

© Т. А. Ступина, М. А. Степанов, М. П. Тепленький, 2016
УДК 616.72-018.3-007.248-085

Т. А. Ступина¹, М. А. Степанов², М. П. Тепленький³

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУСТАВНОГО ХРЯЩА В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТЕОАРТРОЗА С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ТУННЕЛИЗАЦИЕЙ СУБХОНДРАЛЬНОЙ ЗОНЫ И ВВЕДЕНИЕМ АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА

¹ Лаборатория морфологии (зав. — канд. биол. наук Т. А. Силантьева), ² лаборатория гнойной остеологии и замещения дефектов конечностей (зав. — д-р мед. наук Н. М. Ключин), ³ лаборатория патологии суставов (зав. — д-р мед. наук М. П. Тепленький), ФГБУ «Российский научный центр „Восстановительная травматология и ортопедия” им. акад. Г. А. Илизарова», г. Курган

В отдаленные сроки эксперимента (6 мес и 1 год) изучено состояние суставного хряща у 12 беспородных собак при моделировании гонартроза с последующей туннелизацией субхондральной зоны и введением в каналы костномозговой суспензии. Результаты гистологического и морфометрического исследования показали, что в суставах без туннелизации были отмечены нарастающий артроз, увеличение относительного содержания пустых лакун и снижение изогенных групп хондроцитов, уменьшение размеров последних и наличие признаков их деструкции. В условиях субхондральной туннелизации в суставном хряще уменьшаются дегенеративные изменения, что проявляется снижением доли пустых лакун в выборке хондроцитов и отсутствием очагов разволокнения матрикса. Происходило увеличение численности изогенных групп, объемной плотности хондроцитов, снижение ядерно-цитоплазматического индекса, свидетельствующих о повышении пролиферации и биосинтетической активности хондроцитов. Таким образом, получены результаты морфометрического исследования о более выраженной стимуляции регенерации суставного хряща при туннелизации субхондральной зоны с введением в каналы костномозговой суспензии.

Ключевые слова: суставной хрящ, регенерация, остеоартроз, туннелирование, костный мозг

Решению медико-социальных проблем остеоартроза (ОА) во всем мире придается большое значение. Медикаментозная терапия и его хирургическое лечение продолжают совершенствоваться и обновляться [13]. Однако доля больных с ОА практически не снижается, что указывает на необходимость продолжения поиска новых, более эффективных методов лечения ОА с учетом современных представлений о патогенезе этого заболевания. Обоснование роли субхондральной кости в его патогенезе привело к разработке новых технологий лечения, точкой приложения которых являлась не только хрящевая, но и костная ткань [1, 13, 15]. В настоящее время в клинике широко применяют модифицированные методики субхондральной туннелизации [4, 5, 14]. Проведенные нами ранее исследования в сроки от 14 до 90 сут после моделирования ОА показали, что субхондральная туннелизация с введением аутологичного костного мозга оказывает стимулирующее воздействие на регенерацию суставного хряща [8]. Несмотря на то, что остеоперфоративные вмешательства при повреждениях

суставного хряща относят к группе операций, стимулирующих регенерацию последнего, оценка их результативности остается неоднозначной. Различия трактовки результатов, видимо, связаны с отсутствием унифицированных и дифференцированных подходов к их оценке и с краткосрочностью наблюдений [13]. В качестве критерия оценки результативности методики субхондральной туннелизации в эксперименте может служить морфометрическая характеристика суставного хряща, дающая представление о функциональной активности хрящевых клеток.

Цель настоящего исследования — гистологическая и морфометрическая характеристика суставного хряща в отдаленные сроки после моделирования ОА с последующей туннелизацией субхондральной зоны и введением в каналы аутологичного костного мозга.

