

© Т. А. Ступина, М. М. Щудло, Н. А. Щудло, 2016
УДК 611.758:616.72-007.248:636.7

Т. А. Ступина¹, М. М. Щудло², Н. А. Щудло²

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ КОЛЕННОГО СУСТАВА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТЕОАРТРОЗА И ОРТОПЕДИЧЕСКОМ УДЛИНЕНИИ ГОЛЕНИ У СОБАК

¹ Лаборатория морфологии (зав. — канд. биол. наук Т. А. Силантьева), ² клинико-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти (зав. — д-р мед. наук Н. А. Щудло), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова Минздрава России, г. Курган

Цель исследования — анализ структурной реорганизации синовиальной оболочки коленного сустава собак при моделировании первичного остеоартроза (МОА) и при удлинении голени (УГ). Методами световой микроскопии и морфометрии эпоксидных полутонких срезов оценены толщина покровного слоя синовиальной оболочки, количество слоёв синовиоцитов, дана их характеристика, определены численная плотность сосудов, изменения нервов и клеточный состав субсиновиального слоя. При МОА отмечено преобладание синовиоцитов типа А, гиповаскуляризация и необратимые изменения нервов субсиновиального слоя, при УГ — разнообразие размеров и формы синовиоцитов типа В, гиперваскуляризация субсиновиального слоя и признаки восстановления его иннервации. Сделан вывод, что гиперпластическая синовиопатия возможна как при гипо-, так и при гиперваскуляризации субсиновиального слоя.

Ключевые слова: синовиальная оболочка, моделирование остеоартроза, удлинение голени

С учётом данных о роли сосудистой патологии в инициации и прогрессировании остеоартроза [12] разработана экспериментальная модель [3], сочетающая 2 патогенетических фактора — иммобилизацию сустава и редуцированное кровоснабжение конечности [9]. Факторы ограничения подвижности и кровоснабжения действуют и при ортопедических операциях по удлинению конечностей в эксперименте и клинике [4, 10]; они вызывают изменения суставного хряща [5], снижающие качество функциональной реабилитации. Для уточнения представлений о рисках и механизмах развития остеоартроза у пациентов, перенесших ортопедическое удлинение конечности, необходимо сопоставление закономерностей структурной реорганизации тканей суставов в различных биологических моделях этих состояний.

Цель данного исследования — анализ структурной реорганизации синовиальной оболочки коленного сустава у собак при моделировании остеоартроза (МОА) с редуцированным кровоснабжением и при удлинении голени (УГ) по методике, наиболее часто применяемой в клинике.

Материал и методы. Исследование проведено на 5 интактных (контроль) и 11 оперированных собаках, кото-

рые были разделены на 2 группы. 1-й группе собак (n=5 — МОА) перевязывали поверхностную бедренную артерию, коленные суставы фиксировали в течение 28 сут в среднефизиологическом положении аппаратом Илизарова. Собакам 2-й (n=6 — УГ) группы после остеотомии большеберцовой кости на уровне проксимального метадиафиза осуществляли УГ на 15% от исходной длины distraction костных фрагментов в аппарате Илизарова по 1 мм/сут за 4 приёма в течение 28 сут. Затем в течение 35 сут голень фиксировали в аппарате до момента консолидации костного регенерата, после чего аппарат снимали и продолжали наблюдения после снятия аппарата еще 30 сут. Содержание и эвтаназию животных проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» [2]. Манипуляции, проводимые на животных, рассмотрены и одобрены этическим комитетом [протокол № 6 (42) от 02.12.2014 г.] Российского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова. После вскрытия коленных суставов иссекали участки синовиальной оболочки из супрапателлярной зоны. Образцы подвергали альдегидно-осмиевой фиксации, заключали в аралдит. Полутонкие (толщиной 0,5–1,0 мкм) срезы готовили на ультратоме Nova (LKB, Швеция), окрашивали толудиновым синим и метиленовым синим — основным фуксином. Препараты исследовали под фотомикроскопом Opton (Opton, Германия). Морфометрические исследования выполнены с помощью аппаратно-программного комплекса «ДиаМорф» (Москва) и программы «BT-Мастер-Морфология» (ВидеоТест, Санкт-Петербург).

Сведения об авторах:

Ступина Татьяна Анатольевна (e-mail: StupinaSTA@mail.ru), лаборатория морфологии, Щудло Михаил Моисеевич, Щудло Наталья Анатольевна (e-mail: nshchudlo@mail.ru), клинико-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, 640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6

На серийных срезах случайным образом отобранных 2 блоков у каждого животного каждой группы определяли толщину покровного слоя (мкм), количество рядов синовиальных клеток, численную плотность микрососудов.

