

© Т. А. Ступина, Н. А. Щудло, М. А. Степанов, 2014  
УДК 616.728.3-007.248

Т. А. Ступина<sup>1</sup>, Н. А. Щудло<sup>2</sup> и М. А. Степанов<sup>3</sup>

## СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ СУСТАВА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТЕОАРТРОЗА С РЕДУЦИРОВАННЫМ КРОВΟΣНАБЖЕНИЕМ

<sup>1</sup> Лаборатория морфологии (зав. — проф. Ю. М. Ирьянов); <sup>2</sup> клиничко-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти (зав. — д-р мед. наук Н. А. Щудло); <sup>3</sup> лаборатория гнойной остеологии и замещения дефектов конечностей (зав. — д-р мед. наук Н. М. Ключин), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, г. Курган

Изучены реактивные изменения синовиальной оболочки, суставного хряща и субхондральной кости коленного сустава собаки (n=5) при моделировании остеоартроза. Результаты гистоморфометрии, сканирующей электронной микроскопии и электронно-зондового микроанализа показали, что используемая модель остеоартроза (перевязка бедренной артерии и иммобилизация коленного сустава) приводит к отчетливо выраженному синовиту, аксональной атрофии и дегенерации нервных волокон в нервах субсиновиального слоя, гиповаскуляризации синовиальной оболочки. В субхондральной кости ухудшается васкуляризация, снижается содержание кальция. В суставном хряще обнаружены деструктивные изменения. Наиболее уязвимы хондроциты промежуточной зоны, которые равноудалены от васкулярного и синовиального источников питания. Отмеченные изменения являются следствием нарушения взаимодействия основных компонентов сустава, свидетельствующего о снижении синтеза и преобладании катаболических процессов.

**Ключевые слова:** суставной хрящ, синовиальная оболочка, субхондральная кость, моделирование, остеоартроз

Остеоартроз у человека и разных видов животных описывается как характерный комплекс клинических признаков (боль, ограничение движений) и патологических изменений тканей сустава (деструкция хряща, синовит, изменения субхондральной кости и суставной капсулы) [12]. Разнообразие биологических моделей спонтанного и индуцированного остеоартроза отражает общепринятые представления о полиэтиологичном характере этого заболевания [12]. Однако, несмотря на полиэтиологичность дегенеративно-дистрофических заболеваний костей и суставов, их патогенез почти при всех поражениях имеет васкулярную природу [4]. С учётом данных о роли сосудистой патологии в инициации и прогрессировании остеоартроза разработана экспериментальная модель [7], сочетающая два патогенетических фактора — иммобилизацию сустава и редуцированное кровоснабжение конечности.

По мнению некоторых авторов, поражение суставного хряща при остеоартрозе является первичным; изменения субхондральной кости и синовиальной оболочки вторичны [15]. Другие исследователи утверждают, что изменения суб-

хондральной кости и синовиальной оболочки возникают на ранних стадиях заболевания [10].

В модели остеоартроза с редуцированным кровоснабжением конечности [5, 9] отчетливо выраженные изменения субхондральной кости были выявлены уже через 28 сут. Синовиальная оболочка — наименьшая по массе и объему, играет, безусловно, большую роль в состоянии суставного хряща [2], но её изменения в разработанной модели остеоартроза не изучены.

Изложенное определяет актуальность комплексных исследований структур сустава при биомоделировании остеоартроза.

Цель настоящего исследования — оценка структурной реорганизации синовиальной оболочки, суставного хряща и субхондральной кости коленного сустава у собак при моделировании остеоартроза с редуцированным кровоснабжением.

**Материал и методы.** Исследование проведено на 5 интактных (контроль) и 5 подопытных взрослых собаках, которым перевязывали поверхностную бедренную артерию, коленные суставы фиксировали в среднефизиологическом положении с помощью аппарата Илизарова [7]. Животных выводили из опыта через 28 сут иммобилизации. Содержание, оперативные вмешательства и эвтаназию передозировкой

### Сведения об авторах:

Ступина Татьяна Анатольевна (e-mail: [StupinaSTA@mail.ru](mailto:StupinaSTA@mail.ru)), лаборатория морфологии;

Щудло Наталья Анатольевна (e-mail: [nshchudlo@mail.ru](mailto:nshchudlo@mail.ru)), клиничко-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти; Степанов Михаил Александрович (e-mail: [m-stepanov@mail.ru](mailto:m-stepanov@mail.ru)), лаборатория гнойной остеологии

и замещения дефектов конечностей, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, 640014, Россия, г. Курган, М. Ульяновой, 6

барбитуратов проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказы № 755 МЗ СССР от 12.08.1977 г., № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г.) и принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986). Манипуляции, проводимые на животных, рассмотрены и одобрены этическим комитетом Российского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова.

