

УДК [611.018.3:612.751.2:616.72-018.3-007.16]-092.9

ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСТАВНОГО ХРЯЩА МЫШЕЛКОВ БЕДРА СОБАК ПРИ ИНВОЛЮТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ

Ступина Т.А.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»
им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган, e-mail: StupinaSTA@mail.ru

Методами гистоморфометрии и электронно-зондового микроанализа изучен суставной хрящ мышелков бедра беспородных собак в возрасте 2-х, 5-ти и 8-ми лет. Выраженные признаки инволютивных преобразований, выявленные в 5 лет, включали минимальные показатели содержания серы, численной и объёмной плотности хондроцитов, значительно увеличены доля пустых лакун, доля изогенных групп, содержание кальция. В период от 5 до 8 лет в хряще развиваются компенсаторно-приспособительные изменения, препятствующие дальнейшему старению.

Ключевые слова: собака, суставной хрящ, инволютивные изменения, гистоморфометрия

HISTOMORPHOMETRIC AND METABOLIC CHARACTERISTICS OF THE ARTICULAR CARTILAGE OF CANINE FEMORAL CONDYLES FOR INVOLUTIONAL CHANGES

Stupina T.A.

FSBI «Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics»
of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: StupinaSTA@mail.ru

The articular cartilage of femoral condyles has been studied in mongrel dogs at the age of two, five, and eight years using the methods of histomorphometry and electron probe microanalysis. The marked signs of involutional reorganization revealed at the age of five years included the minimum values of sulfur content, those of numerical and volumetric density of chondrocytes, the proportion of empty lacunae was substantially increased, as well as the proportion of isogenic groups, calcium content. The compensatory-and-adaptive changes preventing further aging developed in the cartilage within the period from five to eight years.

Keywords: dog, articular cartilage, involution changes, histomorphometry

При изучении общебиологических закономерностей репаративного хондрогенеза многие авторы в качестве экспериментальной модели используют коленный сустав собаки [3, 6]. Доказано, что зоны гиалинового хряща коленного сустава собаки по расположению и строению аналогичны гиалиновому хрящу человека [3], что важно при экстраполяции экспериментальных данных в клинику. Для определения степени отклонения гистоморфометрических характеристик суставного хряща от нормы возникает необходимость сравнения с аналогичными параметрами суставного хряща интактных животных. Кроме того, необходимы дополнительные знания об особенностях суставного хряща собак при инволютивных изменениях. Так, несмотря на значительные успехи в распознавании патогенеза дегенеративно-дистрофических процессов в суставе, нет единого мнения о пусковых механизмах и степени структурных перестроек его компонентов при инволютивных изменениях [8, 9].

Цель – изучить гистоморфометрические и метаболические характеристики суставного хряща мышелков бедра собак при инволютивных изменениях.

Материалы

и методы исследования

Объект исследования – суставной хрящ мышелков бедра 11 собак в возрасте 2-х, 5-ти и 8-ми лет. Содержание и эвтаназию животных проводили в соответствии с требованиями Министратства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник и принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986). Для светооптического исследования применяли парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, по Массону, для гистоморфометрии – серийные полутонкие срезы увеличенной (4 – 8 мм²) площади [5], окрашенные метиленовым синим и/или метиленовым синим-основным фуксином. Изображения микропрепаратов оцифровывали на АПК «ДиаМорф» (Москва) и анализировали в программе «ВидеоТест-Мастер-Морфология». Измерения проводили в микрометрах после предварительной геометрической калибровки по оцифрованной с тем же увеличением шкале объект-микрометра. Измеряли толщину (h, мкм), рассчитывали объёмную плотность хондроцитов (VVch, %) в ткани, численную плотность хондроцитов (N_{Ach}), долю (%) пустых лакун (NN_{em.lac.}) и изогенных групп (NN_{is.gt.}) в общем объёме выборки. При цито- и кариометрии в поверхностной, промежуточной и глубокой зонах хряща определяли площадь хондроцитов (Sch, мкм²) и их ядер (Sn, мкм²), объёмную плотность ядер (VV_n, в долях единицы) и цитоплазмы (VV_c, в долях единицы), рассчитывали ядерно-цитоплазматический индекс (NCI). Для анализа данных использовали опи-

сательную статистику. В зависимости от объема выборки и характера распределения достоверность различий оценивали с помощью критериев Стьюдента или Вилкоксона в программе AtteStat, версия 1.0 [1] в электронных таблицах Microsoft Excel 2007. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

С помощью рентгеновского электронно-зондового микроанализатора «INCA Energy 200» (Oxford Instrumets Analytical, Англия), смонтированного на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840» (Jeol, Япония) в суставном хряще определяли концентрацию серы (ωS , вес.%) и кальция (ωCa , вес.%).