Систематический ввод полей зрения рядами, ориентированными строго по длиннику среза, обеспечивал получение репрезентативной выборки. При увеличении 500 оцифровывали по 10 полей зрения с каждого среза, площадь тестового поля — 9616,53 мкм². Результаты представлены в виде среднего значения и его стандартной ошибки.

Для определения статистической значимости различий полученных данных использовали критерий Вилкоксона, используя программу AtteStat, версия 1.0 [1] в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Результаты исследования. Покровный слой синовиальной оболочки у интактных животных был представлен клетками вытянутой, веретенообразной формы, расположенными в 1–2 слоя. Среди них преобладали синовиоциты В (секреторные). Синовиальный слой плавно переходил от аваскулярного внутреннего покрытия, содержавшего множество клеток, к васкуляризированной субсиновиальной соединительной ткани с большим содержанием кровеносных сосудов, но меньшим количеством клеточных элементов — в основном гистиоцитов и фибробластов. По мере приближения к соединению с фиброзной капсулой субсиновиальный (коллагеново-эластический) слой содержал большое количество коллагеновых волокон, которые имели равномерное параллельное расположение.

В группе собак при МОА была отмечена очаговая гиперплазия синовиальной оболочки. Утолщение покровного слоя происходило за счёт увеличения размеров клеток и количества их слоёв (таблица).

В очагах гиперплазии увеличивалось представительство синовиоцитов А (фагоцитирующих). Клетки имели выросты, различимые на светоптическом уровне: ядра, расположенные эксцентрично, цитоплазма была вакуолизирована, с зернистыми включениями. В собственном веществе покровного слоя пучки коллагеновых волокон были разреженными. На большем протяжении покровного слоя синовиоциты были мелкие с пикнотичными ядрами, местами отсутствовали. В верхних слоях субсиновиального слоя наблюдался липоматоз, в глубоких — признаки отека с редким расположением и разволокнением коллагеновых волокон, увеличением оптических пустот между ними (рис. 1, а).

В нервах субсиновиального слоя имелся отёк эндоневрия, безмиелиновых волокон, многие миелиновые волокна находились в состоянии аксональной атрофии или дегенерации (см. рис. 1, б). Численная плотность микрососудов по сравнению с контролем была значимо снижена (см. таблицу).

Морфометрические характеристики синовиальной оболочки при экспериментальном моделировании остеоартроза (МОА) и ортопедическом удлинении голени (УГ) у собак

Исследованный показатель	Группы		
	Контроль	МОА	УГ
Толщина покровного слоя, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм	26,1 $\pm$ 2,0	62,7 $\pm$ 2,3*	28 сут дистракции 44,8 $\pm$ 2,9* 30 сут без аппарата 28,2 $\pm$ 0,6
Характеристика клеток покровного слоя	Преобладают синовиоциты В (секреторные)	В очагах гиперплазии преобладают синовиоциты А (фагоцитирующие), на большем протяжении синовиоциты с пикнотичными ядрами или отсутствуют	Признаки повышенной функциональной активности синовиоцитов А, участки с деструкцией синовиоцитов и клеточный детрит
Количество слоёв синовиоцитов	1–2	2–4	1–2
Изменения субсиновиального слоя	–	Липоматоз	Увеличение количества тучных клеток
Численная плотность микрососудов, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	335 $\pm$ 29	150 $\pm$ 18*	439 $\pm$ 38*
Преобладающие изменения нервных волокон в нервах субсиновиального слоя	–	Аксональная атрофия или дегенерация	Валлеровская дегенерация — регенерация

* Различия по сравнению с контролем значимы при $P < 0.05$.