Исследовали парафиновые срезы мышечков бедра, окрашенные гематоксилином — эозином, по Массону. С помощью рентгеновского электронно-зондового микроанализатора INCA Energy 200 (Oxford Instrumets Analytical, Англия), смонтированного на сканирующем электронном микроскопе JSM-840 (Jeol, Япония), определяли концентрацию серы ( $\omega S$ , вес. %) и кальция ( $\omega Ca$ , вес. %) в суставном хряще и в субхондральной кости. Для изучения сосудистого русла субхондральной зоны использовали методику инъекции кровеносных сосудов 10% раствором желатина с тушью с последующим препарированием и просветлением препаратов. Рельеф суставной поверхности исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) JSM-840 (Jeol, Япония). Кроме того, готовили полутонкие эпоксидные срезы толщиной 0,5–1,0 мкм увеличенной площади (4–8 мм<sup>2</sup>) синовиальной оболочки, которую иссекали из супрапателлярной зоны и суставного хряща с подлежащей субхондральной костью с нагружаемых поверхностей мышечков бедра. Препараты окрашивали метиленовым синим — основным фуксином и исследовали, используя фотомикроскоп (Opton, Германия). Гистоморфометрические исследования выполнены с помощью АПК «ДиаМорф» (Россия) и программы ВТ-Мастер-Морфология (ВидеоТест, Россия). Определяли толщину покровного слоя синовиальной оболочки (мкм), количество рядов синовиальных клеток, численную плотность микрососудов (мм<sup>-2</sup>). Выраженность синовита оценивали по шкале экспертных оценок, предложенной V. Krenn и соавт. [11]. Определяли также толщину суставного хряща (мкм), объемную ( $V_{ch}$ , %) и численную ( $N_{A, ch}$ , мкм<sup>-2</sup>) плотность хондроцитов, рассчитывали долю хондроцитов в составе изогенных групп ( $NN_{is, gr}$ , %) от общего количества хондроцитов и долю пустых лакун ( $NN_{em, lac}$ , %) от общего количества лакун [8]. Для анализа цифрового материала использовали описательную статистику. В зависимости от характера распределения и объема выборок значимость различий оценивали с помощью критериев Стьюдента или Вилкоксона, используя программу AtteStat (тесты запрограммированы И. П. Гайдышевым [3] и помещены в динамически

подключаемую библиотеку программы Microsoft Excel 97). Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** В синовиальной оболочке отмечена очаговая гиперплазия покровного слоя (рис. 1, а). Его утолщение формировалось за счёт возрастания размеров клеток, количества клеточных слоёв (таблица) и увеличения представительства синовиоцитов макрофагального типа с разрастаниями ворсин, различимыми на светооптическом уровне.

Ядра таких клеток расположены эксцентрично, цитоплазма вакуолизована, с зернистыми включениями (см. рис. 1, б). Отмечены плазматические клетки. В верхних слоях субсиновиального слоя выражен липоматоз, в глубоких — имеются признаки отека с редким расположением и разволокнением коллагеновых волокон, увеличением оптических пустот между ними. Численная плотность кровеносных сосудов субсиновиального слоя по сравнению с контролем значительно ( $P < 0,05$ ) снижена (см. таблицу). Их просветы сужены, стенки утолщены за счёт внутриклеточного отёка, во многих эндотелиоцитах наблюдался кариорексис. Содержание периваскулярных тучных клеток было умеренно повышено (см. рис. 1, в). Нередки сосуды микроциркуляторного русла с облитерированными или тромбированными просветами. В артериях малого калибра преобладали булавовидный фенотип эндотелия, вакуольная дистрофия гладких миоцитов. В нервах субсиновиального слоя выявлен отёк эндоневрия, осевых цилиндров безмиелиновых волокон, многие миелиновые волокна находились в состоянии аксональной атрофии или дегенерации (см. рис. 1, г).