Материал и методы. Исследования выполнены на 12 беспородных собаках обоего пола массой 12–15 кг в возрасте 1,5–2 года. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию проводили в соответствии с требованиями МЗ РФ к работе экспериментально-биологических

Сведения об авторах:

Ступина Татьяна Анатольевна (e-mail: StupinaSTA@mail.ru), Степанов Михаил Александрович (e-mail: m-stepanov@mail.ru), Тепленький Михаил Павлович (e-mail: TeplenkijMP@mail.ru), ФГБУ «Российский научный центр „Восстановительная травматология и ортопедия” им. акад. Г. А. Илизарова», 640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6

клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом «Российского научного центра “Восстановительная травматология и ортопедия” им. академика Г.А.Илизарова» (протокол № 6 от 02.12.2014 г.). Всем животным предварительно моделировали ОА путем пересечения бедренной артерии с последующей иммобилизацией обоих коленных суставов (период иммобилизации — 28 сут) по разработанному нами способу [7]. Морфологическое исследование сустава подтвердило адекватность полученной модели [3, 12]. Экспериментальный материал разделен на 3 серии: в 1-й серии (8 суставов) после моделирования ОА туннелизацию не проводили; во 2-й серии (8 суставов) после окончания периода иммобилизации вне сустава туннелировали субхондральную зону, в каждой мышечке бедренной и большеберцовой кости делали по 4 туннеля, в 3-й серии (8 суставов), как и во 2-й серии вне сустава туннелировали субхондральную зону, в каждый канал вводили по 0,2 мл костномозговой суспензии, взятой из проксимального метафиза плечевой кости. Животных выводили из опыта через 6 мес и 1 год после моделирования ОА. В качестве контроля (нормы) исследовали суставной хрящ 5 интактных животных. Морфометрические исследования проведены на серийных полутонких срезах суставного хряща с подлежащей субхондральной костью большой площади (до 8 мм²) [10], которые окрашивали метиленовым синим—основным фуксином. Изображения микропрепаратов оцифровывали на АПК «ДиаМорф» (Россия) и анализировали, используя программу «ВидеоТест-Мастер-Морфология». Определяли толщину суставного хряща (h , мкм), объемную плотность хондроцитов ($VV_{хц}$, %) в ткани, численную плотность хондроцитов ($NA_{хц}$, мкм⁻²), долю (%) пустых лакун ($NA_{пуст.лак}$) и изогенных групп ($NA_{из.гр}$) в общем объеме выборки из 200 хондроцитов, рассчитывали ядерно-цитоплазматический индекс хондроцитов (ЯЦИ). Цифровой материал анализировали по критериям вариационной и непараметрической

статистики в программе AtteStat, версия 1.0 в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Результаты исследования. При исследовании суставного хряща у животных 1-й серии через 6 мес после моделирования ОА выявлено разволокнение поверхностной зоны (рис. 1, а). Через 1 год очаги разволокнения захватывали всю поверхностную зону и большую часть промежуточной зоны (см. рис. 1, б). В очагах разволокнения отмечены демаскировка коллагеновых волокон, что свидетельствовало о прогрессирующем снижении содержания сульфатированных гликозаминогликанов в матриксе хряща и фрагментация демаскированных коллагеновых волокон, хондроциты были аномальной формы, имелись пустые клеточные лакуны.

На протяжении всего эксперимента во всех зонах хряща размеры хрящевых клеток были уменьшены и занимали не всю лауну. Основная часть хондроцитов были с признаками деструкции, клетки имели в основном мелкие, часто пикнотически сморщенные ядра и скудную цитоплазму, ЯЦИ составлял $0,730 \pm 0,010$ (в контроле ЯЦИ — $0,420 \pm 0,010$). Была увеличена доля бесклеточных полей. Во всех зонах выявлены пустые лакуны. В глубокой зоне хряща нарушена citoархитектоника, хондроциты располагались одиночно, редко в виде двуклеточных изогенных групп. На большем протяжении базофильная линия была местами утолщена, в отдельных участках нарушалась ее непрерывность. В таких участках отсутствовала зона кальцифицированного хряща, было отмечено проникновение сосудов в глубокую зону хряща. С увеличением срока эксперимента про-

