

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2014
УДК 611-018.3

**ПРИЗНАКИ МОЗАИЧНОГО СТРОЕНИЯ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА:
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЛОКТЕВОГО СУСТАВА КРОЛИКА**

В.В. Новочадов, А.Ю. Алексеенко, П.А. Крылов, Е.Ю. Шувалова

Волгоградский государственный университет, г. Волгоград

При исследовании на примере локтевого сустава интактных кроликов породы Шиншилла показано, что гиалиновый хрящ имеет на светооптическом уровне характерную неоднородность строения. Этот феномен заключается, как минимум, в наличии мозаично расположенных участков (микрокластеров), отличающихся от окружения численной плотностью хондроцитов, структурой и оптической плотностью хрящевого матрикса. Участки повышенной плотности хряща занимают до 40% его объема, и могут быть описаны как полигональные усеченные пирамиды с поперечником сечения вблизи остеохондральной линии порядка 60-100 мкм и расширяющиеся к наружной зоне хряща до 100-150 мкм в поперечнике. Выявленный феномен сопоставлен с биомеханикой суставной поверхности с позиции оптимального опосредования статических и динамических нагрузок на сустав.

Ключевые слова: гиалиновый хрящ, хондроциты, локтевой сустав, морфологическое исследование.

Гиалиновый хрящ суставов имеет уникальное строение, обуславливающее крайне сложные задачи, которые он выполняет при движениях частей тела под разнообразными нагрузками. Хондроциты гиалинового хряща являются мигрантами из костного мозга сквозь субхондральный слой кости, экстрацеллюлярный матрикс синтезируется этими клетками и обеспечивает как опорные свойства хряща, так и управление трофикой хондроцитов через регуляцию проницаемости [9, 13, 15]. Сигнальные молекулы поступают к хондроцитам не из сосудов (хрящ полностью аваскулярен), а диффузией через остеохондральную линию и из синовиальной жидкости. Поверхностные зоны хряща бесклеточны, и поэтому практически не обновляемы и не управляемы в отношении свойств [3, 5, 10, 14]. Указанные структурные особенности уже являются основанием для формирования

достаточно неоднородных на протяжении конструкций, однако общепринятым является представление о наличии только зональных различий в строении хряща от подлежащей кости к поверхности и выделении относительно крупных областей (от нескольких до десятков мм в поперечнике), определяемых как «нагружаемые» и «относительно не нагружаемые». На микроскопическом уровне внутри таких областей в направлении, параллельном суставной поверхности, строение хряща описывается как гомогенное [1, 2, 8].

При этом совершенно игнорируется общебиологический принцип мозаичности, согласно которому более устойчивыми и адаптивными являются сложные структуры, обладающие пространственной неоднородностью (мозаичностью) строения и свойств. Между тем, на молекулярном уровне хондроны и отдельные хондроциты обладают широкой вари-

бельностью в отношении экспрессии отдельных генов и биохимических процессов, что учитывается при разработке новых клеточных и тканеинженерных технологий лечения заболеваний и повреждений суставного хряща [4, 6, 7, 11].

Представление о том, что выполнение функции динамичной мягко-эластичной опоры предполагает некую неоднородность строения, при отсутствии в доступной литературе сведений о горизонтальной неоднородности суставного хряща, за исключением характеристик его матрикса на молекулярном уровне, является основанием для проведения экспериментального исследования.

Цель работы – изучить в эксперименте структурную вариабельность гиалинового хряща на примере плечевого сустава кролика, и дать структурно-функциональную характеристику выделенным неоднородным объектам.

Материалы и методы

Образцы тканей для исследования были взяты из дистальных эпифизов плечевой кости 6 кроликов-самцов породы «Шиншилла» массой от 2,4 до 3,2 кг. Выведение животных из эксперимента осуществлялось, в соответствии с этическими нормами, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях.

Используя основные анатомические ориентиры, извлекали с помощью хирургического инструмента из каждой передней конечности локтевой сустав. Ткани аккуратно отпрепаровывали, освобождая для фиксации дистальный эпифиз плечевой кости. Гистологические препараты приготавливали после фиксации в 10%-ном растворе нейтрального забуференного формалина (pH = 7,4) и декальцинации в растворе «Cal-Ex®» (Fisher Scientific), окрашивали гематоксилином и эозином, для выявления тканевого матрикса – сафранином О [12]. В качестве количественных показателей определяли радиальную толщину хряща (мкм), численную плот-

ность хондроцитов в глубоких и промежуточных зонах ($1/\text{мм}^3$), удельную яркость матрикса в окраске сафранином О (усл. ед.). Измерения проводили на 4-5 микропрепаратах с каждого блока, в 5-6 полях зрения, так что общее число прямых измерений для каждого показателя превышало 150. Для выявления структурной неоднородности ткани эти же показатели в каждом поле зрения определяли на участках хряща в рамке считывания шириной 100 мкм с шагом 30 мкм от условной точки старта до 1500-2400 мкм (всего 50-80 «шагов» рамки).

