

© Т. А. Ступина, М. М. Щудло, Н. А. Щудло, 2015
УДК 611.018.3:636.7

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

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ХОНДРОЦИТОВ В СУСТАВНОМ ХРЯЩЕ У СОБАК ПРИ УДЛИНЕНИИ СМЕЖНОГО СЕГМЕНТА КОНЕЧНОСТИ

¹ Лаборатория морфологии (и. о. зав. — канд. биол. наук Т. А. Силантьева), ² клинично-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, г. Курган

С целью оценки влияния ортопедического удлинения на пролиферативную активность хондроцитов суставного хряща у 15 собак осуществляли дозированное удлинение правой голени на 28 мм по 1 мм/сут за 4 приема. Сроки исследования — 28 сут distraction, 30 сут фиксации в аппарате и 30 сут после снятия аппарата. Использовали методы световой микроскопии парафиновых срезов, иммуногистохимии, гистоморфометрию полутонких эпоксидных срезов. В конце distraction преимущественная концентрация маркера Ki-67 выявлена в верхних слоях промежуточной зоны, а также очагами в поверхностной и глубокой зонах суставного хряща мыщелков бедра. По окончании удлинения наблюдалось стойкое увеличение численности хондроцитов по сравнению с таковой в интактной группе (n=5) в поверхностной и промежуточной, но не в глубокой зонах хряща.

Ключевые слова: хондроциты, пролиферация, иммуногистохимия, удлинение конечности

Хондроциты составляют незначительную часть объема суставного гиалинового хряща, но они играют важную роль, так как обеспечивают поддержание состояния внеклеточного матрикса в процессах нормальной жизнедеятельности и развития дегенеративных заболеваний. Увеличение числа активно пролиферирующих и продуцирующих клеток — основной источник восстановительных процессов в суставном хряще [4].

В исследованиях на животных установлено, что с возрастом в результате апоптоза происходит значительное снижение численной плотности хондроцитов, что интерпретируется авторами как начало остеоартроза [10].

Митотически делящиеся хондроциты обнаруживались до 8 нед постнатального онтогенеза у крыс, при экспериментально индуцированном остеоартрозе митотический индекс приближался к нулю, при этом снижалась и численность хондроцитов [11].

Фигуры митоза хондроцитов и ассоциированный с пролиферацией антиген Ki-67 не выявлялись в нормальном хряще коленного сустава у взрослых людей, однако Ki-67 обнаружен в некоторых образцах суставного хряща у больных с остеоартрозом преимущественно в поверхностной и промежуточных зонах [9]. В прицельном

биомеханическом исследовании, проведенном на кроликах, доказано, что в результате натяжения мягких тканей при ортопедическом удлинении голени отчетливо выражена компрессия суставных поверхностей коленного сустава [14]. В модели *ex vivo* обнаружено моделирующее воздействие механической компрессии на пролиферацию хондроцитов [13].

Сведения о пролиферативных возможностях клеток суставного хряща при ортопедическом удлинении конечности в литературе отсутствуют.

Цель настоящей работы — изучение пролиферативной активности хондроцитов в суставном хряще коленного сустава у собак при удлинении голени.

Материал и методы. Изучен суставной хрящ наружного мыщелка бедра у 15 подопытных и 5 интактных (контроль) беспородных собак I категории (длина голени 18–21 см) в возрасте 1,5–2 лет и массой 18–25 кг. Содержание и оперативные вмешательства 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) [3]. Манипуляции, проводимые на животных, рассмотрены и одобрены этическим комитетом Российского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова. Всем подопыт-

Сведения об авторах:

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

Щудло Михаил Моисеевич (e-mail: m.m.sch@mail.ru), Щудло Наталья Анатольевна (e-mail: nshchudlo@mail.ru),