Результаты исследования и их обсуждение

В 2 года в суставном хряще четко определялось зональное строение, базофильная линия непрерывная на всем протяжении. Все зоны хряща имели обычное строение,

их гистоморфометрическая характеристика приведена нами в работе [4].

При исследовании суставного хряща животных 5 лет выявлено его истончение, разволокнение, нарушена гомогенность межклеточного вещества, отмечена демаскировка коллагеновых волокон (рис. 1А). В промежуточной зоне основная часть хондроцитов находилась в состоянии деструкции (рис. 1Б). В глубокой зоне отсутствовало колончатое расположение клеток. В части наблюдений выявлено нарушение целостности базофильной линии, проникновение сосудов в хрящ (рис. 1В). При окраске метиленовым синим метакромазия имела очаговый характер. По данным Pilin A. et al. (2007), изменение в окраске тканей может быть маркером определенного возраста и развивающихся дистрофических изменений [10].

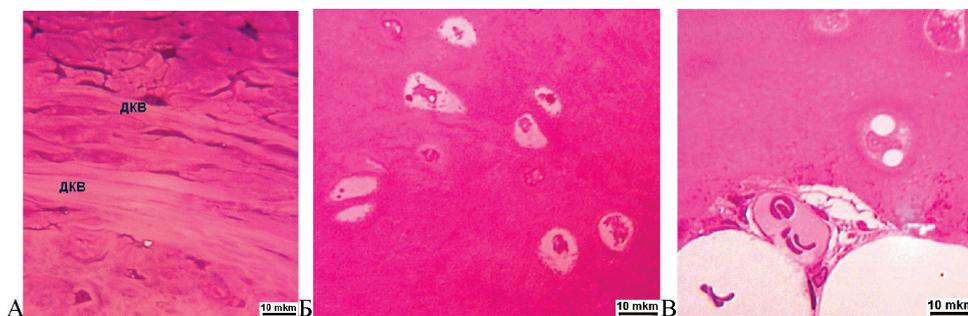


Рис. 1. Суставной хрящ собаки в возрасте 5 лет. Полутолстый срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. – 40; ок. – 12,5х.

А – поверхностная зона, нарушена гомогенность межклеточного вещества, демаскировка коллагеновых волокон (ДКВ). Б – промежуточная, В – глубокая зона

В суставном хряще собак в возрасте 8-ми лет, как и в предыдущем возрастном периоде, сохранялись очаги разволокнения. На границе поверхностной и промежуточной зон наблюдалось достаточно высокое содержание хондроцитов, характеризующихся как биосинтетически активные. Такие клетки имели светлые гомогенные ядра и базофильную цитоплазму (рис. 2А). В более глубоких

слоях промежуточной и в глубокой зоне отмечены дезинтегрированные хондроциты, а также накопившиеся липиды (рис. 2Б). Наблюдалось нарушение четкости контуров базофильной линии, ее фрагментация. В зоне кальцифицированного хряща выявлены активированные остеокласты, отмечены участки, в которых кальцифицированный хрящ истончен, либо замещался костью (рис. 2В).

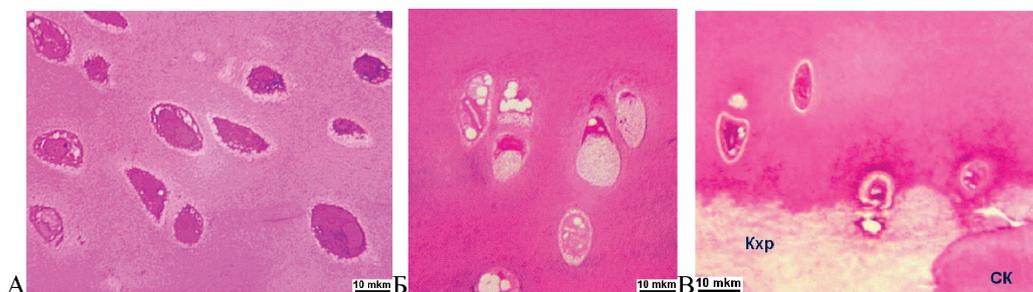


Рис. 2. Суставной хрящ собаки в возрасте 8 лет. Полутолстый срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об. – 40; ок. – 12,5х.