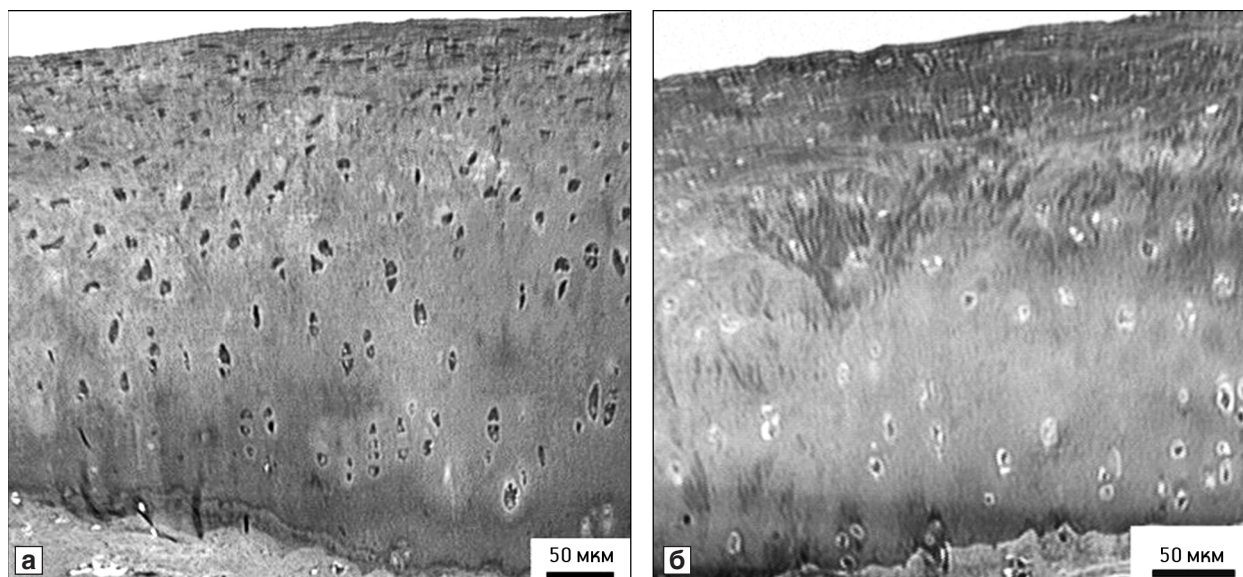


Рис. 1. Нарушение зональной структуры суставного хряща у собаки через 6 мес (а) и через 1 год (б) после моделирования остеоартроза (1-я серия).

Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим—основным фуксином

Морфометрическая характеристика суставного хряща мыщелков бедренной кости собаки

После моделирования остеоартроза	Серия эксперимента	Исследованные параметры				
		$h, \bar{x} \pm s_{\bar{x}}, \text{ мкм}$	$NA_{\text{хц}}, \bar{x} \pm s_{\bar{x}}, \%$	$VV_{\text{хц}}, \bar{x} \pm s_{\bar{x}}, \%$	$NA_{\text{пуст.лак}}, \%$	$NA_{\text{изгр}}, \%$
—	Норма (контроль)	475,5±1,3	6,2±0,6	9,0±0,5	13,6	14,5
Срок 6 мес	1-я	375,8±8	11,0±1,0*	4,74±0,27*	26,2*	35,5*
	2-я	413±4,5	7,7±0,6	4,9±0,4	22,1	7,43
	3-я	468±5*	8,3±0,7*	7,1±0,5*	12,8	14,3
1 год	1-я	307±1,0*	8,8±1,4*	4,7±0,4*	27,08*	4,8*
	2-я	424±9	8,2±0,8	7,0±1,0	16,14	15,1
	3-я	476±4*	12,2±0,6*	8,6±0,7*	11,2*	22,78*

Примечание. При определении значимости различий для параметра h использовали критерий Стьюдента ($P < 0,001$), для $VV_{\text{хц}}$, $NA_{\text{хц}}$, $NA_{\text{пуст.лак}}$, $NA_{\text{изгр}}$ — критерий Вилкоксона ($P < 0,05$). Жирным шрифтом выделены значимые отличия от контроля. * Значимые различия между параметрами в 1-й серии и во 2-й и 3-й сериях. • Значимые различия между параметрами во 2-й и 3-й сериях.