клинично-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

ным животным после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей методом чрескостного дистракционного остеосинтеза осуществляли дозированное удлинение правой голени на 28 мм по 1 мм за 4 приема (эксперимент выполнен канд. вет. наук С.А.Емановым). Через 28 сут дистракции, 30 сут фиксации и через 30 сут после снятия аппарата после эвтаназии животных передозировкой барбитуратов вскрывали коленный сустав и с передней поверхности наружного мыщелка бедренной кости вырезали кусочки суставного хряща размером 2–3×5–6 мм. Часть материала для изготовления парафиновых срезов обрабатывали по стандартной методике [5]. На срезах, помещенных на стекла с поли-л-лизинном, с использованием набора реактивов для иммуногистохимии и системы визуализации RE7140-K, моноклональных антител к Ki-67 (готовые к применению) фирмы «Novocastra» (Великобритания) определяли экспрессию белка Ki-67 согласно протоколу фирмы производителя. Ki-67 — ядерный антиген, экспрессируемый в пролиферативной фазе клеточного цикла (фазы G₁, S, G₂, M) и отсутствующий в фазе G₀. Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в канадский балзам. Ядерная реакция любой интенсивности фиксировалась как позитивная для Ki-67. Индекс Ki-67 (InKi-67) вычисляли как отношение клеток, экспрессирующих этот антиген, к общему количеству подсчитанных клеток, выраженное в процентах. В качестве контроля морфометрировали суставной хрящ у интактных животных. Часть материала после альдегидно-осмиевой фиксации обрабатывали по разработанной нами методике [7] и заключали в аралдит. На ультратоме Nova (LKB, Швеция) изготавливали эпиксидные полутонкие (толщиной 0,5–1,0 мкм) срезы увеличенной площади [6], которые окрашивали метиленовым синим — основным фуксином. Определяли относительные средние значения (в процентах от значений у интактных животных) площади сечения хондроцитов (S_{ch}) и их численной плотности (NA_{ch}) в поверхностной, промежуточной и глубокой зонах хряща.

Все препараты исследовали, используя фотомикроскоп (Opton, Германия). Гистоморфометрические исследования выполнены с помощью аппаратно-программного комплекса «ДиаМорф» (Москва) и программы ВТ-Мастер-Морфология (ВидеоТест, Россия). Для анализа цифрового материала

использовали описательную статистику. В зависимости от характера распределения и объема выборок значимость различий оценивали с помощью критериев Стьюдента или Вилкоксона и программы AtteStat (тесты запрограммированы И.П.Гайдышевым [1] и помещены в динамически подключаемую библиотеку программы Microsoft Excel 97). Различия считали значимыми при P<0,05.

Результаты исследования. При светооптическом исследовании полутонких срезов суставного хряща у интактных собак деструктивные изменения хондроцитов не выявлены. Изредка они обнаруживались в хондроцитах двучленных изогенных групп, преимущественно в верхних слоях промежуточной зоны хряща.

В подопытной группе через 28 сут дистракции в поверхностной зоне суставного хряща были отмечены деструктивные изменения: морфологические признаки некроза и апоптоза отдельных хондроцитов, нарушение гомогенности межклеточного вещества — очаги демаскирования коллагеновых волокон. Под такими участками в промежуточной зоне была увеличена частота встречаемости двучленных изогенных групп клеток (рис. 1, а).

В части наблюдений отмечено нарушение целостности базофильной линии, проникновение сосудов в хрящ. Обнаруженные изменения хрящевой ткани имели мозаичное расположение, участки с демаскированными коллагеновыми волокнами в суставном хряще чередовались с неповрежденными, имеющими обычную структуру. Через 30 сут фиксации уменьшились частота встречаемости и объем участков с демаскированными волокнами. В поверхностной зоне были выявлены многочисленные изогенные группы, состоящие из



Рис. 1. Изогенные группы клеток в суставном хряще коленного сустава у собак при удлинении голени в режиме 1 мм за 4 приема.

а — промежуточная зона через 28 сут дистракции; б — неповрежденный участок поверхностной зоны через 30 сут фиксации конечности в аппарате; в, г — промежуточная и глубокая зоны через 1 мес после снятия аппарата. Полутонкие срезы. Окраска метиленовым синим — основным фуксином

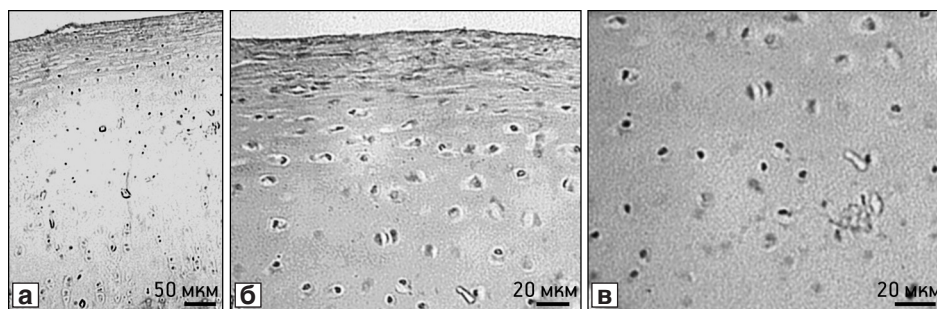


Рис. 2. Характер экспрессии Ki-67 клетками хряща коленного сустава у собаки при удлинении голени в режиме 1 мм за 4 приема через 30 сут фиксации конечности в аппарате. а — общий вид суставного хряща; б — поверхностная и верхние слои промежуточной зоны; в — промежуточная зона. Иммуногистохимическая реакция

