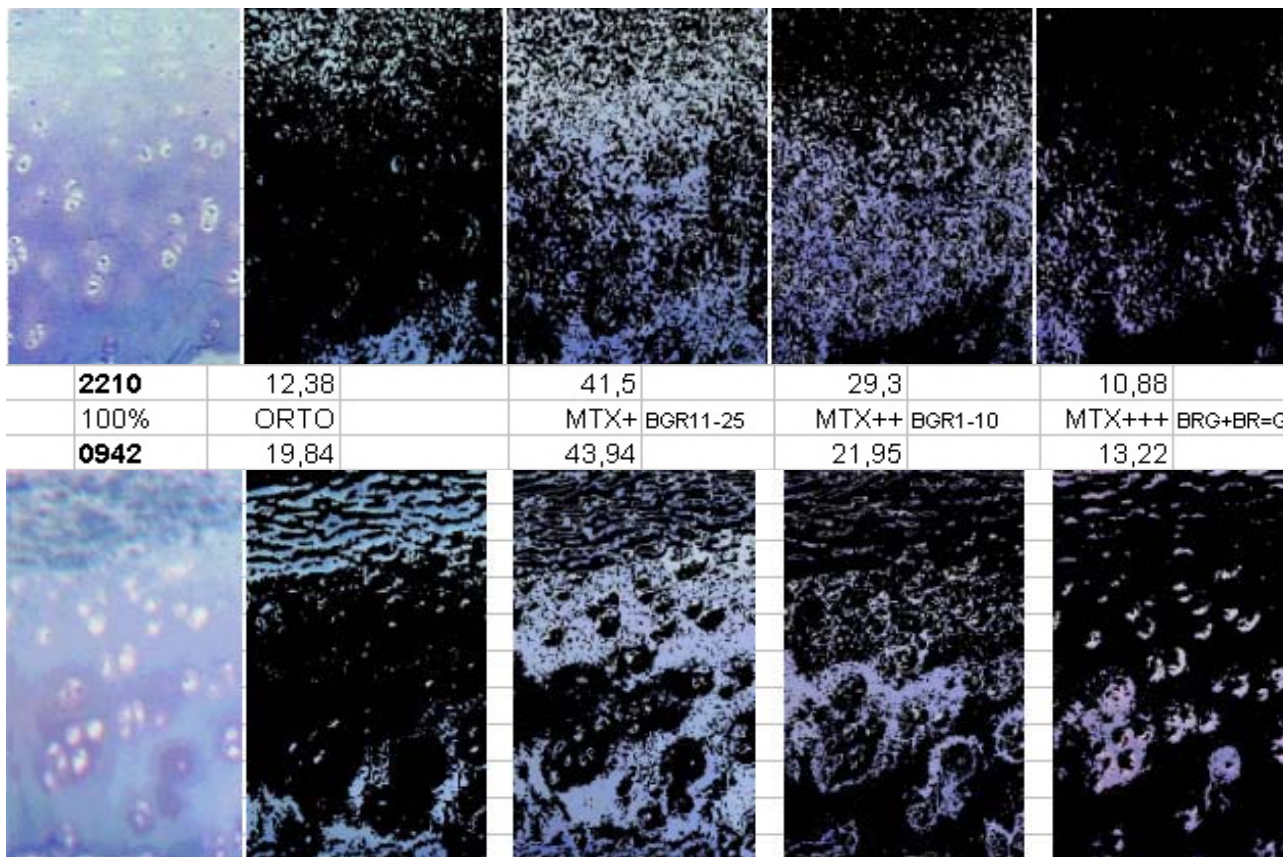


Рисунок 3. Результаты цветовой сегментации цифровых изображений микропрепаратов суставного хряща. Вверху – серия O2, внизу – серия O1

Так, для ортохромазии, а также слабой и средней интенсивности γ -метахромазии типично соотношение интенсивностей (I) по RGB-каналам, описываемое неравенством $I_B > I_G > I_R$; по классификации М.М. и Н.А. Щудло [<http://www.csc.ac.ru/ej/file/3738>] это цветовая тональность В2. Отличия между участками определяются величиной интервала между интенсивностями зеленого и красного каналов: при ортохроматическом окрашивании он превышает 25 условных единиц, при слабой метахромазии интервал находится в пределах 11-25, а в участках γ МТХ++ он колеблется от 1 до 10 у.е. В зонах метахромазии высокой интенсивности пиксели по цветовым параметрам относятся либо к тональности В3, для которой характерно равенство интенсивностей по красному и зеленому каналам ($I_B > I_R = I_G$), либо к тональности В1 – здесь красная составляющая занимает вторую позицию ($I_B > I_R > I_G$). Полученная таким образом информация позволила осуществить сегментацию цифровых изображений микропрепаратов суставного хряща, выделив однотипно окрашенные участки, а затем провести колориметрическую плани- и стереометрию, соответственно измеряя площадь участков каждого типа и оценивая их долю в общей площади изображения. Существенные отличия в сравниваемых сериях имело топографическое распределение орто- и метахроматических участков. В серии О1 выявлены линейные и мелкоточечные участки МТХ слабой и средней интенсивности, распределённые по поверхности волокон; в аморфной части матрикса поверхностной зоны (между волокнами) определялись участки интенсивной МТХ. В серии О2 очаги разволокнения поверхностной зоны отсутствовали, участков интенсивной МТХ в поверхностной зоне нет. Средней интенсивности МТХ определялась в виде немногочисленных точечных участков в основном в глубоких слоях поверхностной зоны. Распределение многочисленных очажков МТХ слабой интенсивности имело градиент от поверхностных к глубоким слоям. При руч-