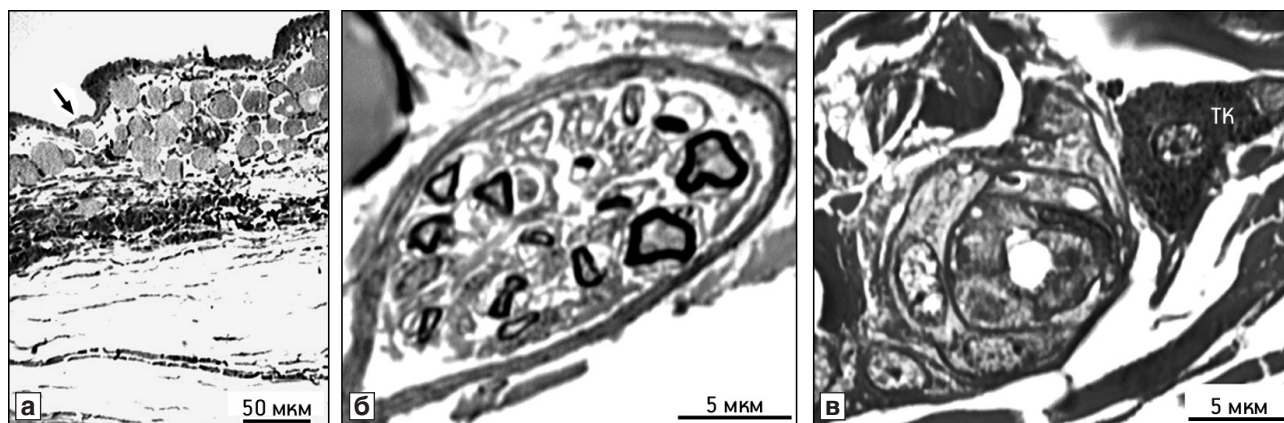


Рис. 1. Синовиальная оболочка коленного сустава собаки через 28 сут иммобилизации при моделировании остеоартроза.

а — отсутствие синовиоцитов в покровном слое (стрелка), липоматоз субсиновиального слоя; б — нерв в субсиновиальном слое; в — сосуд в субсиновиальном слое, тучная клетка (ТК). а, в — окраска метиленовым синим — основным фуксином; б — окраска толуидиновым синим

Их просветы сужены, стенки утолщены за счёт внутриклеточного отёка, во многих эндотелиоцитах определялся кариорексис (см. рис. 1, в), содержание периваскулярных тучных клеток умеренно повышено. Нередко встречались микрососуды с облитерированными или тромбированными просветами. В артериях малого калибра преобладали эндотелиальные клетки булабовидной формы, вакуолярная дистрофия гладких миоцитов (ГМ).

Во 2-й группе собак через 28 сут distraction было отмечено менее выраженное утолщение покровного слоя синовиальной оболочки (рис. 2, а), чем в группе при МОА (см. таблицу). В его составе синовиоциты В были разных размеров и формы. Встречались участки с отсутствием покровного слоя либо с признаками клеточной гибели. Численная плотность микрососудов в субсиновиальном слое незначимо превышала контроль (см. таблицу). В стенке артерий малого калибра преобладала продольная ориентация

ГМ. В составе интимы встречались ГМ веретёновидной формы. В микрососудах были нередки явления вакуольной дегенерации и некротической гибели ГМ (см. рис. 2, б). В нервах около 50% миелиновых волокон находились в состоянии валлеровской дегенерации (см. рис. 2, в) и, наряду с продуктами распада, содержали регенерирующие аксональные выросты.

Через 30 сут после снятия аппарата толщина покровного слоя синовиальной оболочки была уменьшена за счёт редукции количества клеточных рядов синовиоцитов (рис. 3, а; см. таблицу). Часть синовиоцитов находились в состоянии деструкции, некоторые участки покровного слоя содержали только клеточный детрит. В других участках многие синовиоциты А имели значительное количество вакуолей и пиноцитозных пузырьков. В субсиновиальном слое численная плотность микрососудов на 31% превышала таковую в контроле ($P < 0,05$), было увеличено количество

