Т.А.Ступина

ПРИЁМЫ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ СУСТАВНОГО ХРЯЩА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЕГО ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ, ТИНКТОРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ И ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА

Лаборатория морфологии (зав. — канд. биол. наук Т. А. Силантьева), ФГБУ «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. акад. Г. А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган

Цель — разработать оптимальные приёмы подготовки образцов суставного гиалинового хряща для сопоставительного анализа его гистологической структуры и элементного состава у интактных животных и при индуцированном остеоартрозе. Материал и методы. Изучен суставной хрящ мыщелков бедра 5 интактных (контроль) и 5 опытных собак, которым моделировали остеоартроз. На фотомикроскопе «Opton-3» (Opton, Германия) исследовали полутонкие эпоксидные срезы, которые окрашивали метиленовым синим и метиленовым синим—основным фуксином. Поверхности эпоксидных блоков после изготовления полутонких срезов исследовали методом рентгеновского электронно-зондового микроанализа.

Результаты. У интактных животных реакция метахромазии усиливалась по направлению от суставной поверхности к субхондральной кости. Электронно-зондовый микроанализ подтвердил неравномерное распределение серы по зонам хряща. В серии с индуцированным остеоартрозом отмечены разволокнение суставной поверхности хряща, потеря серы во всех его зонах. Снижение содержания серы в промежуточной и глубокой зонах сопровождалось увеличением кальция и появлением фосфора. В кальцифицированном хряще зарегистрировано снижение в одинаковой степени содержания кальция и фосфора относительно интактной нормы.

Выводы. Полученные результаты демонстрируют возможности применения рентгеновского электронно-зондового микроанализа в изучении молекулярных механизмов развития хондропатий.

Ключевые слова: суставной хрящ, метахромазия, остеоартроз, электронно-зондовый микроанализ

Хрящевые ткани характеризуются обилием межклеточного матрикса при относительно небольшой объемной доле клеточных компонентов [6]. Деструкция суставного хряща при остеоартрозе является каскадным процессом, в котором принимают участие и клетки, и внеклеточные компоненты, в первую очередь сульфатированные гликозаминогликаны. Они входят в состав протеогликанов и играют основную роль в поддержании гомеостаза, обеспечивают прочность ткани, архитектонику, митогенную активность, рецепторную функцию клеток и межклеточные взаимодействия [1]. Содержание сульфатированных гликозаминогликанов в образцах хряща можно оценивать по результатам рентгеновского электронно-зондового микроанализа серы [9]. Развивающаяся при остеоартрозе дистрофия межклеточного матрикса хряща сопровождается накоплением солей извести [13] и, как следствие, появлением базофилии. Методически представляется интересной возможность сопоставления гистологического исследования с методом рентгеновского электронно-зондового микроанализа суставного хряща. Исследования элементного состава суставного хряща при хондропатиях с использованием рентгеновского электроннозондового анализа единичны [5, 14].

Цель настоящего исследования — разработать оптимальные приёмы подготовки образцов суставного гиалинового хряща для сопоставительного анализа изменений его гистоструктуры и элементного состава при индуцированном остеоартрозе.

Исследование выполнено на беспородных собаках обоего пола в возрасте 1,5-2 года. Исследовали суставной хрящ мыщелков бедренной кости 5 интактных (контроль) и 5 подопытных собак, которым моделировали остеоартроз по разработанному нами способу [2] путём редукции кровоснабжения и иммобилизации коленного сустава, через 28 сут иммобилизации животных выводили из опыта. Результаты морфологического исследования свидетельствуют, что разработанная экспериментальная модель остеоартроза (степень I-III по гистологической классификации Международного общества изучения остеоартроза OARSI) клинически релевантна и пригодна для доклинических испытаний различных терапевтических стратегий остеоартроза [5, 10]. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию передозировкой барби-

Сведения об авторе:

Ступина Татьяна Анатольевна (e-mail: StupinaSTA@mail.ru), лаборатория морфологии, ФГБУ «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. акад. Г. А. Илизарова» Минздрава РФ, 640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6 туратов проводили в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации K работе экспериментальнобиологических клиник (приказ M3 СССР № 755, 1977 г.). Манипуляции, проводимые на животных, рассмотрены и одобрены этическим комитетом «РНЦ "ВТО" им. акад. Г. А. Илизарова» [протокол заседания этического комитета № 6 (42) от 02.12.2014 г.]. После вскрытия коленных суставов с мыщелков бедренной кости перпендикулярно суставной поверхности с помощью скальпеля вырезали образцы суставного хряща размером $2-3 \times 5-6$ мм, фиксировали их в альдегидном фиксаторе, исключая этап постфиксации тетраоксидом осмия, так как рентгеновские пики тяжелых металлов могут маскироваться или налагаться на излучение интересуемых элементов [3, 9]. Учитывая, что суставной хрящ содержит большое количество воды — 80% массы [6], материал дегидратировали в режиме плавного перехода от спирта к ацетону в соответствии с методами [7], но с увеличением времени на этапах от 70 до 96% спирта до 1 ч. Этапы пропитки и заливки в смолу (аралдит) проводили по разработанному нами ранее способу [4]. Увеличенная плотность матрикса суставного хряща за счет заливочной среды (аралдита) по сравнению с незалитым материалом уменьшает объем возбуждения рентгеновского излучения, что ведет к повышению чувствительности микроанализа. Дальнейшее исследование состояло из двух этапов. На первом этапе из полученных эпоксидных блоков с помощью ультратома «Nova» (LKB, Швеция) изготавливали полутонкие срезы, которые окрашивали метиленовым синим (метахроматическая реакция на сульфатированные гликозаминогликаны) и метиленовым синим-основным фуксином (для выявления базофилии). Препараты исследовали на фотомикроскопе «Opton-3» (Opton, Германия). На втором этапе поверхности эпоксидных блоков после изготовления полутонких срезов исследовали методом рентгеновского электроннозондового микроанализа. Использование эпоксидных блоков после изготовления полутонких срезов позволяет исключить этапы шлифовки и полировки, что существенно сокращает время подготовки образца и исключает артефакты. Для исследования от каждого животного случайным образом отбирали по 3 блока. С помощью токопроводящего клея образцы закрепляли на хорошо отполированные чистые алюминиевые диски. Поверхности эпоксидных блоков напыляли серебром в вакуумном напылителе «JEE-4 X/5B» (Eiko, Япония) и ионном напылителе «IB-6» (Eiko, Япония). Исследования проводили на рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе «INCA Energy 200» (Oxford Instrumets Analytical, Англия), смонтированном на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840» (Jeol, Япония), при ускоряющем напряжении 20 кэВ. Результаты исследований получали в виде элементных карт — Smart Мар и данных количественного элементного анализа в весовых процентах (вес.%). Определяли распределение и содержание серы $(\omega S, \text{вес.}\%)$, кальция ($\omega Ca, \text{вес.}\%$) и фосфора (ωP , вес.%) в поверхностной, промежуточной и глубокой зонах суставного хряща и кальцифицированном хряще. С целью получения однотипных, стандартных результатов проводили калибровку прибора по образцу — эталону волластонита (CaO : SiO₂). Для сбора рентгеновских спектров использовали два режима оперирования: режим сканирования по линии и сканирующий режим площади, для второго случая — систематическое сканирование полей рядами, ориентированными строго по длиннику поверхности объекта, обеспечивало получение наиболее репрезентативной выборки. При этом важно надежно исключить взаимоперекрытие тестовых полей, выборку формировали тотально. Для анализа цифрового материала использовали описательную статистику. Значимость различий оценивали с помощью критерия Вилкоксона в программе AtteStat 1.0 в электронных таблицах Microsoft Excel 97. Различия считали значимыми при p<0,05.