грессировало снижение морфометрических параметров: толщины хряща (h), объемной плотности хондроцитов ($VV_{\text{хц}}$) (таблица), ЯЦИ составил $0,530 \pm 0,010$. К концу эксперимента пролиферативная активность хондроцитов была подавлена, значительно снижена доля изогенных групп в общем объеме выборки, при этом сохранялась большая доля пустых лакун (см. таблицу).

Во 2-й серии через 6 мес после моделирования ОА в суставном хряще сохранялось разволокнение межклеточного вещества суперфициальной части поверхностной зоны (рис. 2, а). Во всех зонах отмечены пустые лакуны. Репаративная регенерация хряща выражалась в возрастании количества клеток, размеры которых были увеличены, они имели округлую форму, светлые гомогенные ядра, базофильную цитоплазму, ЯЦИ таких клеток составлял $0,350 \pm 0,020$.

По сравнению с 1-й серией наблюдалось снижение $NA_{\text{хц}}$, но за счет увеличения размеров хондроцитов была выявлена тенденция к увели-

чению $VV_{\text{хц}}$. Сохранялась большая доля пустых лакун, почти в 2 раза по сравнению с нормой было снижено относительное содержание изогенных групп. Толщина хряща значительно превышала таковую в 1-й серии. Через 1 год после моделирования ОА репаративные процессы преобладали над деструктивными, матрикс поверхностной зоны был гомогенным (см. рис. 2, б), очаги разволокнения не выявлены, целостность базофильной линии не нарушена. Отмечено увеличение объемной плотности хондроцитов ($VV_{\text{хц}}$) по сравнению с таковой в предыдущий срок эксперимента и в 1-й серии опытов, что было обусловлено как увеличением численной плотности хондроцитов ($NA_{\text{хц}}$) по сравнению с данным параметром в предыдущий срок эксперимента, так и увеличением размеров хондроцитов, ЯЦИ был $0,320 \pm 0,010$. По сравнению с 1-й серией значимо была снижена доля пустых лакун, увеличено относительное содержание изогенных групп хондроцитов. Толщина хряща продолжала увеличиваться и зна-