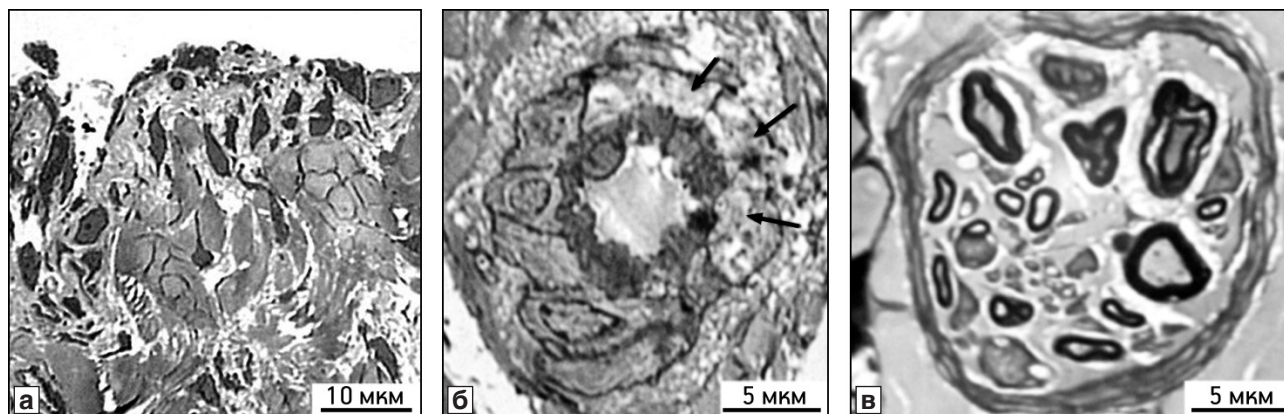
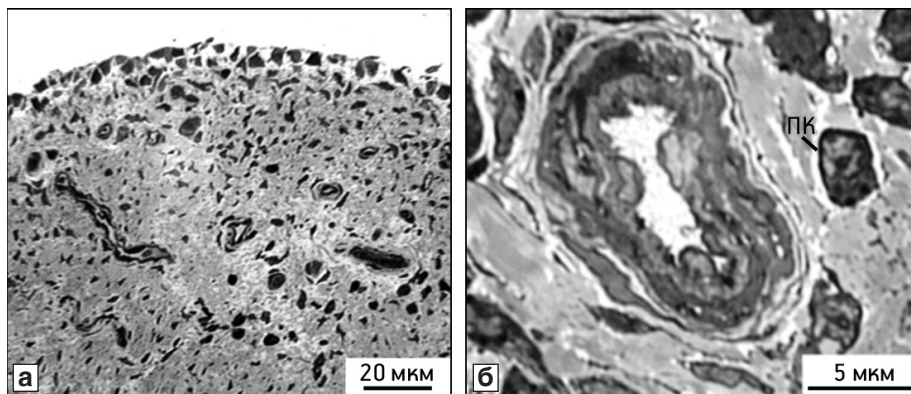


Рис. 2. Синовиальная оболочка коленного сустава собаки через 28 сут distraction при удлинении голени.

а — незначительное утолщение покровного слоя синовиальной оболочки; б — некроз гладких миоцитов (стрелки); в — часть миелиновых нервных волокон в состоянии деструкции. а, б — окраска метиленовым синим — основным фуксином; в — окраска толуидиновым синим

Рис. 3. Синовиальная оболочка коленного сустава собаки при удлинении голени через 30 сут после снятия аппарата.

а — покровный и субсиновиальный слои синовиальной оболочки; б — сосуд в субсиновиальном слое, плазматическая клетка (ПК). а — окраска метиленовым синим — основным фуксином; б — окраска толуидиновым синим



тучных клеток, в том числе на разных стадиях дегрануляции. Вокруг микрососудов увеличено количество периваскулярных и плазматических клеток (см. рис. 3, б).

В одном наблюдении выявлены признаки асептического воспаления — повышенное содержание плазматических клеток и лимфоцитов в субсиновиальном слое. Пучки коллагеновых волокон дезорганизованы и разрежены. В некоторых нервах были выявлены локусы субпериневрального отёка, увеличение количества макрофагов, расположенных как субпериневрально, так и в эндоневрии, вакуолизация аксонов и миелиновой оболочки.

Обсуждение полученных данных. Нами проведено сопоставление изменений синовиальной оболочки коленного сустава в двух разных экспериментальных моделях: гонартроза с редуцированным кровоснабжением и клинически адекватной экспериментальной модели УГ.

Ранее было показано, что оценка синовита по шкале V.Krenn и соавт. [14] в первой из этих моделей [8] соответствует отчетливо выраженному синовиту, а во второй [7] — умеренному, хотя и прогрессирующему.

Оценка состояния покровного и субсиновиального слоя по более сложной шкале [15] свидетельствует, что обе модели характеризуются синовиопатией гиперпластического типа, но проявляют и некоторые признаки воспалительной. Основное различие моделей состоит в том, что первая характеризуется гиповаскуляризацией субсиновиального слоя, а вторая — постепенным развитием гиперваскуляризации.

При экспериментальном УГ у собак на 15% исходной длины автодистракцией с повышенным темпом — 3 мм за 120 приемов в сутки отмечен синовит умеренной и слабой степени на фоне гиповаскуляризации субсиновиального слоя [6]. Хотя ангиогенез в синовиальной оболочке рассматривается как ключевая мишень в лечении остеоартроза [13], а гибель синовиоцитов — как

основной механизм, купирующий синовит [11], полученные и опубликованные ранее данные свидетельствуют о неоднозначной взаимосвязи выраженности синовита с васкуляризацией синовиального слоя и морфологическими проявлениями гибели синовиоцитов.