8 клеток и более (см. рис. 1, б). Через 1 мес после снятия аппарата сохранялось нарушение организации матрикса хряща поверхностной зоны. Наибольшая частота встречаемости изогенных групп отмечена в промежуточной зоне хряща, где преобладали в основном двучленные изогенные группы клеток (см. рис. 1, в), единичные четырехчленные изогенные группы клеток были отмечены в глубокой зоне.

На всех этапах эксперимента фактор пролиферации — белок Ki-67 был выявлен в виде окрашенного в коричневый цвет ядерного субстрата хрящевых клеток преимущественно в верхних слоях промежуточной зоны, а также очагами в поверхностной и глубокой зонах хряща (рис. 2).

В суставном хряще у всех экспериментальных животных InKi-67 превышал таковой в контроле, его максимальные значения были зарегистрированы в конце периода дистракции (таблица).

К концу дистракции было выявлено значимое снижение численной плотности хрящевых клеток в поверхностной и глубокой зонах хряща (рис. 3, а). Наиболее выраженное уменьшение площади сечения клеток было зарегистрировано в промежуточной зоне (см. рис. 3, б). Здесь же отмечена и преимущественная локализация маркера пролиферации. К концу периода фиксации по сравнению с предыдущим этапом эксперимента выявлено увеличение численной плотности клеток во всех зонах хряща, но особенно в поверхностной и промежуточной зонах и резкое снижение площади сечения хондроцитов в поверхностной зоне.

При этом сохранялись высокие значения InKi-67. В поверхностной зоне хряща выявлены

многочисленные Ki-67-позитивные хондроциты в составе многочисленных изогенных групп. Через 1 мес после снятия аппарата численная плотность хондроцитов в поверхностной и промежуточной зонах увеличивалась, при этом хондроциты были уменьшены в размерах. По сравнению с контролем сохранялись высокие значения InKi-67. В глубокой

зоне численная плотность клеток резко снизилась, но увеличилась средняя площадь сечения хондроцитов по сравнению с таковыми на предыдущих этапах эксперимента.

Обсуждение полученных данных. При удлинении смежного сегмента конечности деструктивные изменения выявлены преимущественно в поверхностной и глубокой зонах суставного хряща. Демаскирование коллагеновых волокон в поверхностной зоне хряща отражает реакцию на избыточную статическую нагрузку, а проникновение сосудов в глубокую зону со стороны субхондральной кости — на нарушение кровоснабжения. К концу эксперимента в глубокой зоне хряща сохранялась сниженная численная плотность хондроцитов.

Поскольку хондроциты — единственный тип клеток, формирующих хрящ, то восстановление их численной плотности должно определяться их пролиферацией. Возбуждение пролиферативных возможностей хондроцитов в нашем эксперименте подтверждается морфологически — обнаружением изогенных групп. Несмотря на то, что в эксперименте отмечены тесные клеточные пары, фигуры митозов хондроцитов обнаружить не удалось. М.А.Гómez-Camarillo и J.В.Кouri [11] цитируют многих авторов, которые с помощью различных методов доказали наличие пролиферации хондроцитов в суставном хряще у половозрелых особей при остеоартрозе, однако прямых подтверждений пролиферации — признаков митоза — авторам выявить не удалось. Выявленные в нашем исследовании морфологические признаки некроза и апоптоза хондроцитов соответствовали

Индекс пролиферации (InKi-67) в суставном хряще у собак на этапах эксперимента ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованный показатель	Контроль	28 сут дистракции	30 сут фиксации	30 сут без аппарата
InKi-67	16,5±1,7	28,0±3,0*	24,5±1,9*	18,8±2,8*

