



Экспериментальное моделирование остеоартроза коленного сустава у собак

В.Д. Макушин, М.А. Степанов, Т.А. Ступина

ФГБУ Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий, Курган

Контактная информация: к.б.н. Ступина Татьяна Анатольевна StupinaSTA@mail.ru

Представлены результаты экспериментального моделирования остеоартроза у собак путем иммобилизации коленного сустава с пересечением бедренной артерии. Результаты оценки морфофункционального состояния суставного хряща свидетельствуют о развитии дегенеративно-дистрофических изменений, выражающихся гибелью и деструкцией части хондроцитов, нарушением гомогенности межклеточного матрикса и снижением морфометрируемых параметров – толщины хряща, объемной и численной плотности хондроцитов. Отмеченные изменения являются следствием нарушения обменных процессов в суставном хряще, свидетельствующих о снижении синтеза и преобладании катаболических процессов. В данных условиях эксперимента наиболее уязвимыми оказались хондроциты промежуточной зоны, которые равноудалены от васкулярного и синовиального факторов питания.

Ключевые слова: суставной хрящ, моделирование остеоартроза, морфология, морфометрия.

Введение

Существенный вклад в раскрытие механизмов патогенеза остеоартроза вносят исследования суставов животных, подвергшихся различным воздействиям, в результате которых в тканевых компонентах суставов возникают изменения, аналогичные таковым при остеоартрозе у человека [11]. Существует множество методик, позволяющих получить дегенеративные изменения в суставном хряще. Известны способы экспериментального моделирования остеоартроза (ОА) путем воздействия на сустав различных факторов: химических (стероидных препаратов, дексаметазона, папаина и др.); физических (воздействие жидким

азотом); механических (компрессия, иммобилизация сустава) и травматических (дырчатый дефект, рассечение передней крестовидной связки, удаление части мениска и др.) [4, 11]. Выбор того или иного метода зависит от цели исследования. По своей природе остеоартроз – заболевание полиэтиологическое. Ведущая роль в патогенезе ОА принадлежит нарушениям трофики суставного хряща. Гиалиновый хрящ аваскулярен, характеризуется диффузионным типом питания и имеет два источника кровоснабжения: первый – капилляры синовиальной оболочки, второй – капилляры субхондральной кости. Особенностью хрящевой ткани является то, что в ней относительно мало клеток, ко-

торые окружены большим количеством межклеточного матрикса. Хондроциты участвуют в регуляции синтеза и деградации компонентов хрящевого матрикса, эти процессы в норме находятся в сбалансированном состоянии. Обладая интенсивной метаболической активностью, хондроциты чрезвычайно чувствительны к нарушению кровоснабжения сустава [6, 14, 14]. В настоящее время развитие дегенеративно-дистрофических процессов при гонартрозе связывают с нарушением функции сустава и микроциркуляции в суставных концах с последующим развитием застойных явлений [7, 13].

В связи с этим, имеется необходимость совершенствования существующих, а также разработки новых методик экспериментального моделирования деструктивно-дегенеративных изменений, где имелась бы возможность исключения фактора, вызвавшего это заболевание у данной модели, суставы животного были достаточного размера, и имелось максимальное сходство гистологической характеристики тканевых компонентов сустава животного с таковыми характеристиками сустава человека [11].

Цель – с учётом значимости изменений кровоснабжения, статической нагрузки и иммобилизации в патогенезе остеоартроза разработать модель дегенеративно-дистрофических изменений в эпифизах костей коленного сустава собак и оценить морфофункциональное состояние зон суставного хряща и субхондральной кости.

Материалы и методы

Экспериментальное моделирование остеоартроза проводили на взрослых беспородных собаках (n=9) обоего пола, массой 12-15 кг, в возрасте 3-5 лет. Животные получены от населения г. Курга-

на. Содержание собак, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 №755) [9]. Собак содержали в условиях вивария в отдельных вольерах, обеспечивали соответствующим полноценным готовым рационом с учетом двигательной активности и питательного состава кормов. Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом.