При окраске метиленовым синим на полутонких срезах суставного хряща интактных животных отмечены умеренная реакция метахромазии в межтерриториальном матриксе поверхностной зоны и интенсивная метахромазия территориального матрикса промежуточной и глубокой зон (рис. 1, а). Электронно-зондовый микроанализ в режиме сканирования по линии подтвердил неравномерное распределение серы по зонам суставного хряща интактных животных (см. рис. 1, б, в). Количественный анализ показал, что содержание серы, как и реакция метахромазии, увеличивалось от поверхностной к глубокой зоне: в поверхностной зоне $-0,350\pm0,010$ вес.%, в промежуточной — 0,42±0,04 вес.%, в глубокой — 0,520±0,020 вес.%. Выявлены следы кальция в поверхностной зоне хряща (шСа было меньше 0,02 или 0,01 вес.%), в промежуточной зоне ωСа составило 0,040±0,010 вес.%, в глубокой зоне ω Ca — 0,090±0,010 вес.%. Содержание фосфора во всех зонах суставного хряща меньше 0,02 или 0,01 вес.%. В кальцифицированном хряще содержание кальция, фосфора и серы соста-

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ



Рис. 1. Суставной хрящ интактной собаки (самец, 1,5-2 года).

а — общий вид, полутонкий срез; б — ренттеновский электронно-зондовый микроанализ в режиме по линии; в — Smart Map, отражающая распределение серы в суставном хряще. Окраска метиленовым синим. а — об. 6,3; ок. 12,5; в — ув. 170

вило 13,93±0,02, 6,890±0,010 и 0,140±0,020 вес.% соответственно, отношение Са:Р равнялось 2,02.

При индуцированном остеоартрозе реакция метахромазии имела очаговый характер, значительно снижена ее интенсивность, отмечено разволокнение межклеточного вещества поверхностной зоны. Рентгеновский электроннозондовый микроанализ выявил относительно интактной нормы достоверное (p<0,05) снижение wS во всех зонах хряща (в поверхностной зоне — 0,18±0,04 вес.%, в промежуточной — 0,230±0,020 вес.%, в глубокой — 0,28±0,03 вес.%). При окраске метиленовым синим-основным фуксином отмечали интенсивную базофилию матрикса промежуточной и глубокой зон, истончение или полное отсутствие в отдельных участках зоны кальцифицированного хряща (рис. 2, а). На границе кальцифицированного хряща с субхондральной костью отмечены явления остеокластической резорбции (см. рис. 2, б).

появление Зарегистрировано кальция в поверхностной зоне (ω Ca — 0,04±0,02 вес.%); и значительное (р<0,05) его увеличение в промежуточной (ω Ca — 0,080±0,020 вес.%) и глубокой (wCa - 0,150±0,020 вес.%) зонах относительно нормы. Содержание фосфора в поверхностной зоне было меньше 0,02 вес.%, в промежуточной и глубокой зонах wP составило 0,030±0,010 и 0,080±0,010 вес.% соответственно. В кальцифицированном хряще содержание кальция и фосфора значимо (p<0,05) снижено по сравнению с интактной нормой (ωCa — 9,72±0,03 вес.%, ωР — 4,740±0,020 вес.%), отношение Са:Р равнялось 2,05. Smart Мар (см. рис. 2, в) демонстрирует снижение шСа в кальцифицированном

хряще. Значения ωS незначительно снижались — 0,130±0,020 вес.%.

Рентгеновский электронно-зондовый микроанализ выявил неравномерное распределение серы в суставном хряще интактных животных, ωS увеличивалось от поверхностной к глубокой зоне, данная закономерность распределения серы сохранялась и в суставном хряще при индуцированном остеоартрозе. Полученные данные согласуются с данными литературы, содержание агрекана в поверхностной зоне хряща ниже, чем в других зонах [12]. Известно, что метаболизм сульфатированных гликозаминогликанов изменяется уже на самых ранних этапах повреждения суставного хряща [6]. Результаты микроанализа показали, что в суставном хряще экспериментальных животных происходит потеря серы во всех зонах хряща, но в наибольшей степени в промежуточной и глубокой зонах, что сопровождается увеличением в большей степени в этих зонах кальция и появлением фосфора. В проведенных нами ранее исследованиях показано, что при моделировании остеоартроза наиболее уязвимыми являются хондроциты промежуточной зоны, более 50% клеток в состоянии деструкции, многие с признаками апоптоза [5, 10]. Известно, что образуемые хондроцитами апоптотические тела содержат щелочную фосфатазу, преципитируют кальций, что способствует кальцификации хряща [11]. Установлено, что при остеоартрозе гипертрофированные хондроциты глубокой зоны продуцируют в избытке коллаген Х типа, матриксную металлопротеиназу-13 и щелочную фосфатазу, которые влияют на процесс кальцификации [8]. В кальцифицированном хряще при индуциро-



Рис. 2. Суставной хрящ собаки при индуцированном остеоартрозе (самец, возраст 1,5-2 года).

