

**РЕЗУЛЬТАТЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОСТНО-ХРЯЩЕВЫХ
ФРАГМЕНТОВ МЕДИАЛЬНОГО МЫШЦЕЛКА БЕДРЕННОЙ КОСТИ ОВЦЫ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ.**

Оригинальное исследование.

Чуков Сергей Залимович

доктор медицинских наук, профессор
Ставропольский Государственный Медицинский Университет
г. Ставрополь

Хуртуев Алим Жагафарович

заочный аспирант
Ставропольский Государственный Медицинский Университет
г. Ставрополь

Айрапетов Георгий Александрович

кандидат медицинских наук, доцент
Ставропольский Государственный Медицинский Университет
г. Ставрополь

**THE RESULTS OF A MORPHOLOGICAL STUDY OF BONE-CARTILAGE FRAGMENTS OF THE
MEDIAL CONDYLE OF THE FEMUR OF A SHEEP DURING EXPERIMENTAL MODELING OF
TRAUMATIC INJURY.**

Original study.

Chukov Sergey Zalimovich

Doctor of Medical Sciences, Professor
Stavropol State Medical University
Stavropol

Hurtuev Alim Zhagafarovich

correspondence graduate student
Stavropol State Medical University
Stavropol

Ayrapetov Georgy Aleksandrovich

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor
Stavropol State Medical University
Stavropol

Аннотация

Исследование посвящено процессам репаративной регенерации суставного хряща, субхондральной костной пластинки и субхондральной кости при экспериментальном моделировании травматического повреждения компонентов коленного сустава овец романовской породы, качественной их оценке.

Abstract

The study is devoted to the processes of reparative regeneration of articular cartilage, subchondral bone plate and subchondral bone during experimental modeling of traumatic damage to the components of the knee joint of Romanov sheep, their qualitative assessment.

Ключевые слова: репаративная регенерация, хрящ, дифференцировка, регенеративная медицина.

Key words: reparative regeneration, cartilage, differentiation, regenerative medicine.

Список сокращений СхКП – субхондральная костная пластинка КП – костная пластинка ГХ – гиалиновый хрящ

КХД – костно-хрящевой дефект СХ – суставной хрящ ХТ – хрящевая ткань КБ – костная балка

ГСХ – гиалиновый суставной хрящ

МП – межбалочные пространства ММ – межклеточный матрикс БЛ – базофильная линия

ГвСТ – грубоволокнистая соединительная ткань ГК – губчатая кость СТ – соединительная ткань

ГпХТ – гиалиновоподобная хрящевая ткань ГК – губчатая кость СхК – субхондральная кость

Цель исследования: Получить модель дефекта в нагружаемой зоне коленного сустава у

экспериментального животного (овца), максимально соответствующего реальному при повреждениях и заболеваниях крупных суставов и дать морфологическую характеристику процессам репаративной регенерации суставного гиалинового хряща, субхондральной костной пластинки, субхондральной кости при экспериментальном повреждении медиального мыщелка бедренной кости овцы.

Введение: Деструктивно-дегенеративные изменения суставов имеют широкое распространение во всем мире [1, 2, 3]. Одной из наиболее часто встречающихся патологий является остеоартроз (деформирующий артроз, остеоартрит). Остеоартроз - это наиболее распространенное заболевание лиц пожилого

возраста. Основным проявлением этого заболевания является эрозия суставного хряща, которая развивается вследствие повреждения и резорбции внеклеточного матрикса, окружающего хондроциты. Распространенность остеоартроза в популяции [4, 5, 6] (6,43%) коррелирует с возрастом и достигает максимальных показателей (13,9%) у лиц старше 45 лет, он составляет до 55% среди всех нозологических форм патологии суставов. В период 1990-2020 [7, 8] годов ожидается удвоение числа пациентов, страдающих дегенеративно-дистрофическими заболеваниями суставов в возрастной группе старше 50 лет. Важна социальная роль этих заболеваний: они приводят к потере трудоспособности и инвалидности, в основном из-за ограничения объема движений в суставах, у 20-30% заболевших. Одной из часто встречающихся причин развития подобных изменений является травма.

Материалы и методы: В работе использовали экспериментальных животных — овцы романовской породы, в количестве 16 особей, в возрасте от 2 до 3 лет, весом от 20 до 35 кг. Выбор овец в качестве экспериментальных животных для создания модели посттравматического остеоартроза обусловлен:

- определенным соответствием условий эксперимента и условий возможного возникновения остеоартроза у человека, т.е. отсутствие адекватной амортизации ударных нагрузок суставно-связочным аппаратом конечностей овец;

- приближенным к человеку анатомическим соотношением (вес - объем суставов) по сравнению с другими животными, что подтверждается рядом авторов [9].