Оперативные вмешательства проводили в условиях операционной, одновременно на обоих коленных суставах экспериментальных животных [7]. После обработки операционного поля, с медиальной поверхности бедра через прямолинейный разрез мягких тканей выделяли бедренную артерию на уровне средней части бедренной кости, лигировали в двух местах и пересекали между лигатурами. Операционную рану ушивали послойно. После этого коленный сустав иммобилизовали аппаратом Илизарова, состоящим из двух дугообразных опор, соединенных шарнирными узлами с резьбовыми хвостовиками. Одна из опор располагалась в нижней трети бедра, другая – в верхней трети голени. В качестве костных фиксаторов использовали спицы Киршнера, по три на каждой опоре. Животных выводили из опыта через 28 суток после окончания иммобилизации.

Рентгенографические исследования проводили на аппарате АРД-2 в двух стандартных взаимно перпендикулярных проекциях (прямой и боковой).

Суставные поверхности оценивали макроскопически (форма, контур, цвет). Для светооптического исследования при-

меняли целлоидиновые срезы мышечков бедра, окрашенные гематоксилином и эозином.

По данным ряда авторов [2, 8], суставной хрящ мышечков бедра является одной из наиболее часто страдающих зон. Учитывая эти данные, в качестве объекта для гистоморфометрического анализа как репрезентативный участок выбран суставной хрящ наружного мышечка бедра. Исследование проведено по перпендикулярным суставной поверхности эпоксидным полутонким срезам большой площади (6-8 мм²), окрашенным метиленовым синим-основным фуксином. Изображения микропрепаратов оцифровывали на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф» (Москва) и анализировали в программе «Видео-Тест-Мастер-Морфология». В качестве контроля исследовали суставной хрящ интактных собак (n=5).

Рельеф суставной поверхности изучали в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) «JSM-840» (Jeol, Япония).

Содержание серы – маркера суль-

фатированных гликозаминогликанов определяли с помощью рентгеновского электронно-зондового микроанализатора «INKA Energy 200» (Oxford Instrumets Analytical, Англия), смонтированного на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840».

Анализ цифрового материала был проведен методами описательной статистики. Достоверность различий в зависимости от характера распределения и объема выборок оценивали по критерию Стьюдента и критерию Вилкоксона для независимых выборок с помощью программы AtteStat, версия 1.0 [3] в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Результаты и их обсуждение

На момент снятия аппарата (28 суток иммобилизации) клинически у животных наблюдалась разгибательная контрактура коленного сустава в пределах 45 градусов. На рентгенограммах определяли сужение суставной щели, остеопороз дистального метафиза бедра, очаговый остеосклероз субхондральной зоны (рис. 1).

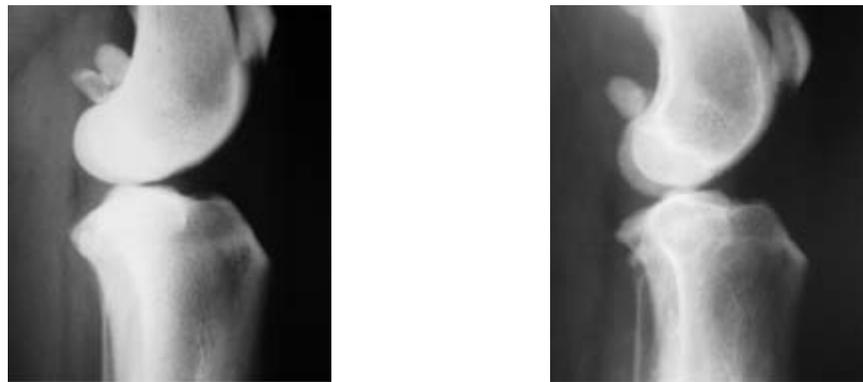


Рис. 1. Рентгенограммы коленного сустава, боковая проекция. А – до моделирования артроза; Б – после создания модели деформирующего остеоартроза.

Макроскопически суставной хрящ был истончен, неоднородного цвета, с фиолетовыми, красноватыми и синюшными пятнами, глянец отсутствовал (рис. 2Б).