В субхондральной зоне кости при анализе просветленных препаратов выявлена гиповаскуляризация (рис. 2, а), при светооптическом исследовании полутонких срезов отмечены признаки нарушения микроциркуляции — стаз эритроцитов, расширенные просветы капилляров и венул. В нагружаемых участках на границе с кальцифици-

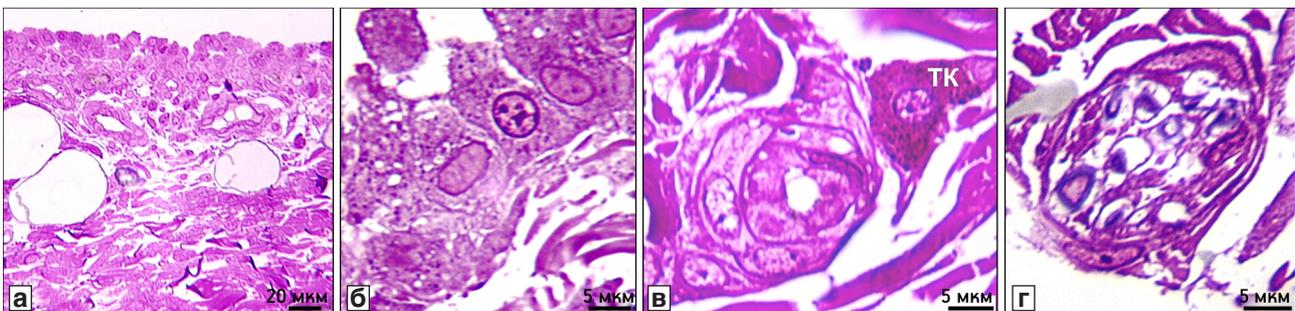


Рис. 1. Синовиальная оболочка коленного сустава собаки.

а — гиперплазия покровного слоя, в субсиновиальном слое липоматоз; б — синовиоциты макрофагального типа; в — типичный вид кровеносного сосуда субсиновиального слоя; г — нервный пучок, большинство миелиновых волокон в состоянии деструкции. ТК — тучная клетка. Полутонкие срезы. Окраска метиленовым синим — основным фуксином

## Гистологические и морфометрические характеристики синовиальной оболочки

Исследованные показатели	Контроль	28 сут иммобилизации
Толщина покровного слоя, мкм	26,1±2,0	62,7±2,3*
Характеристика клеток покровного слоя	Преобладают фибробластические синовиоциты	В очагах гиперплазии преобладают макрофагальные синовиоциты
Количество слоёв синовиальных клеток	1–2	2–4
Изменение субсиновиального слоя	Нормальное количество клеток	Количество клеток повышено Липоматоз
Численная плотность микрососудов	335±29	150±18*
Изменения нервных волокон в нервах субсиновиального слоя	–	Аксональная атрофия или дегенерация

\* Различия по сравнению с контролем значимы при  $P < 0,05$ .

цированным хрящом отмечено очаговое усиление костеобразования, утолщение костных трабекул, на поверхности которых были выявлены активные остеобласты (см. рис. 2, б). В менее нагружаемых участках обнаружены признаки угнетения активности остеобластов, преобладания явлений остеокластической резорбции (см. рис. 2, в). Содержание кальция было значимо ( $P < 0,05$ ) снижено до  $10,09 \pm 0,01\%$  по сравнению с таковым в контроле ( $21,8 \pm 1,9\%$ ). Содержание серы в разных участках изменялось от  $0,11 \pm 0,04$  до  $0,35 \pm 0,08\%$  (контроль —  $0,23 \pm 0,05\%$ ).

При исследовании суставной поверхности в СЭМ выявлено её эрозирование и разволокнение (рис. 3, а). При микроскопии полутонких срезов отмечено, что большая часть хондроцитов поверхностной зоны суставного хряща находились в состоянии гибели. В промежуточной и глубокой зонах дистрофическим изменениям и дегенерации подвергались как одиночно расположенные хондроциты, так и входившие в состав изогенных групп (см. рис. 3, б).