- размер исследуемых образцов достаточен для проведения гистохимического анализа компонентов сустава.

- хондроциты поверхностного слоя хряща человека по своим свойствам очень близки хондроцитам хряща овцы [Павлова М.Н., 1979; Davies et al., 1962; Ghadially, Roy, 1969; Ruttner, Spycher, 1968; Silberberg, Hasler, 1968; Weiss et al., 1968; Zelander, 1959].

- Овцы не относятся к категории особей с высокоорганизованной центральной нервной системой (приматы, собаки, кошки, дельфины) и могут быть использованы в качестве экспериментальных животных на территории России [Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.].

- овцы хорошо переносят анестезиологическое пособие, хорошо адаптированы к климату средней полосы России, неприхотливы в пище.

Методика проведения оперативных вмешательств.

Из оборудования использовали: операционный стол с ремнями для фиксации животного, стерильные простыни для ограничения области операции, стандартный хирургический набор, дополненный специальным инструментарием (фрезы, мини-кюретки),

стерильный и нестерильный перевязочный материал. 12 – ти животным создавали дефект суставного хряща, СхКП, СхК диаметром 5мм на нагружаемой поверхности внутреннего мыщелка бедра.

Сформировали три экспериментальные группы по 4 особи, для трех исследуемых периода вывода животного из эксперимента через 1, 3, 6 месяцев. В последующем извлекали регенерировавший в разной степени КХД на соответствующую глубину, сустав промывали 0,9% р-ром NaCl и послойно ушивали с восстановлением поврежденных анатомических образований. Для анестезии использовали внутривенный кетаминный наркоз. Из наркоза овцы выходили через 30 минут после операции, а на следующий день стояли и осторожно ходили, слегка приступая на оперированную ногу. Послеоперационный период протекал без осложнений, раны заживали первичным натяжением.

Содержание и поведение овец после оперативного вмешательства. Овец содержали в условиях вольера Ставропольского государственного аграрного университета. Всех овец обеспечивали соответствующим полноценным питанием с учетом времени года, двигательной активности и питательного состава кормов. Выдерживался режим дозированной двигательной активности — в течение нескольких часов в природных условиях. Животные вели себя естественно без выраженных признаков дискомфорта - ходили, прихрамывая на оперированную ногу, при этом на другую заднюю конечность, приходилась большая нагрузка. В последующие месяцы хромота уменьшилась.

Данные вывода образцов из эксперимента. Животные выводились из эксперимента живым путем выполнения артротомии и забора костно-хрящевого блока для морфологического исследования.

Выделенные костно-хрящевые фрагменты исследовали визуально, оценивая характер краёв дефекта суставного хряща, состояние его кровенаполнения, глубину дефекта, степень закрытия дефекта формирующимся фиброзно-хрящевым слоем. Область дефекта СГХ, СхКП, СхК изучали морфологическими методами с использованием световой микроскопии.

Для гистологического исследования материал фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином в течении 48 часов, затем костную ткань декальцинировали в растворе 12% азотной кислоты, обезжировали в спиртах возрастающей концентрации с

последующей заливкой в парафиновую среду "Histomix". Полученные парафиновые блоки резали на ротационном микротоме (LEICA RM 2125 RTS) с получением срезов толщиной 2-4 мкм; для оценки общепатологических изменений окрашивали срезы гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по Ван Гизону.

Изучение материала проводили в световом микроскопе CARL ZEISS AXIO LAB 1 с цифровой фотокамерой AxioCam ERc5s (сенсор 1/2.5; разрешение 5 Мп) и блоком захвата, с использованием объективов x4, x10, x20, x40, x60.

Полнослойный дефект суставного хряща и субхондральной костной пластинки на нагружаемой части внутреннего мыщелка бедра. Вывод животного через один месяц после формирования дефекта.

Через месяц определяется дефект ткани, состоящий на 1/3-1/4 толщины сформированного дефекта с ровными гладкими краями, граница между новообразованной тканью и сохраненным ГСХ прослеживается четко.

Микроскопически на дне дефекта определяется тонкий, не сплошной слой новообразованного ГпСХ. По периферии дефекта ХТ значительно толще, нежели в дне, где толщина хряща составляет 1/3-1/4 толщины сформированного дефекта.

СхКП и частично КБ, прилежащие к дефекту не на всем протяжении дна дефекта сформированы, т.е. целостность СхКП восстановлена частично. Волокна СхКП утолщены, бесформенные, хаотично расположены, МВ в большом количестве, неомогенное, гиопоцеллюлярное.