При исследовании суставной поверхности в СЭМ выявлены очаги разволокнения, вскрытые клеточные лакуны (рис. 3А), в части наблюдений поверхностная зона отсутствовала, определялись

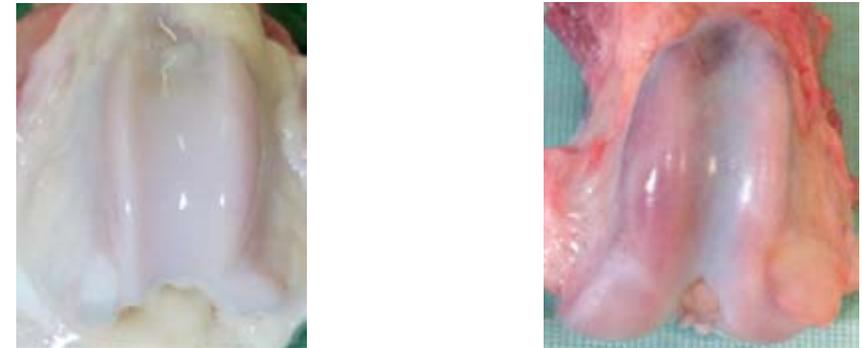


Рис. 2. Мышечки бедренной кости: А – интактный сустав, Б – после моделирования остеоартроза.

вскрытые лакуны изогенных групп промежуточной зоны. На полутонких срезах выявлено нарушение гомогенности межклеточного вещества поверхностной зоны со снижением интенсивности его окраски. В очагах разволокнения хондроциты были аномальной формы с пикнотичными ядрами (рис. 3Б).

Во всех зонах хряща резко редуцировано количество клеток. В промежуточ-

ной зоне хрящевые клетки располагались одиночно, изогенные группы отмечены единично, входящие в их состав клетки находились на разных стадиях дегенерации. Основная масса хондроцитов этой зоны находилась в неактивном состоянии или в состоянии гибели и деструкции (рис. 4).

В глубокой зоне часть хондроцитов была гипертрофированна, в них более

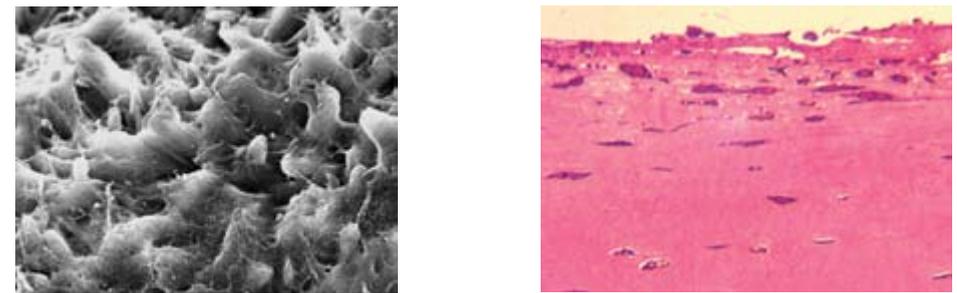


Рис. 3. а – суставная поверхность. СЭМ. Увеличение x 400. Б – поверхностная зона. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об.40, ок. 12,5.



Рис. 4. Хондроциты промежуточной зоны (монтаж). Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об.100МИ, ок. 12,5.

50% профиля цитоплазмы было занято крупными скоплениями секреторных гранул и липидными включениями. Выявлено большое количество клеток с признаками дегенерации, пустые клеточные лакуны, лакуны с некротизированными клетками, клеточным детритом. Базофильная линия была неравномерно окрашена, расслоена. В субхондральной зоне выявлен очаговый остеосклероз, наблюдалась агрегация эритроцитов и «предтромбоз» кровеносных сосудов микроциркуляторного русла (рис. 5А). В одних участках на границе с кальцифицированным хрящом наблюдалась активация остеобластов, которые имели интенсивно базофильную цитоплазму (рис. 5Б). В других – отмечены признаки угнетения активности остеобластов, пре-

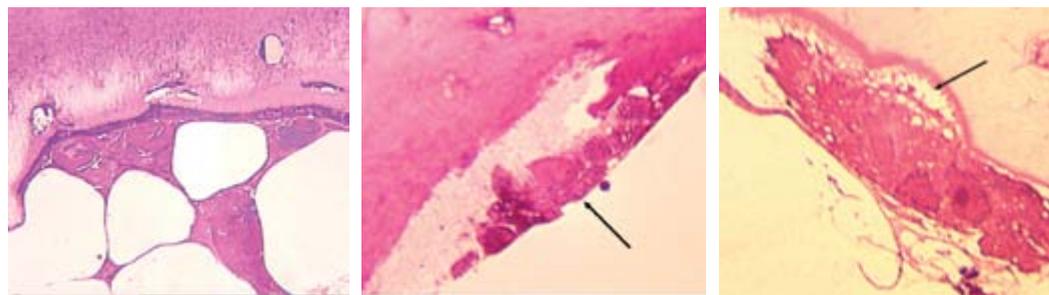


Рис. 5. Граница кальцифицированного хряща и субхондральной зоны. Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим-основным фуксином. А – стаз микрососудов субхондральной зоны. Об.40, ок. 12,5. Б – активированные остеобласты на границе с кальцифицированным хрящом (стрелка). Об.40, ок. 12,5. В – остеокласт, резорбирующий основное вещество костной трабекулы. Резорбционная лакуна Хаушипа (стрелка). Об.100МИ, ок. 12,5.