а — общий вид; б — остеокласт, резорбирующий основное вещество кальцифицированного хряща. Резорбционная лакуна Хаушипа (стрелка); в — рентгеновский электронно-зондовый микроанализ в режиме по плоскости. Smart Map, отражающая распределение кальция в суставном хряще. a, б — окраска метииленовым синим — основным фуксином. a — об. 6,3; ок. 12,5; б — об. 100; ок. 12,5; в — ув. 95

ванном остеоартрозе зарегистрировано снижение в одинаковой степени ωСа и ωР, отмечены признаки остеокластической резорбции, выявлены участки, в которых кальцифицированный хрящ отсутствовал.

Таким образом, подготовка биологических объектов для рентгеновского микроанализа осуществляется по тем же принципам, что и подготовка для электронной микроскопии, но имеет свою специфику, необходимо учитывать и особенности исследуемых объектов.

Приведенные результаты исследования однозначно демонстрируют возможности примененного рентгеновского электронно-зондового микроанализа в изучении молекулярных механизмов изменения тинкториальных свойств суставного хряща при индуцированном остеоартрозе, эти изменения зарегистрированы и количественно оценены.

Автор сообщает об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Зайдман А. М., Корель А. В. Структурно-функциональные особенности пластинки роста тела позвонка человека в критические периоды роста // Хирургия позвоночника. 2004. № 1. С. 113–120 [Zaidman A. M., Korel' A. V. Structural and functional features of the growth plate of the vertebral body in critical periods of growth // Hirurgiya pozvonochnika. № 1. Р. 113–120. In Russ.].
- 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.// Опубл. БИ. 2012. № 16. С. 1–9 [RF Patent №2452999. Method of simulating osteoarthrosis of the knee / V. D. Makushin, M. A. Stepanov, T. A. Stupina. Date of filing: 09.02.2011 // Publ. BI. 2012. № 16. P. 1–9. In Russ.].

- Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ. Т. 1 / Под ред. Дж.Гоулдстейн, Д. Ньюбери, П. Эчлина и др. М.: Мир, 1984. 303 с. [Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. Vol. 1 J. Goldstein, D. Newbury, P. Echlin, D. Joy, C. Fiori, E. Lifshin. Moscow: Mir, 1984. 303 p. In Russ.]
- 4. 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, вып. 3. С. 388–390 [Stupina T.A., Shhudlo M.M. A method for making preparations from nondecalcified articular cartilage with sublying subchondral bone for multipurpose studies // Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny. 2014. Vol. 157, № 3. Р. 388–390. In Russ.].
- 5. 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. 61–65 [Stupina T.A., Shhudlo N.A., Stepanov M.A. Structural reorganization of the main joint components during the experimental modeling of osteoarthrosis with reduced blood supply // Morfologiia. 2014. Vol. 146, № 5. Р. 61–65. In Russ.].
- Сустав: Морфология, клиника, диагностика, лечение / Под ред. В.Н.Павловой, Г.Г.Павлова, Н.А.Шостак, Л.И.Слуцкого. М.: Мед. информ. агентство, 2011 [Joint: The morphology, clinic, diagnostics, treatment / V.N. Pavlova, G. G. Pavlov, N.A. Shostak, L.I. Sluckiy, Eds. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2011. In Russ.].
- Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с. [Weakley B. S. A Beginners' Handbook in Biological Electron Microscopy, Moscow: Mir, 1975. In Russ].
- 8. Четина Е.В. Механизмы эмбриогенеза при остеоартрозе: роль дифференцировки хондроцитов в резорбции суставного хряща // Науч.-практ. ревматол. 2010. № 3. С. 65–77 [Chetina E.V. The mechanisms of embryogenesis in osteoarthritis: the role of differentiation of chondrocytes in articular cartilage resorption // Nauchno-prakticheskaya revmatologiya. 2010. № 3. P. 65–77. In Russ.].
- Шахламов В.А., Буравков С.В. Применение метода рентгеноспектрального локального микроанализа в биологии и медицине // Арх. анат. 1983. Т. 84, вып. 4. С. 95–107