А – граница поверхностной и промежуточной зон, Б – хондроциты глубокой зоны, В – граница кальцифицированного хряща (КХр) и субхондральной кости (СК)

При гистоморфометрическом анализе суставного хряща выявлено снижение его толщины с возрастом. По сравнению с предыдущим возрастом в 5 лет отмечено сни-

жение объемной и численной плотности хондроцитов. В 8 лет объемная и численная плотность хондроцитов вновь увеличивалась (табл. 1).

Таблица 1

Количественные характеристики суставного хряща собак в разные возрастные периоды

Параметры	VV _{ch} (%, M±σ)	NA _{ch} (M±σ)	NN _{em.lac.} (%)	NN _{is.gr.} (%)	h хряща (мкм, M±m)
2 года	9,03±4,54	6,15±2,45	13,6	14,51	475,55±1,31
5 лет	4,68±1,36	4,37±1,62	38,8	24,65	463,87±1,61
8 лет	8,61±2,75	10,42±4,53	28,18	16,45	449,12±3,51

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные различия с предыдущим возрастным периодом.

Анализ количественных характеристик на клеточном уровне в поверхностной зоне выявил по сравнению с 2 летним возрастом увеличение площади клеток в 5 лет с последующим снижением к 8 годам, относительно предыдущего возрастного периода. В 5 и 8 лет отмечено снижение ядерно-цитоплазматического индекса, в связи с более значительным ростом объемной плотности

цитоплазмы (табл. 2). В промежуточной зоне в 5 лет отмечено снижение площади клеток и увеличение объемной плотности ядер и ядерно-цитоплазматического индекса (табл. 2). Присутствие таких клеток может являться отражением деструктивных изменений, апоптоза, либо дедифференцировки клеток и восстановления их пролиферативных потенциалов.

Таблица 2

Количественные характеристики хондроцитов суставного хряща собак в разные возрастные периоды (M±σ)

Возраст	2 года	5 лет	8 лет
Поверхностная зона			
V _v _n	0,42±0,09	0,23±0,10	0,30±0,03
V _v _c	0,58±0,10	0,77±0,10	0,69±0,14
NCI	0,75±0,22	0,34±0,15	0,55±0,14
S _{ch}	45,35±8,16	56,11±12,92	52,2±12,39
S _n	11,43±3,12	13,21±3,26	15,85±1,43
Промежуточная зона			
V _v _n	0,21±0,03	0,24±0,06	0,19±0,04
V _v _c	0,79±0,03	0,76±0,04	0,81±0,08
NCI	0,27±0,08	0,33±0,12	0,23±0,01
S _{ch}	119,9±16,08	80,64±15,73	111,34±16,26
S _n	13,54±3,63	18,74±4,89	21,56±2,69
Глубокая зона			
V _v _n	0,19±0,04	0,13±0,06	0,12±0,08
V _v _c	0,81±0,06	0,87±0,07	0,87±0,09
NCI	0,25±0,09	0,16±0,07	0,15±0,04
S _{ch}	129,31±19,24	136,9±143,91	141,53±19,72
S _n	15,22±5,57	18,01±5,96	18,2±3,33

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные различия с предыдущим возрастным периодом.

Известно, что дедифференцировка, как реактивно-приспособительное изменение клеток, сопровождается увеличением относительных объемов ядер [2]. В этом возрасте отмечено повышение численной плотности пустых лакун и изогенных групп

по сравнению с предыдущим возрастным периодом (табл. 1). В 8 лет, относительно возраста 2 лет сохранялись сниженные значения площади хондроцитов и объемной плотности их ядер и ядерно-цитоплазматического индекса (табл. 2). В глубокой зоне

выявлено увеличение площади хондроцитов и уменьшение объемной плотности их ядер и ядерно-цитоплазматического индекса с возрастом животного (табл. 2).

Методом электронно-зондового микроанализа обнаружено неравномерное распределение серы по зонам суставного хряща во всех возрастных периодах: наибольшее содержание серы было выявлено в глубокой зоне, наименьшее – в поверхностной. В 5 лет концентрация

серы снижалась относительно предыдущего возрастного периода, что свидетельствовало о снижении в матриксе хряща сульфатированных гликозаминогликанов, в 8 лет ωS вновь увеличивалась (табл. 3).

По литературным данным, у людей при старении в хрящевой ткани снижается гидратация фибрилл матрикса, одновременно увеличивается содержание сГАГ и изменяется их состав [7].