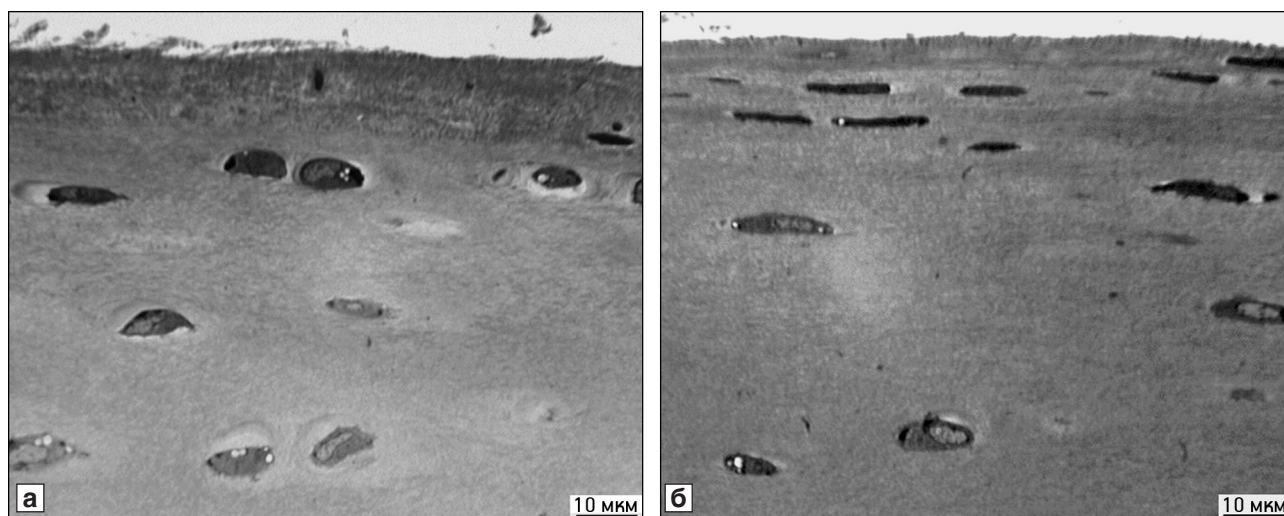


Рис. 2. Поверхностная зона суставного хряща у собаки через 6 мес (а) и через 1 год (б) после моделирования остеоартроза и последующей туннелизации субхондральной зоны (2-я серия).

Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим—основным фуксином

чимо превышала таковую в 1-й серии, по сравнению с нормой сохранялись сниженные значения (см. таблицу).

В 3-й серии в суставном хряще через 6 мес после моделирования ОА очаги разволокнения отсутствовали, была восстановлена гомогенность матрикса поверхностной зоны, целостность базофильной линии не нарушена (рис. 3, а).

По сравнению со 2-й серией выявлено значимое увеличение численной и объемной плотностей хондроцитов, толщины хряща, ЯЦИ был снижен до $0,280 \pm 0,010$.

Доля пустых лакун и изогенных групп были сопоставимы со значениями у интактных животных. Через 1 год после моделирования ОА в поверхностной зоне преобладали клетки с признаками повышенной биосинтетической активности: размеры их были увеличены, они имели округлую форму, светлое гомогенное ядро и базофильную цитоплазму, ЯЦИ был равен $0,260 \pm 0,010$. В промежуточной зоне отмечено появление 2-, 3-, 4-клеточных изогенных групп. Целостность базофильной линии не нарушена (см. рис. 3, б). По сравнению с соответствующими показателями в предыдущий срок эксперимента было выявлено увеличение численной и объемной плотностей хондроцитов, доли изогенных групп. Толщина хряща и объемная плотность хондроцитов превышали аналогичные параметры в 1-й и 2-й сериях опытов и были сопоставимы с таковыми у интактных животных (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, в отдаленные сроки эксперимента в нетуннелированных суставах отмечен нарастающий артроз. Значительно увеличена доля пустых лакун, при этом снижено относительное содержание изогенных групп, размеры хондроцитов уменьшены, наблюдаются признаки деструкции, что свидетельствует о прогрессировании деструктивных процессов. Закономерным выглядело снижение толщины хряща. Поскольку хондроциты — единственный тип клеток, формирующих хрящ и поддерживающих динамическое равновесие между синтезом и деградацией внеклеточного матрикса [6], восстановительные