Губчатая кость в дне сформированного дефекта с признаками выраженного остеогенеза – КБ широкие, гиперклеточные с фибробластическим морфологическим типом клеток, хаотично ориентированы, межбалочные пространства узкие. На поверхности КБ, окруженных новой СТ, и в МП видны отложения остеоида —неминерализованной КТ; кроме того, в МП тут же под дефектом определяется большое количество волокнистой СТ.

При микроскопическом исследовании области КХД в месте разрушенной в результате травматического повреждения СхКП выявлено её заполнение грануляционной тканью с большим количеством тонкостенных сосудов капиллярного типа, выстланных одним слоем уплощенного эпителия; сосуды заполнены незализованными эритроцитами, расположены в рыхлой волокнистой СТ с обширными очагами фибриноидных изменений, разволокнением коллагеновых структур, умеренной лимфо-плазмочитарной инфильтрацией.

Области хондрогенеза определялись между грануляционной тканью и губчатой костью как островки ГпХТ с малым количеством хондроцитов зрелого типа в виде лакун по 1-2 клетки, а также многочисленными клетками хондробластического фенотипа; неомогенный ММ выявлялся в большом количестве.

БЛ неомогенная, тонкая, определялась не на всем протяжении границы между новообразованным ГХ и губчатой костью.

Таким образом, при гистологическом исследовании **полнослойного дефекта суставного хряща и СхКП на нагружаемой части внутреннего мыщелка бедра** через 1 месяц после

формирования дефекта выявленные морфологические изменения представляли собой признаки неполной репаративной регенерации костной и ХТ, поэтому, дефект хряща сохраняется. Края хряща сглажены за счет уменьшения толщины хряща по краям дефекта. По краям сохранившегося хряща обнаруживаются бесклеточные участки, т.е., состоящие только из межклеточного матрикса. Область сочленения хрящей не может быть разделена на зоны, т.е. новообразованный ГпСХ несет в себе свойства незрелого.

Полнослойный дефект суставного хряща и субхондральной костной пластинки на нагружаемой части внутреннего мыщелка бедра. Вывод животного из эксперимента через три месяца после формирования дефекта.

Через три месяца после формирования дефекта обнаруживается дефект ткани, составляющий половину толщины оперативно сформированного дефекта с гладкими краями; между новообразованной тканью и сохраненным гиалиновым хрящем прослеживается четко, так как новообразованная ткань резко полнокровна.

Микроскопически на дне дефекта СХ определяется тонкий, не сплошной слой новообразованного ГХ. По периферии дефекта ХТ значительно большей толщины, нежели в ее дне, где толщина новообразованного хряща составляет 1/2 толщины сформированного дефекта.

Микроскопическое исследование выявило следующие изменения. КХД через три месяца после его формирования выполнен ГвСТ с большим количеством толстостенных сосудов, заполненных незализованными эритроцитами, коллагеновые структуры разволокнены.

Между ГвСТ и ГК определяется СхКП, восстановленная не на всем протяжении, неравномерной толщины и имеет извилистую форму, с искривлением, обращенным к костной ткани. Волокна КП умеренной толщины, бесформенные, хаотично расположены, однако местами прослеживается продольная их ориентация.

КБ умеренной толщины, умеренно клеточные; межбалочные пространства, сообщающиеся с зоной дефекта, заполнены волокнистой СТ, однако отмечается некоторая резорбция ее, по сравнению с предыдущим временным промежутком эксперимента. Соотношение остеообласты/остеокласты, и, соответственно, процессы остеогенеза-остеолизиса в описанном фрагменте, примерно одинаковое.

Новообразованная ГпХТ, занимающая 1/2 толщи сформированного дефекта, с умеренным количеством молодых хондроцитов, неомогенным обильным ММ, однако по периферии под ГвСТ, преимущественно по краям сформированного дефекта, выявляется гиперклеточная ГпХТ с малым количеством неомогенного ММ.

Краевая зона границы неповрежденного ГХ и новообразованного ГпХТ - гиперклеточная, с большим количеством лакун, в составе которых

определяются от 2 до 4 клеток с морфологией молодых хондроцитов.

Между описанными структурами определяется ГвСТ с продольным направлением волокон. БЛ негомогенная, тонкая прослеживается не на всем протяжении границы между новообразованным ГХ и ГК.

Таким образом, через 3 месяца после формирования полнослойного дефекта СГХ и СКП, последняя на всем своем протяжении восстановлена, имеет кривизну, обращенную в сторону СК. Однако, усредненная линия СКП соответствует анатомическим границам пластинки, находившейся в этом месте до моделирования повреждения.