Таблица 3

Изменение содержание серы (вес.%) в суставном хряще с возрастом

Возраст	ωS (M \pm m) в вес.%			
	Поверхностная зона	Промежуточная зона	Глубокая зона	Во всех зонах
2 года	0,35 \pm 0,01	0,4 \pm 0,04	0,52 \pm 0,02	1,26 \pm 0,02
5 лет	0,20\pm0,02	0,35\pm0,04	0,37\pm0,02	0,92\pm0,03
8 лет	0,33\pm0,03	0,52\pm0,01	0,63\pm0,04	1,43\pm0,03

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные различия с предыдущим возрастным периодом.

С возрастом отмечено накопление кальция в некальцифицированном и кальцифицированном

хряще. Максимальные значения концентрации кальция зарегистрированы в 8 лет (табл. 4).

Таблица 4

Изменение содержание кальция (вес.%) в суставном хряще с возрастом

Возраст	ωCa (M \pm m) в вес.% в гиалиновом хряще	ωCa (M \pm m) в вес.% в зоне кальцифицированного хряща
1,5-2 года	0,15 \pm 0,02	20,22 \pm 0,34
5 лет	0,27\pm0,03	26,16\pm3,04
8 лет	0,41\pm0,08	29,51\pm7,52

Примечание. Жирным шрифтом выделены достоверные различия с предыдущим возрастным периодом.

Заключение. При исследовании суставного хряща мышечков бедра собак в возрасте 2-х лет четко определялось зональное строение, суставная поверхность не разволокнена, целостность базофильной линии не нарушена. Морфологическая организация суставного хряща мышечков бедра собак в возрасте 5-ти и 8-ми лет свидетельствовала о наличии деструктивно-дегенеративных процессов выраженных во всех зонах хряща, но интенсивнее в глубокой зоне. К инволютивным изменениям можно отнести нарушение гомогенности межклеточного вещества поверхностной зоны, изменение окраски межклеточного вещества (снижение интенсивности, очаговое окрашивание), отсутствие колончатого расположения клеток в глубокой зоне, нарушения базофильной линии и проникновение сосудов в хрящ. Выраженные признаки инволютивных преобразований, выявлен-

ные в 5 лет постнатальной жизни собак, включали минимальные показатели содержания серы, численной и объемной плотности хондроцитов, значительно увеличены доля пустых лакун, доля изогенных групп, содержание кальция. В возрасте 8 лет по сравнению с другими возрастными периодами площадь хондроцитов промежуточной и глубокой зон достигала максимума, по сравнению с двухлетним возрастом на 13,5% было увеличено содержание серы, но и содержание кальция увеличивалось. Возможно, в период от 5 до 8 лет в хряще развиваются компенсаторно-приспособительные изменения, препятствующие дальнейшему старению, зарегистрировано повышение значений доли изогенных групп в общем объеме выборки. Полученные гистоморфометрические характеристики суставного хряща могут быть использованы при дифференциальной диагностике воз-

растных инволютивных изменений, при изучении деструктивно-репаративных изменений при моделировании и лечении суставной патологии в эксперименте.

Список литературы

1. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. – СПб.: Питер, 2001. – 752 с.
2. Данилов Р.К., Боровая Т.Г., Клочков Н.Д. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей // Морфология. – 2000. – №4 – С. 7-16.
3. Деревянко 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.
4. Ступина Т.А., Щудло М.М. Гистоморфометрические характеристики интактного суставного хряща наружного мыщелка бедра собак // Морфологические ведомости. – 2008. – № 1-2. – С. 104-107.
5. Ступина Т.А., Щудло М.М. Способ количественной оценки состояния суставного хряща на разных уровнях

структурной организации // Гений ортопедии. – 2009. – №1. – С. 55-57.

6. Fink B., Schwinger G., Singer J., Sager M., Wilke C., Braunstein S. The effect of tibial lengthening using the Ilizarov method on the cartilage and the menisci of the knee joint // J Orthop Res. – 2001 – Jul;19(4). – P. 665-670.
7. Maroudas A., Bayliss M., Venn M.F. Further studies on the composition of human femoral head cartilage // Ann. Rheum. Dis. – 1980. – Vol. 39. №5. – P. 514-523.
8. Martin J.A., Buckwalter J.A. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair // Bone Joint Surg. Am. – 2003. – Vol. 85. №2. – P. 106-110.
9. Mrosek E.H., Lahm A., Erggelet C., Uhl M., Kurz H., Eissner B., Schagemann J.C. Subchondral bone trauma causes cartilage matrix degeneration: an immunohistochemical analysis in a canine model // Osteoarthritis Cartilage. – 2006. – Feb;14(2). – P. 171-8.
10. Pilin A., Pudil F., Bencko V. Changes in colour of different human tissues as a marker of age // Int J Legal Med. – 2007. – Vol.121. N 2. – P. 58-162.