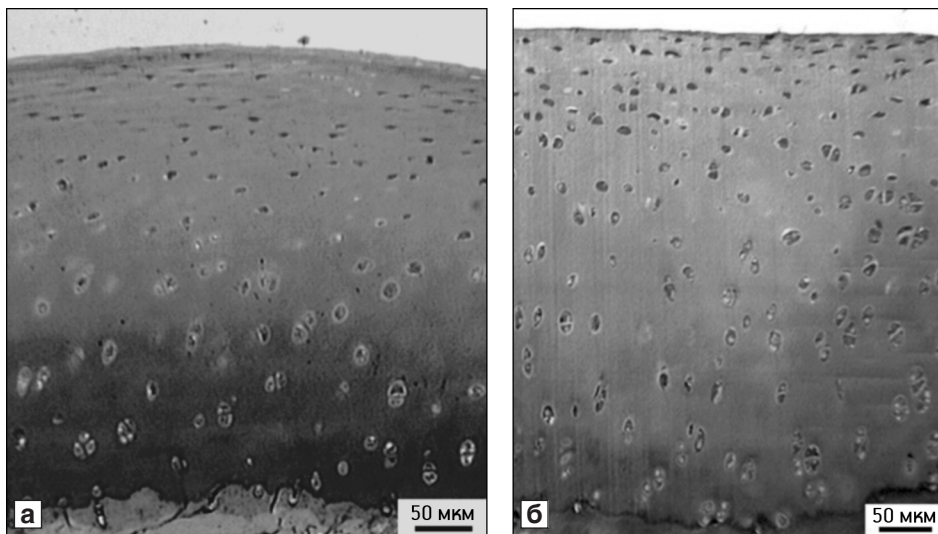


Рис. 3. Суставной хрящ собаки через 6 мес (а) и через 1 год (б) после моделирования остеоартроза и последующей туннелизации субхондральной зоны с введением в каналы костномозговой суспензии (3-я серия).

Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим — основным фуксином

процессы определяются, прежде всего, степенью активации биосинтетической активности выживших хондроцитов, их пролиферации, постпролиферативного восстановления биосинтетической активности и участием в реорганизации матрикса. При данном патологическом процессе собственные регенераторные возможности суставного хряща подавлены и его восстановление невозможно без дальнейшего потенцирования внешних по отношению к хрящу механизмов. Возрастание доли изогенных групп в сочетании с увеличением размеров хондроцитов в суставном хряще животных 2-й и 3-й серий могут быть расценены как реактивные изменения адаптационного генеза, за счет которых осуществлялась репаративная регенерация хряща. Известно, что функционально активные клетки больше по размерам и имеют округлую форму [2]. Увеличение числа активно пролиферирующих клеток — основной источник восстановительных процессов в суставном хряще [6]. Выявленные отличия морфометрических параметров в 1-й серии по сравнению с таковыми во 2-й и 3-й сериях позволяют предположить, что в отдаленные сроки после моделирования ОА в условиях туннелизации в суставном хряще уменьшаются дегенеративные изменения и гибель клеток, что проявляется снижением доли пустых лакун в выборке хондроцитов и отсутствием очагов разволокнения матрикса. В экспериментах по удлинению голени нами было показано, что увеличение доли изогенных групп в суставном хряще сопровождается экспрессией маркера пролиферативной активности Ki-67 [11]. Увеличение численности изогенных групп, объемной плот-

ности хондроцитов, снижение ЯЦИ и восстановление тинкториальных характеристик хряща и его толщины свидетельствовали о повышении пролиферации и биосинтетической активности хондроцитов. В проведенных ранее исследованиях в сроки эксперимента от 14 до 90 сут после моделирования ОА показано, что при туннелизации субхондральной зоны стимуляция регенерации суставного хряща осуществляется путем коррекции гомеостаза хряща и субхондральной кости и улучшения трофики тканей [9].