обладания явлений остеокластической резорбции костной ткани (рис. 5В).

Морфометрически выявлено достоверное ($p < 0,001$) уменьшение толщины хряща. Обнаружено достоверное ($p < 0,05$) снижение численной плотности клеток, объемная плотность хондроцитов почти в 2 раза была ниже нормы. Значительно увеличена доля пустых лакун и изогенных групп в общем объеме выборки (табл.).

С помощью электронно-зондового микроанализа при моделировании ОА обнаружено снижение концентрации серы по сравнению с контролем: в поверхностной зоне в 1,8 раза, промежуточной – в 1,4 раза и глубокой – в 1,7 раза (табл.).

В результате проведенного исследования нам удалось детально проследить морфологическую картину формирования экспериментально созданного деструктивно-дистрофического процесса в коленном суставе у собак. Общеизвестно, что зоны гиалинового хряща коленного сустава собаки и человека сходны по расположению и строению, что важно при экстраполяции экспериментальных данных [5]. При данных условиях экспе-

Количественные характеристики суставного хряща мышелков бедра

Параметры	h (мкм, М±m)	NA _{хц} (М±m)	NA _{пуст.лак} (%)	NAиз. гр (%)	VV _{хц} (% М±m)	ωS (вес.%)
Контроль	475,5±1,34	6,2±0,56	13,6	14,5	9,03±0,46	1,26±0,02
Модель ОА	318,6±2,71	5,3±0,3	43,4	23,8	4,60±0,36	0,70±0,02

Примечание: При определении достоверности различий для параметра h_{хр} использовали критерий Стьюдента ($p < 0,001$), для VV_{хц}, NA_{хц} и ωS – критерий Вилкоксона ($p < 0,05$). Жирным шрифтом выделены достоверные отличия от контроля.

римента выявленные морфологические изменения суставного хряща – разволокнение суставной поверхности, гибель и деструкция основной части хондроцитов, неравномерное окрашивание межклеточного матрикса – соответствуют начальным стадиям остеоартроза (степень 1-3 по гистологической классификации Международного общества изучения остеоартроза OARSI, 2006) [15].

В субхондральной кости отмечен очаговый остеосклероз, в эпифизе – признаки иммобилизационного остеопороза. Рядом клинических исследований подтверждено, что при остеоартрозе наблюдается увеличение скорости обеих составляющих ремоделирования костной ткани – резорбции и костеобразования. Преобладание какого-либо процесса зависит от стадии заболевания [1].

Наблюдаемые изменения являются следствием нарушения обменных процессов (ремоделирования) суставного хряща, свидетельствующих о снижении синтеза и преобладании катаболических процессов. Выявлено снижение параметров – толщины хряща, объемной и численной плотности хондроцитов, содержания серы, значительно увеличена доля пустых лакун в общем объеме выборки. Известно, что при иммобилизации сустава происходит нарушение диффузионно-на-

грузочного механизма снабжения его трофическими и пластическими веществами, нарушение микроциркуляции всех тканей сустава [11]. Кроме того, в условиях эксперимента было предусмотрено создание гипоксии и ухудшение трофики субхондральной кости (пересечение бедренной артерии). Необходимо отметить, что в данных условиях эксперимента наиболее уязвимым оказались хондроциты промежуточной зоны, которые равноудалены от васкулярного и синовиального факторов питания (около 50% клеток в состоянии деструкции). Известно, что физиологическое самовосстановление структуры суставного хряща осуществляется механизмами интерстициального роста – благодаря постоянно поддерживающейся репродукции хондроцитов в промежуточной зоне [6].

Выводы

Полученные результаты оценки морфофункционального состояния суставного хряща и субхондральной кости показали, что разработанная экспериментальная модель позволяет получить гонартроз, патогенетически основное место в развитии которого занимает фактор изменений режима функциональных нагрузок и кровоснабжения сустава, определяющие диффузное питание хряща.