[Shahlamov V.A., Buravkov S.V. Application of X-ray local microanalysis in biology and medicine // Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii. 1983. Vol. 84, № 4. P.95–107. In Russ.].

- Шевцов В.И., Макушин В.Д., Степанов М.А., Ступина Т.А. К вопросу моделирования остеоартроза коленного сустава у собак для изучения патогенеза (экспериментальноморфологическое исследование) // Гений ортопедии. 2012.
 № 1. С. 38–42 [Shevcov V.I., Makushin V.D., Stepanov M.A., Stupina T.A. The problem of the knee osteoarthrosis modeling in dogs for the purpose of pathogenesis studying (experimental morphological study) // Genii ortopedii. 2012. № 1. Р. 38–42. In Russ.].
- Adams C.S., Shapiro I.M. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis // Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2002. Vol. 13, № 6. P. 465–473.
- Anderson H.C., Hodges P.T., Aguilera X.M. et al. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage // J. Histochem. Cytochem. 2000. Vol. 48, № 11. P. 1493–1502. doi: 10.1177/002215540004801106.
- Fardon D. F., Milette P. C. Nomenclature and classification of lumbar disc pathology. Recommendations of the combined task forces of the North American spine society, American society of spine radiology, and American society of neuroradiology // Spine. 2001. Vol. 26, № 5. P.93–113.
- Ohira T., Ishikawa K. Hydroxyapatite deposition in articular cartilage by intra-articular injections of methylprednisolone. A histological, ultrastructural, and x-ray-microprobe analysis in rabbits // J. Bone Joint Surg. Am. 1986. Vol. 68, № 4. P. 509–520.

Поступила в редакцию 13.04.2017 Получена после доработки 20.09.2017

METHODS OF ARTICULAR CARTILAGE SAMPLE PREPARATION FOR EVALUATION OF ITS HISTOLOGICAL STRUCTURE, TINCTORIAL PROPERTIES AND ELEMENT COMPOSITION

T.A. Stupina

Objective — to develop optimal methods for preparation of articular hyaline cartilage samples for the comparative analysis of its histological structure and element composition in intact animals and in induced osteoarthritis.

Material and methods. Articular cartilage of femoral condyles harvested from 5 intact (controls) and 5 experimental dogs with modeled osteoarthritis was studied. Semi-thin epoxy sections that were stained with methylene blue and methylene blue — basic fuchsin were studied with the photomicroscope Opton-3 (Opton, Germany). The surfaces of epoxy-embedded tissue blocks after preparation of semi-thin sections were studied by the method of X-ray electron probe microanalysis.

Results. In intact animals, metachromatic reaction was more intensive in the direction from the articular surface to the subchondral bone. Electron probe microanalysis confirmed an uneven distribution of sulfur in the cartilage zones. In the series with induced osteoarthritis, fibrillation of the cartilage surface and loss of sulfur was marked in all cartilage zones. Decrease in the sulfur content in the intermediate and deep zones was accompanied by an increase in calcium content and appearance of phosphorus. In the calcified cartilage, an equal decrease in the content of calcium and phosphorus was observed as compared with intact levels.

Conclusions. The results obtained demonstrate the possibilities of electron probe microanalysis in the investigation of the molecular mechanisms of chondral pathology development.

Key words: *articular cartilage, metachromasia, osteoarthri tis, X-ray electron probe microanalysis*

Laboratory of Morphology, Russian G. A. Ilizarov Scientific Centre for Restorative Traumatology and Orthopedics, 6, M. Ulyanova St., Kurgan 640014

80