Таким образом, экспериментальное исследование клинически релевантной модели УГ в сопоставлении с МОА с редуцированным кровоснабжением свидетельствует о возможности развития гиперпластической формы синовита как при гипо-, так и при гиперваскуляризации субсиновиального слоя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. СПб.: Питер, 2001.
2. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопр. реконструктивной и пластической хирургии. 2003. № 4. С. 34–36.
3. Патент РФ № 2452999. Способ моделирования остеоартроза коленного сустава / В.Д.Макушин, М.А.Степанов, Т.А.Ступина. Заявка № 2011104885/14 от 09.02.2011 г. Оpubл. в БИ. 2012. № 16. С. 1–8.
4. Петровская Н.В., Щудло Н.А., Борисова И.В., Степанов М.А. Гистологические изменения структур переднего фасциального пространства голени при её удлинении на уровне верхней трети // Гений ортопедии. 2012. № 2. С. 135–139.
5. Ступина Т.А., Щудло М.М. Структурная адаптивность и репаративные возможности суставного хряща в зависимости от условий удлинения смежного сегмента конечности // Травматол. и ортопед. России. 2011. Т. 62, № 4. С. 62–68.
6. Ступина Т.А., Щудло М.М., Щудло Н.А. Изменения синовиальной оболочки и суставного хряща коленного сустава при удлинении голени автодистрактором с повышенным суточным темпом // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 3. С. 66–70.
7. Ступина Т.А., Щудло Н.А., Петровская Н.В., Степанов М.А. Гистоморфометрический анализ суставного хряща и синовиальной оболочки коленного сустава при метадиафизарном удлинении голени // Травматол. и ортопед. России. 2013. Т. 67, № 1. С. 80–86.
8. Ступина Т.А., Щудло Н.А., Степанов М.А. Структурная реорганизация основных компонентов сустава при экспери-

- ментальном моделировании остеоартроза с редуцированным кровоснабжением // Морфология. 2014. Т. 146, вып. 5. С. 61–68.
9. Шевцов В. И., Макушин В. Д., Ступина Т. А., Степанов М. А. К вопросу моделирования остеоартроза коленного сустава у собак для изучения патогенеза // Гений ортопедии. 2012. № 1. С. 38–42.
10. Шевцов В. И., Меньщикова Т. И., Щуров В. А. Теоретические предпосылки и практические последствия увеличения длины нижних конечностей у больных с ахондроплазией // Росс. журн. биомеханики. 2000. Т. 4, № 3. С. 74–79.
11. Cimpean A., Calojano M., Zarnescu O. et al. Synovial membrane pathology and its implication in human osteoarthritis // J. Med. Biochem. 1999. Vol. 3, № 4. P. 379–387.
12. Findlay D. M. Vascular pathology and osteoarthritis // Rev. Rheumatol. 2007. Vol. 46. P. 1763–1768.
13. Henrotin Y., Pessese L., Lambert C. Targeting the synovial angiogenesis as a novel treatment approach to osteoarthritis // Ther. Adv. Musculoskel. Dis. 2014. Vol. 6, № 1. P. 20–34.
14. Krenn V., Morawietz L., Burmester G.-R. et al. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis // Histopathology. 2006. Vol. 49. P. 358–364.
15. Oehler S., Neureiter D., Meyer-Scholten C. Subtyping of osteoarthritic synovial pathology // Clin. Exp. Rheumatol. 2002. Vol. 20. P. 633–640.

Поступила в редакцию 16.04.2015
Получена после доработки 23.02.2016

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE KNEE JOINT SYNOVIAL FLUID IN EXPERIMENTAL MODELING OF OSTEOARTHRITIS AND ORTHOPEDIC BONE LENGTHENING IN DOGS

T. A. Stupina¹, M. M. Shchudlo², N. A. Shchudlo²

The experiment was aimed at studying the structural reorganization of the knee joint synovium in dogs with modeling of primary osteoarthritis (MOP) and tibial lengthening (TL). The methods of light microscopy and histomorphometry of semithin epoxy sections were used to assess the thickness of synovial surface layer, number of synoviocyte layers, characterize the cells, to measure the numerical density of vessels, and to define the changes of the nerves and cell composition of the subsynovial layer. In MOP-group, the predominance of type A synoviocytes, hypovascularity and irreversible changes in the nerves of subsynovial sheath were observed. In TL-group, the diversity of type B synoviocyte forms and sizes, hypervascularity of subsynovial layer and signs of its re-innervation were detected. It is concluded that the hyperplastic synovial pathology is possible in cases of both hypo- and hypervascularization of subsynovial layer.

Key words: *synovium, osteoarthritis modeling, tibial lengthening*

¹ Laboratory of Morphology, ² Clinical and Experimental Laboratory of Reconstructive Microsurgery and Hand Surgery, Russian G. A. Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopedics, Kurgan