Выявлено неравномерное окрашивание базофильной линии, её фрагментация, образование разрывов, проникновение костномозгового паннуса в хрящ (см. рис. 3, в). Отмечено значимое ( $P < 0,05$ ) уменьшение толщины хряща (опыт —

$318,6 \pm 2,7$  мкм; контроль —  $475,5 \pm 1,3$  мкм). Снижение  $N_{A_{ch}}$  происходило за счет уменьшения ( $P < 0,05$ ) численности клеток в поверхностной (опыт —  $7,0 \pm 0,9$ ; контроль —  $8,2 \pm 1,0$ ) и промежуточной (опыт —  $2,89 \pm 0,19$ ; контроль —  $4,4 \pm 0,6$ ) зонах, в глубокой зоне различия между показателями в опыте и контроле были незначимы. Объемная плотность хондроцитов во всех зонах почти в 2 раза была ниже контроля (опыт —  $4,6 \pm 0,4\%$ ; контроль —  $9,03 \pm 1,5\%$ ). Увеличивалась доля пустых лакун (опыт —  $43,39\%$ ; контроль —  $14,5\%$ ), если в контроле пустые лакуны были отмечены преимущественно в поверхностной и глубокой зонах, то в опыте — в промежуточной зоне. Выявлено значительное снижение содержания серы (опыт —  $0,70 \pm 0,020$  вес.%, контроль —  $1,260 \pm 0,020$  вес.%). Зарегистрировано увеличение содержания кальция, особенно в промежуточной и глубокой зонах (опыт —  $0,27 \pm 0,05$  вес.%, контроль —  $0,19 \pm 0,03$  вес.%).

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования получена морфологическая характеристика индуцированного деструктивно-дистрофического процесса в коленном суставе у собак. Гистологические и метаболические изменения суставного хряща соответствовали начальным стадиям остеоартро-

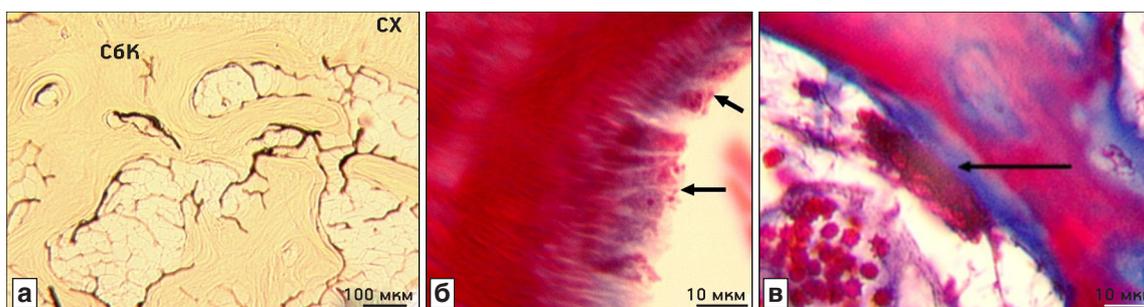


Рис. 2. Субхондральная зона коленного сустава собаки.

а — гиповаскуляризация субхондральной кости; б — активные остеобласты на поверхности костной трабекулы (стрелки); в — остеокласт, резорбирующий основное вещество трабекулы (стрелка). СБК — субхондральная кость; СХ — суставной хрящ. а — инъекция раствора туши; б, в — парафиновые срезы, окраска по Массону

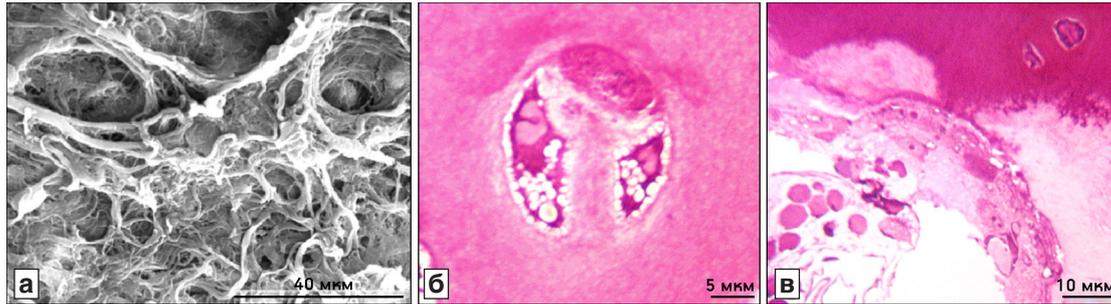


Рис. 3. Суставной хрящ коленного сустава собаки.