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

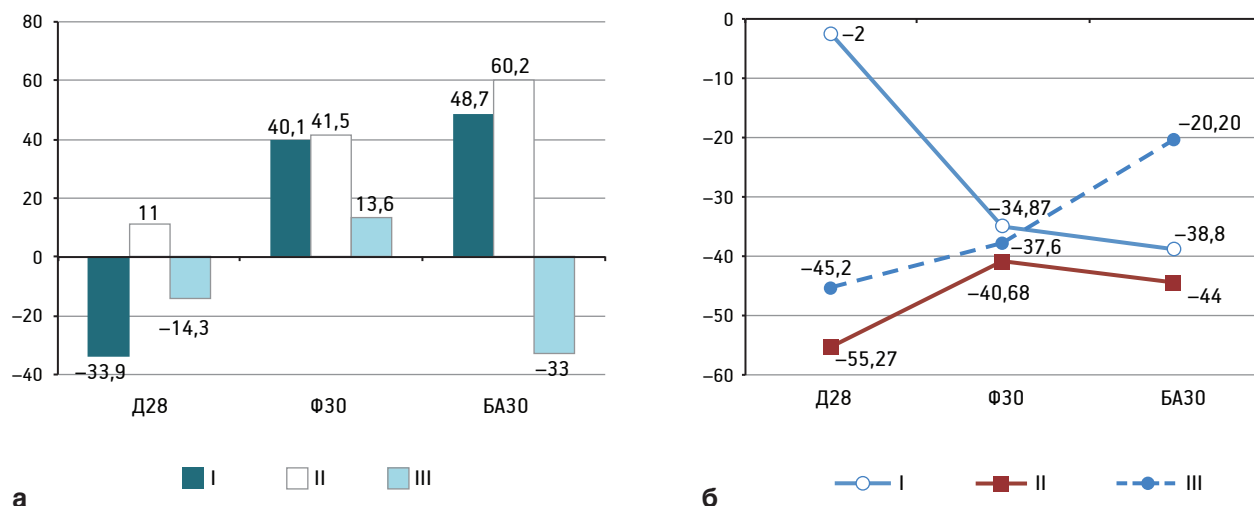


Рис. 3. Относительная численная плотность (а) и площадь сечения (б) хондроцитов в поверхностной (I), промежуточной (II) и глубокой (III) зонах суставного хряща у собаки при удлинении голени в режиме 1 мм за 4 приема.

По оси абсцисс — этапы эксперимента: Д28 — конец distraction; Ф30 — конец периода фиксации конечности в аппарате; БА30 — через 30 сут после снятия аппарата; по осям ординат — исследованные показатели (% от значений у интактных животных)

известным из литературы [2, 12] и свидетельствовали об убыли их популяции.

Анализ динамики площади, численной плотности хондроцитов, а также анализ топографии изогенных групп и маркера пролиферативной активности Ki-67 свидетельствовали о том, что в данных условиях эксперимента восстановление популяции хондроцитов происходит за счет пролиферации хрящевых клеток, преимущественно в верхних слоях промежуточной зоны, а также очагами в поверхностной и глубокой зонах.

По данным Е.В.Четиной [8], локализация маркеров пролиферативной активности Ki-67 и PCNA в эксплантатах суставного хряща у взрослого быка определялась в средней зоне. При культивировании с пептидом СВ12-2, разрушающим коллаген на 1-е сутки, окрашивание пролиферативных антигенов отмечено в средней и глубокой зонах, на 4-е сутки окрашивание пролиферативных антигенов оставалось интенсивным и включало большее число клеток также и в поверхностной зоне.

При моделировании остеоартроза у крыс T.Aigner и соавт. [9] обнаружили маркер пролиферации Ki-67 в поверхностной и промежуточных зонах. М.А.Gómez-Camarillo и J.B.Kouri [11] в суставном хряще у крыс при экспериментально индуцированном остеоартрозе фигуры митоза не обнаружили, но отмечали двуядерные хондроциты и пары тесно расположенных клеток. При этом ряд исследователей [9–11] выявили снижение численной плотности клеток.

T.Aigner и соавт. [9] повышение пролиферативной активности хондроцитов в верхних зонах

хряща при остеоартрозе связывают с разрушением коллагена. Аналогичные результаты при культивировании эксплантатов суставного хряща у взрослого быка в присутствии пептида, разрушающего коллаген, получены Е.В.Четиной [8].

В нашем исследовании повышение пролиферативной активности хондроцитов в поверхностной зоне, вероятно, можно рассматривать как компенсаторную реакцию в ответ на нарушение структуры межклеточного вещества — хряща суставной поверхности. К концу эксперимента уменьшались частота встречаемости и объем участков с демаскированными коллагеновыми волокнами, численная плотность хондроцитов в поверхностной и промежуточной зонах превышала таковую в норме, деструктивные изменения не прогрессировали.