Определяются признаки ремоделирования хрящевой ткани, которое выражается в формировании колонок-столбиков хондроцитами, "оживлении" поверхностного слоя (увеличение количества клеток), появление разрозненных групп хрящевых клеток. Описанные изменения свидетельствуют о частичном восстановлении СХ, не достигающем, однако, состояния зрелой ХТ.

Полнослойный дефект суставного хряща и субхондральной костной пластинки на нагружаемой части внутреннего мыщелка бедра. Вывод животного через шесть месяцев после формирования дефекта.

Через шесть месяцев после формирования дефекта все еще сохраняется углубление, составляющее 75% исходной глубины сформированного дефекта с ровными гладкими краями; граница между тканью в дне дефекта и прилежащим к нему интактным СХ прослеживается четко. Гистологически - в области повреждения СГХ образовался неоднородный слой ГпХТ, составляющего по толщине примерно 75% рядом лежащего интактного, в связи с чем здесь все еще сохраняется дефект с достаточно неровным дном, которая не разделялась на слои (поверхностный, промежуточный, глубокий). В центральном отделе дефекта определялась ГвСТ с выпячиванием в центре, состоящим из толстостенных сосудов и МВ.

В толще ГвХТ выявлялся гипоцеллюлярный матрикс, содержащий лакуны с хондроцитами зрелого типа по 2-5 клеток в каждой. При этом в части полей зрения в глубоких и средних отделах новообразованного хряща прослеживалась вертикальная столбчатость лакун, в то время как в поверхностных отделах хрящ состоял из отдельно лежащих лакун с единичными клетками в них среди умеренного количества ММ. На поверхности сформированного хряща и ГвСТ отмечалось формирование фиброзного слоя, - по всей видимости, представляющего собой формирующуюся "надхрящницу".

СхКП восстановлена на всем протяжении, за исключением области в центральном отделе дна сформированного дефекта; волокна ее утолщены, бесформенные, в большинстве своем расположены перпендикулярно, МВ в умеренном количестве, гомогенное.

Губчатая ткань под сформированным дефектом с признаками резорбции - большим количеством остеокластов, тонкими правильной балками, расширенными межбалочными пространствами, местами заполненными СТ, однако в наименьшей степени, нежели в предыдущем отсчетном периоде.

БЛ негомогенная, тонкая, определяется не на всем протяжении границы между новообразованным ГХ и ГК.

Таким образом, спустя 6 месяцев после повреждения в области СГХ и СхКП процесс регенерации ХТ кани носит незавершенный характер. В отдельных местах, преимущественно по периферии ранее сформированного дефекта, новообразованный ГпХ был покрыт фиброзным слоем, напоминавшим надхрящницу, сформированным из коллагеновых волокон с неопределенной ориентацией, преимущественно перпендикулярной суставной поверхности, и расположенными между ними удлинненными овальными и округлыми клеточными элементами. Вновьсформированный хрящ представляется возможным квалифицировать как гиалиновоподобный - прослеживается изогенность групп хондроцитов, гомогенный ММ - соответственно, новообразованный хрящ имеет смешанный вид - волокнисто-гиалиновый. Поэтому, остается заметной граница между интактным и новообразованным хрящом. Субхондральная костная пластинка и субхондральная губчатая кость уплотнены и утолщены и выступают в сторону поверхности. Очевидно, это является следствием гипертрофии СхК. Описанная тканевая реакция частично компенсирует неполноценность новообразованного хряща, поэтому, некоторое углубление в области повреждения выражено незначительно, что отражено на поверхностном рельефе.

Заключение:

Морфологические изменения в исследуемой области отражают регенерацию ГпХТ в очаге повреждения суставной поверхности. При этом, характер новообразованного хряща не восполнял в полной мере исходной структуры: не была восстановлена зональность хрящевой ткани в области суставной поверхности, не была достигнута полноценная замена очага повреждения новообразованным хрящом, сохранялась зона грубоволокнистой рубцовой ткани; аналогичные выводы приведены в работах Шевцова В.И. и др. [11], а также **Kinner et. all [12]**. В целом, РР в очаге повреждения СГХ и СхКП происходила по принципу субституции - неполной РР, при которой восстановление поврежденной структуры оказывается недостаточным (замена исходной ткани опорной тканью) и не соответствует анатомическим параметрам нормальной ткани. Подобный исход не способствует восстановлению функциональной активности поврежденного сустава в полном объеме, что влечет за собой неполную социальную адаптацию и требует

вмешательства в процесс заживления путем поиска методов стимуляции репаративной регенерации хрящевой ткани.