а — разволокнение суставной поверхности, вскрытые лакуны; б — хондроциты промежуточной зоны с признаками деструкции; в — граница глубокой зоны и кальцифицированного хряща. а — сканирующая электронная микроскопия; б, в — полутонкие срезы. Окраска метиленовым синим — основным фуксином

за — степень I–III по гистологической классификации Международного общества изучения остеоартроза OARSI [14], сопровождались синовитом, гиповаскуляризацией и денервацией субсиновального слоя, а также значительными изменениями субхондральной кости.

Оценка по шкале V. Krenn и соавт. [11] в нашем эксперименте свидетельствовала об отчетливо выраженном синовите (6–7 баллов). Известно, что симптоматика остеоартроза у людей в значительной степени определяется неинфекционным воспалением синовиальной оболочки [13].

В субхондральной кости отмечались ухудшение васкуляризации, усиление костной резорбции, выявлены очаговый остеосклероз и существенное снижение содержания кальция. В клинических исследованиях установлено увеличение скорости обеих составляющих ремоделирования костной ткани — резорбции и костеобразования — при остеоартрозе; преобладание какого-либо составляющего зависит от стадии заболевания [1, 6].

Результаты выполненного исследования свидетельствуют о том, что разработанная экспериментальная модель остеоартроза клинически адекватна и пригодна для доклинических испытаний различных терапевтических стратегий при остеоартрозе — в том числе направленных на купирование синовита либо модификацию ремоделирования субхондральной кости.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева Л. И. и Зайцева Е. М. Роль субхондральной кости при остеоартрозе. Науч.-практ. ревматол., 2009, № 4, с. 41–48.
- Бородин Ю. И., Любарский М. С., Бгатова Н. П. и др. Морфологические характеристики состояния микроциркуляции и лимфатического дренажа в синовиальной оболочке коленного сустава в норме и при патологии. Морфология, 2008, т. 133, вып. 1, с. 51–55.
- Гайдышев И. П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. СПб., Питер, 2001.

- Корнилов Н. Н., Новоселов К. А. и Корнилов Н. В. Современные взгляды на этиопатогенез, принципы диагностики и консервативную терапию дегенеративно-дистрофических заболеваний коленного сустава. Травматол. и ортопед. России, 2002, № 2, с. 47–59.
- Макушин В. Д., Степанов М. А. и Ступина Т. А. Экспериментальное моделирование остеоартроза коленного сустава у собак. Биомедицина, 2012, № 3, с. 108–115.
- Матвеева Е. Л., Осипова Е. В., Гасанова А. Г. и Чегуров О. К. Особенности синовиальной среды суставов и субхондральной зоны кости при гонартрозе. Травматол. и ортопед. России, 2011, № 4, с. 18–22.
- 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. 10.06.2012. Бюл. № 16.
- Ступина Т. А. и Щудло М. М. Способ количественной оценки состояния суставного хряща на разных уровнях структурной организации. Гений ортопедии, 2009, № 1, с. 55–57.
- Шевцов В. И., Макушин В. Д., Ступина Т. А. и Степанов М. А. К вопросу моделирования остеоартроза коленного сустава у собак для изучения патогенеза. Гений ортопедии, 2012, № 1, с. 38–42.
- Ashraf S. and Walsh D. A. Angiogenesis in osteoarthritis. Curr. Opin. Rheumatol., 2008, v. 20, p. 573–580.
- Krenn V., Morawietz L., Burmester G-R. et al. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. Histopathology, 2006, v. 49, p. 358–364.
- Little C. B. and Zaki S. What constitutes an «animal model of osteoarthritis» — the need for consensus? Osteoarthritis Cartilage, 2012, v. 20, p. 261–267.
- Pelletier J. P., Martel-Pelletier J. and Abramson S. B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. Arthritis Rheum., 2001, v. 44, p. 1237–1247.
- Pritzker K. P. H., Gay S., Jimenez S. A. et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis Cartilage, 2006, v. 14, p. 13–29.
- Walsh D. A. and Pearson C. I. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. Arthritis Res., 2001, v. 3, p. 147–153.