Разработанная в эксперименте модель дегенеративно-дистрофических изменений в эпифизах костей коленного сустава является патогенетически адекватной клинической картине болезни и может быть использована для изучения самопроизвольного заживления поврежденных тканей суставов, а также испытания средств профилактики и методов лечения гонартроза и остеопороза.

Список литературы

1. **Алексеева Л.И., Зайцева Е.М.** Субхондральная кость при гонартрозе: новые возможности терапии // РМЖ. 2004. Том 12. № 20. С. 1133-1136.
2. **Виноградова Е.В.** Механизмы деструкции и регенерации хряща коленного сустава при гонартрозе // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. № 2. С. 97-98.
3. **Гайдышев И.П.** Анализ и обработка данных: специальный справочник. – СПб.: Питер. 2001. 752 с.
4. **Давыдов В.Б.** Методы экспериментального моделирования гонартрозов у мелких экспериментальных животных. 2008. http://www.alvest.ru/articles/articles/oa_expirim.php
5. **Дервянко И.В.** Морфофункциональная характеристика гиалинового хряща коленного сустава в норме и при хондропластике его экспериментальных повреждений. Автореф. дис... канд. мед. наук. Волгоград. 2004. 16 с.
6. **Мажуга П.М.** Источники трофики и структурного самовосполнения суставного хряща // Морфология. 1999. № 1. С. 43-50.
7. **Макушин В.Д., Степанов М.А., Ступина Т.А.** Способ моделирования остеопороза коленного сустава // Приоритет №2011104885006896, от 09.02.2011.

8. **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.

9. **Маланин Д.А., Писарев В.Б., Черезов Л.Л., Шилов В.Г., Шауки Мохамед А.М.** Пластика полнослойных дефектов покровного хряща коленного сустава цилиндрическими костно-хрящевыми ауто- и аллотрансплантатами малого размера (экспериментальное исследование) // Вестник травматологии и ортопедии. 2000. № 2. С. 16-21.

10. Медицинская диссертация: руководство / авт.-сост. С.А. Трущелев; под ред. акад. РАМН проф. И.Н. Денисова – М.: ГЭОТАР Медиа. 2008. 368 с.

11. **Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Шерено К.М., Карпов И.Н., Семенова Л.А., Курьяков А.П.** Морфология тканевых компонентов тазобедренного сустава у экспериментальных животных при моделировании гонартроза // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2006. N 1. С. 57-63.

12. **Стецула В.И., Веклич В.В.** Основы управляемого чрескостного остеосинтеза. - М.: Медицина. 2003. 224 с.

13. **Цурко В.В.** Гонартроз: проблема гериатрии. - М.: Ньюдиамед. 2004. 136 с.

14. **Gilmore Ruth S.C., Palfrey A.J.** Chondrocyte distribution in the cartilage of human femoral condyles // J. Anat. 1988. Vol. 157. P. 23-31.

15. **Mohr W.** On the morphology of normal joint cartilage // J. Clin. Chem and Clin. Biochem. 1986. Vol. 24. P. 915-918.

16. **Pritzker K.P.H., Gay S., Jimenez S.A., Ostergaard K., Pelletier J.P., Revell P.A., Salter D., Path F.R.C., Berg W.B.** Osteoarthritis cartilage histopathology:

grading and staging // Osteoarthritis and Cartilage. 2006. Vol.14. P. 13-29.

Experimental modeling of the knee osteoarthrosis in dogs

V.D. Makushin, M.A. Stepanov, T.A. Stupina

The results of experimental modeling canine osteoarthrosis by the knee immobilization with the femoral artery transection are presented in the work. The results of the assessment of the articular cartilage morphofunctional state evidence the development of degenerative-and-dystrophic changes manifested as the death and destruction of a part of chondrocytes, the disorder of extracellular matrix homogeneity and the decrease of the parameters evaluated by morphometry – cartilage thickness, volumetric and numerical density of chondrocytes. The changes marked appear to be a consequence of metabolic process disorders in the articular cartilage evidencing the decrease of synthesis and the predominance of catabolic processes. Under these experimental conditions the intermediate zone chondrocytes equidistant from the vascular and synovial supply factors turned out to be the most vulnerable ones.

Key words: articular cartilage, osteoarthrosis modeling, morphology, morphometry.