ной дистракции как в промежуточной, так и глубокой зонах отмечается преимущественное сосредоточение участков интенсивной МТХ в территориальном матриксе, а среднеинтенсивной МТХ – в межтерриториальном матриксе. В опытах с автодистракцией эти градиенты выражены менее отчётливо.

Известно, что метаболизм ПГ и сГАГ изменяется уже на самых ранних этапах повреждения суставного хряща [3,9]. Результаты микроанализа показали, что в суставном хряще экспериментальных животных происходит потеря матриксом составляющих частей протеогликанов - сГАГ из поверхностной, промежуточной и глубокой зон. Отмеченные изменения межклеточного матрикса хряща сопровождались гибелью и деструкцией части клеток, увеличивалось количество пустых клеточных лакун, наблюдаемые изменения наиболее были выражены в серии О1. В норме цепи сГАГ в свободном виде практически отсутствуют, но при патологических состояниях, когда идет разрушение белково-полисахаридных комплексов, они появляются и способны проявлять свои дополнительные уникальные свойства. Одним из них является способность сГАГ влиять на пролиферацию и обмен хондроцитов [2]. В суставном хряще опытных животных отмечено увеличение количества изогенных групп клеток в промежуточной зоне (наиболее выраженное в серии О1) по сравнению с суставным хрящом интактных животных, чем и объясняется снижение интервала между значениями ωS поверхностной и промежуточной зон. Известно, что пролиферативные и биосинтетические процессы являются конкурентными на уровне отдельной клетки [1]. В обеих группах выявленная интенсивная МТХ территориального матрикса промежуточной и глубокой зон обусловлена усиленной продукцией клетками сГАГ. Репаративная регенерация суставного хряща в данных условиях эксперимента осуществлялась за счет интерстициального (вставочного) роста - пролиферативных и биосинтетических процессов.

Выводы

Анализ содержания сГАГ и ПГ в межклеточном матриксе суставного хряща в разных условиях эксперимента позволяет прогнозировать активность и качество репаративных процессов и, в частности, с этих позиций оценивать предпочтительность того или иного режима дистракции при удлинении конеч-

ностей. Высокодетальная автодистракция с темпом 1 мм позволяет снизить травматизацию смежных суставов и обеспечивает высокую эффективность адаптационных реакций, направленных на восстановление структуры суставного хряща.

Литература и веб-библиография

1. Данилов Р.К., Боровая Т.Г., Клочков Н.Д. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей // Морфология. – 2000. - №4 – С. 7-16.
2. Зайдман А.М., Корель А.В. Структурно-функциональные особенности пластинки роста тела позвонка человека в критические периоды роста // Хирургия позвоночника. – 2004. - №2. – С. 113-120.
3. Павлова В.Н. и др. Хрящ / В.Н. Павлова, Т.Н. Копьева, Л.И. Слуцкий, Г.Г. Павлов. - М.: Медицина, 1988. - 320 с.
4. Шахламов В.А., Буравков С.В. Применение метода рентгеноспектрального локального микроанализа в биологии и медицине // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1983. - №4. – С. 95-107.
5. Щудло М.М., Ступина Т.А., Щудло Н.А. Количественный анализ метахромазии суставного хряща в телепатологии // "Известия Челябинского научного центра". Специальный выпуск к 60-летию РАМН, 2004.- С. 17-22. http://csc.ac.ru/news/2004_special/04.zip
6. Щудло М.М., Ступина Т.А., Ерофеев С.А. Экспериментально-гисто-логическое исследование суставного хряща наружного мыщелка бедра при удлинении голени собак // Морфология. - 2005. – №5. – С. 67-71.
7. Щудло М.М., Щудло Н.А. Принцип группировки оттенков аддитивного цифрового цвета в RGB-модели // Известия Челябинского НЦ. - 2006.- № 4 (34). - С. 140-144. - <http://www.csc.ac.ru/ej/file/3738>.
8. Щудло М.М., Щудло Н.А. Возможности количественного анализа цифровых полноцветных изображений микропрепаратов. Материалы II Международного эмбриологического симпозиума «Югра-Эмбрио-2006» г. Ханты-Мансийск, 5-6 октября 2006г. // Научный вестник Х-МГМИ, 2006. № 2. С. 118-119.
9. Hardingham T. Chondroitin sulfate and joint disease // Osteoarthritis Cartilage. – 1998. №6. – S. 3-5.

Надійшла до редакції: 05.10.2009.

© М.М.Щудло, Т.А.Ступина

Кореспонденція: Щудло М.М.,
вул.Климова ,41, кв.10, 640020, Курган, Росія
E-mail: m.m.sch@mail.ru