Таким образом, при удлинении голени в суставном хряще мыщелков бедра отмечено повышение пролиферативной активности хондроцитов с преимущественной концентрацией маркера Ki-67 в верхних слоях промежуточной зоны, а также очагами в поверхностной и глубокой зонах. При этом, по окончании удлинения наблюдалось стойкое увеличение численности хондроцитов по сравнению с таковой в интактной группе в поверхностной и промежуточной, но не в глубокой зонах хряща.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. СПб.: Питер, 2001.
2. Дедух Н.В., Бенгус Л.М., Туляков В.А., Батура И.А. Морфология суставного хряща крыс с кортикостероидной дис-

- трофией после лечения комбинацией глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом // Вісн. проблем біології і медицини. 2011. Т. 1, вып. 2. С. 291.
3. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопр. реконструктивной и пластической хирургии. 2003. № 4. С. 34–36.
 4. Павлова В.Н., Павлов Г.Г., Шостак Н.А., Слуцкий Л.И. Сустав: Морфология, клиника, диагностика, лечение. М.: Медицинское информационное агентство, 2011.
 5. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: Руководство. М.: Медицина, 1996.
 6. Ступина Т.А., Щудло М.М. Способ количественной оценки состояния суставного хряща на разных уровнях структурной организации // Гений ортопедии. 2009. № 1. С. 55–57.
 7. Ступина Т.А., Щудло М.М. Способ изготовления препаратов недекальцированного суставного хряща с подлежащей субхондральной костью для многоцелевых исследований // Бюл. exper. биол. 2014. Т. 157, № 3. С. 388–390.
 8. Четина Е.В. Клеточные и молекулярные механизмы разрушения суставного хряща при остеоартрозе: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2011.
 9. Aigner T., Hemmel M., Neureiter D. et al. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage: A study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage // *Arthritis Rheum.* 2001. Vol. 44, Iss. 6. P. 1304–1312.
 10. Allen R.T., Robertson C.M., Harwood F.L. et al. Characterization of mature vs aged rabbit articular cartilage: analysis of cell density, apoptosis-related gene expression and mechanisms controlling chondrocyte apoptosis 1 // *Osteoarthritis Cartilage.* 2004. Vol. 12, Iss. 11. P. 917–923.
 11. Gómez-Camarillo M.A., Kouri J.B. Ontogeny of rat chondrocyte proliferation: studies in embryo, adult and osteoarthritic (OA) cartilage // *Cell Res.* 2005. Vol. 15, № 2. P. 99–104.
 12. Grogan S.P., D'Lima D.D. Joint aging and chondrocyte cell death // *Int. J. Clin. Rheumatol.* 2010. Vol. 5, № 2. P. 199–214.
 13. Li K.W., Falcovitz Y.H., Nagrampa J.P. et al. Mechanical compression modulates proliferation of transplanted chondrocytes // *J. Orthop. Res.* 2000. Vol. 18, № 3. P. 374–382.
 14. Yang L., Cai G., Coulton L., Saleh M. Knee joint reaction force during tibial diaphysal lengthening: a study on a rabbit model // *J. Biomech.* 2004. Vol. 37, № 7. P. 1053–1059.

Поступила в редакцию 05.01.2015

STUDY OF CHONDROCYTE PROLIFERATIVE ACTIVITY IN THE CANINE ARTICULAR CARTILAGE DURING LENGTHENING OF THE ADJACENT LIMB SEGMENT

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

To assess the effect of orthopedic lengthening on proliferative activity of chondrocytes in the articular cartilage, dosed tibial lengthening by 28 mm was performed in 15 dogs at the rate of 1 mm/day divided into 4 sessions. Experiment time-points – 28 days of distraction, 30 days of fixation in the apparatus and 30 days after the apparatus removal. Methods of light microscopy of paraffin sections, immunohistochemistry, histomorphometry of semithin epoxide sections were used. At the end of distraction, the preferential concentration of Ki-67 marker was detected in the upper layers of the intermediate zone, while focal distribution was noted in the superficial and deep zones of articular cartilage of femoral condyles. Upon completion of lengthening, a stable increase in the number of chondrocytes was noted in the superficial and intermediate zones but not in the deep cartilage zone as compared with the intact group (n=5).

Key words: *chondrocytes, proliferation, immunohistochemistry, limb lengthening*

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