Литература/References

1. Скакун П.Г., Шалатонина О.И., Кандыбо И.В., Юзefович А.И. Клинико-физиологическая оценка эффективности реабилитации больных с остеоартрозом коленного сустава // Журнал ГрГМУ. 2010. №2. [Skakun P.G., Shalatonina O.I., Kandybo I.V., Juzefovich A.I. Kliniko-Fiziologicheskaja Ocenka Jeffektivnosti Reabilitacii Bol'nyh S Osteoartrozom Kolennogo Sustava // Zhurnal GrGMU. 2010. №2. (in Russ)].
2. Насонова В.А. Остеоартроз – проблема полиморбидности // Consilium medicum. 2009. №том 11, номер: 2. [NASONOVA V.A. OSTEOARTROZ – PROBLEMA POLIMORVIDNOSTI // CONSILIUM MEDICUM. 2009. №tom 11, nomer: 2. (in Russ)].
3. Алексеева Л.И. ФАКТОРЫ РИСКА ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ // НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕВМАТОЛОГИЯ. 2010. №2. [Aleksееva L.I. FAKTORY RISKА PRI OSTEOARTROZE // NAUCHNO-PRAKTICHESKAJA REVMATOLOGIJA. 2010. №2. (in Russ)].
4. Матвеев Р.П., Брагина С.В. Социальная характеристика амбулаторных Больных остеоартрозом коленного сустава // Экология человека. 2011. №4. [Matveev R.P., Bragina S.V. Social'naja harakteristika ambulatornyh Bol'nyh osteoartrozom kolennogo sustava // Jekologija cheloveka. 2011. №4. (in Russ)].
5. Матвеев Р. П., Брагина С. В. АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ ОСТЕОАРТРОЗА КОЛЕННОГО СУСТАВА С ПОЗИЦИИ ВРАЧА-ОРТОПЕДА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) // Вестник СПбГУ. 2014. №11. [Matveev R. P., Bragina S. V. AKTUAL'NOST' PROBLEMY OSTEOARTROZA KOLENNOGO SUSTAVA S POZICII VRACHA-ORTOPEDA (OBZOR LITERATURY) // Vestnik SPbGU. 2014. №11. (in Russ)].
6. Yuqing Zhang, Joanne M. Jordan Epidemiology of Osteoarthritis // Clin Geriatr Med.. 2010. №26(3). С. 355–369. doi: 10.1016/j.cger.2010.03.001
7. Wilder F.V., Barrett J.P., Farina E.J. Joint-specific prevalence of osteoarthritis of the hand // Osteoarthritis Cartilage. 2006. №14(9). С. 953-7
8. Kelli D. Allena, Yvonne M. Golightly. Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence // Curr Opin Rheumatol. . 2015. №27(3). С. 276-283. doi: 10.1097/BOR.000000000000161.
9. Smith MM, Little CB, Rodgers K, Ghosh P: Animal models used for the evaluation of anti-osteoarthritis drugs. Pathol Biol (Paris) 1997, 45:313-320.
10. Закон Российской Федерации "Федеральный закон от 27 декабря 2018 г. N 498-ФЗ "Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации"" от 19 декабря 2018 года № N 498 // Российская газета. 2018 г. № 295(7758). [Zakon Rossijskoj Federacii "Federal'nyj zakon ot 27 dekabrja 2018 g. N 498-FZ "Ob otvetstvennom obrashhenii s zhivotnymi i o vnesenii izmenenij v otdel'nye zakonodatel'nye акты Rossijskoj Federacii"" ot 19 dekabrja 2018 goda № N 498 // Rossijskaja gazeta. 2018 g. № 295(7758). (in Russ)].
11. Шевцов В.И., Макушин В.Д., Ступина Т.А., Степанов М.А. Экспериментальные аспекты изучения репаративной регенерации суставного хряща в условиях туннелирования субхондральной зоны с введением аутологичного костного мозга // Гений Ортопедии. 2010. №2. С. 5-10. [Shevcov V.I., Makushin V.D., Stupina T.A., Stepanov M.A. Jeksperimental'nye aspekty izuchenija reparativnoj regeneracii sustavnogo hrjashha v uslovijah tunnelirovanija subhondral'noj zony s vvedeniem autologichnogo kostnogo mozga // Genij Ortopedii. 2010. №2. S. 5-10. (in Russ)].
12. Kinner B., Capito M., Spector M. Regeneration of Articular Cartilage // Regenerative Medicine. 2005. №2. С. 91-123. doi: <https://doi.org/10.1007/b100001>.