Поступила в редакцию 12.04.2014

## STRUCTURAL REORGANIZATION OF THE MAIN JOINT COMPONENTS DURING THE EXPERIMENTAL MODELING OF OSTEOARTHRITIS WITH REDUCED BLOOD SUPPLY

*T.A. Stupina, N.A. Shchudlo and M.A. Stepanov*

The reactive changes in the knee synovium, articular cartilage, and subchondral bone during osteoarthritis modeling were studied in dogs (n=5). The results of histomorphometry, scanning electron microscopy, and electron probe microanalysis have demonstrated that the osteoarthritis model used (femoral artery ligation and the knee immobilization) lead to marked synovitis, axonal atrophy and nerve fiber degeneration in subsynovial nerves, as well as synovial membrane hypovascularization. Subchondral

bone vascularization was shown to deteriorate, while calcium content was reduced. Destructive changes were detected in the articular cartilage. Chondrocytes of the intermediate zone which were equidistant from vascular and synovial sources of supply appeared to be the most vulnerable. The changes described are the consequences of the disturbed interactions of the main joint components indicating the reduction of synthesis with a predominance of catabolic processes.

**Key words:** *articular cartilage, synovium, subchondral bone, modeling, osteoarthritis*

Laboratory of Morphology; Clinico-Experimental Laboratory for Reconstructive-Restorative Microsurgery and Surgery of the Hand; Laboratory of Pyogenic Osteology and Limb Defect Replacement, G.A. Ilizarov Russian Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopedics, Kurgan

© И. Г. Пашкова, И. В. Гайворонский, Л. А. Алексина, М. А. Корнев, 2014  
УДК 572.5:611.018.4-055.2(470.22)

*И. Г. Пашкова<sup>1</sup>, И. В. Гайворонский<sup>2,3</sup>, Л. А. Алексина<sup>4</sup> и М. А. Корнев<sup>2</sup>*

## ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ И СОМАТОТИПОМ У ЖЕНЩИН, ПРОЖИВАЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ КАРЕЛИЯ

<sup>1</sup> Кафедра анатомии, гистологии, патологической анатомии и судебной медицины (зав. — доц. И. Г. Пашкова), Петрозаводский государственный университет; <sup>2</sup> кафедра нормальной анатомии (зав. — проф. И. В. Гайворонский), Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург; <sup>3</sup> кафедра морфологии (зав. — проф. И. В. Гайворонский), Санкт-Петербургский государственный университет; <sup>4</sup> кафедра нормальной анатомии (зав. — проф. Л. А. Алексина), Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

Проведено комплексное антропометрическое и денситометрическое исследование методом двойной рентгеновской абсорбциометрии с целью определения взаимосвязи между минеральной плотностью костной ткани и соматотипом у 360 женщин в возрасте от 20 до 87 лет, постоянно проживающих в Республике Карелия. Выявлена значимая прямая корреляция между соматотипом и количеством минеральных веществ в позвонках, минеральной плотностью и площадью поясничных позвонков. Уровень минеральной плотности поясничных позвонков выше у женщин эурипластического и атлетического соматотипов, характеризующихся высокими значениями массы и длины тела, массы мышечного и жирового компонентов. Низкие значения минеральной плотности позвонков выявлены у женщин субатлетического, мезопластического и стенопластического соматотипов. Риск развития остеопении и остеопороза возрастает у женщин с низким уровнем массы мышечного компонента в составе тела.

**Ключевые слова:** *антропометрия, соматотип, масса жирового компонента, масса мышечного компонента, минеральная плотность костной ткани*

Количественное исследование минеральной плотности (МП) костей является наиболее значимым в диагностике метаболических заболеваний скелета и методом неинвазивной оценки риска перелома костей при остеопорозе [8]. Показатель

минерализации костей подвержен значительной индивидуальной изменчивости, зависящей от обменных процессов в организме [9]. Еще в 70-е годы Б. А. Никитюком была показана неравномерность старения костей и суставов у людей

### Сведения об авторах:

*Пашкова Инга Геннадьевна* (e-mail: [ingapashkova@yandex.ru](mailto:ingapashkova@yandex.ru)), кафедра анатомии, гистологии, патологической анатомии и судебной медицины, медицинский факультет, Петрозаводский государственный университет, Республика Карелия, 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33;

*Гайворонский Иван Васильевич, Корнев Михаил Александрович*, кафедра нормальной анатомии, ВМА им. С. М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6;

*Алексина Людмила Арсентьевна*, кафедра анатомии человека им. М. Г. Привеса, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8