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева Л.И., Зайцева Е.М. Субхондральная кость при остеоартрозе: новые возможности терапии // РМЖ. 2004. Т. 12, № 20. С. 1133–1136.
- Данилов Р.К., Гололобов В.Г., Одинцова И.А., Мурзабаев Х.Х. Гистологические основы регенерации тканей опорно-двигательного аппарата // Ортопед., травматол. и протезир. 2000. № 2. С. 102.
- Макушин В.Д., Степанов М.А., Ступина Т.А. Экспериментальное моделирование остеоартроза коленного сустава у собак // Биомедицина. 2012. № 3. С. 108–115.
- Макушин В.Д., Чегуров О.К. Субхондральная туннелизация: вопросы технологии и эффективности лечения при гонартрозе (обзор литературы и собственные данные) // Гений ортопедии. 2006. № 4. С. 99–104.
- Маланин Д.А., Писарев В.Б., Шилов В.Г. и др. Экспериментальные аспекты изучения хондрогенного потенциала мезенхимальных плюрипотентных и малодифференцированных клеток, «культивированных» in vivo // Гений ортопедии. 2002. № 1. С. 90–97.
- Павлова В.Н., Павлов Г.Г., Шостак Н.А., Слуцкий Л.И. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение. М.: Медицинское информационное агенство, 2011.
- Патент № 2452999. Способ моделирования остеоартроза коленного сустава / В.Д. Макушин, М.А. Степанов, Т.А. Ступина. Заявка от 09.02.2011 г. // Оpubл. БИ. 2012. № 16. С. 1–8.
- Ступина Т.А., Макушин В.Д., Степанов М.А. Влияние субхондральной туннелизации и костномозговой стимуляции на процессы регенерации суставного хряща // Бюл. экспер. биол. 2012. Т. 153, № 2. С. 260–264.
- Ступина Т.А., Степанов М.М., Тепленький М.П. Роль субхондральной кости в восстановлении суставного хряща // Бюл. экспер. биол. 2014. Т. 158, № 12. С. 791–794.
- Ступина Т.А., Щудло М.М. Способ изготовления препаратов недекальцинированного суставного хряща с подлежащей субхондральной костью для многоцелевых исследований // Бюл. экспер. биол. 2014. Т. 157, № 3. С. 388–390.
- Ступина Т.А., Щудло М.М., Щудло Н.А. Изучение пролиферативной активности хондроцитов в суставном хряще у собак при удлинении смежного сегмента конечности // Морфология. 2015. Т. 147, вып. 2. С. 64–68.
- Ступина Т.А., Щудло Н.А., Степанов М.А. Структурная реорганизация основных компонентов сустава при экспериментальном моделировании остеоартроза с редуцированным кровоснабжением // Морфология. 2014. Т. 146, вып. 5. С. 61–68.
- Эйсмонт О.Л., Скакун П.Г., Борисов А.В. и др. Современные возможности и перспективы хирургического лечения повреждений и заболеваний хряща // Мед. новости. 2008. № 7. С. 12–19.
- Chevrier A., Hoemann C.D., Sun J., Buschmann M.D. Temporal and spatial modulation of chondrogenic foci in subchondral microdrill holes by chitosan-glycerol phosphate/blood implants // Osteoarthritis Cartilage. 2011. Vol. 19, № 1. P. 136–144.
- Mrosek E.H., Lahm A., Erggelet C. et al. Subchondral bone trauma causes cartilage matrix degeneration: an immunohistochemical analysis in a canine model // Osteoarthritis Cartilage. 2006. Vol. 14, № 2. P. 171–178.

Поступила в редакцию 15.03.2016

HISTOLOGICAL AND MORPHOMETRIC CHARACTERISTIC OF THE ARTICULAR CARTILAGE LONG TIME AFTER MODELING OF OSTEOARTHRITIS FOLLOWED BY TUNNELING OF THE SUBCHONDRAL AREA AND AUTOLOGOUS BONE MARROW INJECTION

T.A. Stupina¹, M.A. Stepanov¹, M.P. Tyoplenkiy²

The articular cartilage was studied in 12 mongrel dogs 6 months and 1 year after gonarthrosis modeling followed by tunneling of the subchondral area and bone marrow suspension injection into the canals. The results of histological and morphometric study demonstrated that joints without tunneling developed progressing arthrosis; relative number of empty lacunae grew up, and that of isogenous chondrocyte groups diminished, while chondrocytes decreased in size and number and showed signs of destruction. The tunneled joints demonstrated decrease of degenerative changes in the articular cartilage manifested by the reduction in the number of empty lacunae and absence of foci of fiber separation in the matrix. The number of isogenous groups grew, as well as the volume density of chondrocytes, while the nuclear-cytoplasmic index decreased, which is indicative of the increase in proliferation and biosynthetic activity of chondrocytes. Thus, the morphometric results demonstrated more expressed regeneration stimulation of the articular cartilage by subchondral area tunneling followed by bone marrow suspension injection into the canals.

Key words: *osteoarthritis, tunneling, bone marrow, articular cartilage, regeneration*

¹ Laboratory of Morphology, ² Laboratory of Pyogenic Osteology and Limb Defect; ³ Laboratory of Joint Pathology, G.A. Ilizarov Russian Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopedics, Kurgan