Обработку количественных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) с учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Распределение в выборке выражали в виде: медиана Me (1-й – 3-й квартили). Для анализа различий между выборками использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Суставной хрящ плечевого сустава кролика имел типичное строение с зональной организацией, визуализируемую остеохондральную линию и гладкую суставную поверхность (рис. 1А).

Его средняя радиальная толщина была заметно больше в нагружаемых областях (420-700 мкм) в сравнении с не нагружаемыми областями (200-400 мкм). Нагружаемые области хряща имели более высокую численную плотность хондроцитов в промежуточной зоне, различия значений этого показателя для глубокой зоны, а также оптической плотности матрикса не были столь отчетливы (табл. 1).

При сканировании выявлялась, прежде всего, неоднородность радиальной толщины хряща, более отчетливо выраженная в нагружаемых областях сустава. Она в основном определялась текстурой подлежащей губчатой кости. Расстояние от достаточно гладкой суставной поверхности до костных балок оказалось весьма вариабельной величиной, варьирующей в поле зрения более чем в 2,5 раза. Размеры таких неоднородностей составляли от 150 до 400 мкм (рис. 1Б). В

Таблица 1

Морфометрические характеристики нагружаемых и не нагружаемых областей гиалинового хряща кроликов породы Шиншилла

Показатель	Нагружаемые области			Не нагружаемые области			Р
	Me	1-й кв.	3-й кв.	Me	1-й кв.	3-й кв.	
Радиальная толщина хряща, мкм	577	423	702	284	198	364	<0,01
Численная плотность хондроцитов в промежуточной зоне, 1/мм ³	845	570	1012	533	418	651	<0,01
Численная плотность хондроцитов в глубокой зоне, 1/мм ³	1325	1047	1611	1026	783	1253	>0,2
Оптическая плотность матрикса в окраске сафранином О, усл. ед.	1,33	1,23	1,40	1,25	1,16	1,33	>0,5

нагружаемых областях сустава при подсчете числа клеток в поле зрения и оптической плотности матрикса выявлялись иные неоднородности размерностью порядка 80-120 мкм, которые и были определены как элементы кластерной организации хряща. При подсчете числа клеток в поле зрения и определении оптической плотности матрикса выявлялись иные неоднородности размерностью порядка 75-125 мкм, которые и были определены как элементы микрокластерной организации хряща (рис. 1В, 1Г).

Микрокластеры составляли в нагружаемых областях хряща от 30% до 40% объема ткани, имели на срезах форму неправильной трапеции с широким основанием вблизи суставной поверхности. Это позволило описать их в объеме как полигональные усеченные пирамиды, обращенные усеченной вершиной к остеохондральной линии и основанием – к суставной поверхности. Всего на гистологических препаратах было идентифицировано 448 микрокластеров, их вариационные ряды, основанные на выделении по варьированию каждого из этих признаков, приведены на рисунке 2.

Как видно из графиков, распределение было непараметрическим, с асимметрией влево, и цензурировано размерами клеток, поскольку невозможно существование кластера менее 40 мкм в поперечнике. Количественные характеристики выявленных микрокластеров приведены в таблице 2.

Измерения подтвердили постепенное увеличение поперечника микрокластеров к наружной зоне хряща в 1,4-1,6

раза от размеров вблизи остеохондральной линии. Число хондроцитов в микрокластерах, с учетом объема, варьировало в широких пределах (от 144 до 6325) с медианой возле 1000. Это соответствовало нахождению в кластере сотен изогрупп хондроцитов. От окружения микрокластеры отличались более плотным расположением клеток (в 1,6-1,3 раза) и более высокой оптической плотностью матрикса (в 1,2-1,4 раза). Это свидетельствовало об их более высокой функциональной активности в отношении синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса.

По современным представлениям, ремоделирование хряща происходит путем динамического изменения хондрального фенотипа с достижением баланса синтетического и хондрорезорбтивного потенциалов, необходимого в данное время и в данном месте. Общим трендом является постепенное уменьшение числа хондроцитов, снижение синтеза матрикса и повышение интенсивности его распада ближе к суставной поверхности [7, 11]. Этот молекулярно-генетический ответ является результатом процессов механо- и хеморецепции непосредственно в самом хряще [12, 13]. Полученные нами данные позволяют считать, что в суставном хряще в результате его естественной дифференцировки закладываются участки (микрокластеры), характеризующиеся более интенсивными процессами образования экстрацеллюлярного матрикса. Их совокупность представляет собой своего рода объемный каркас внутри «гомогенного» гиалинового хряща. Мозаичное располо-

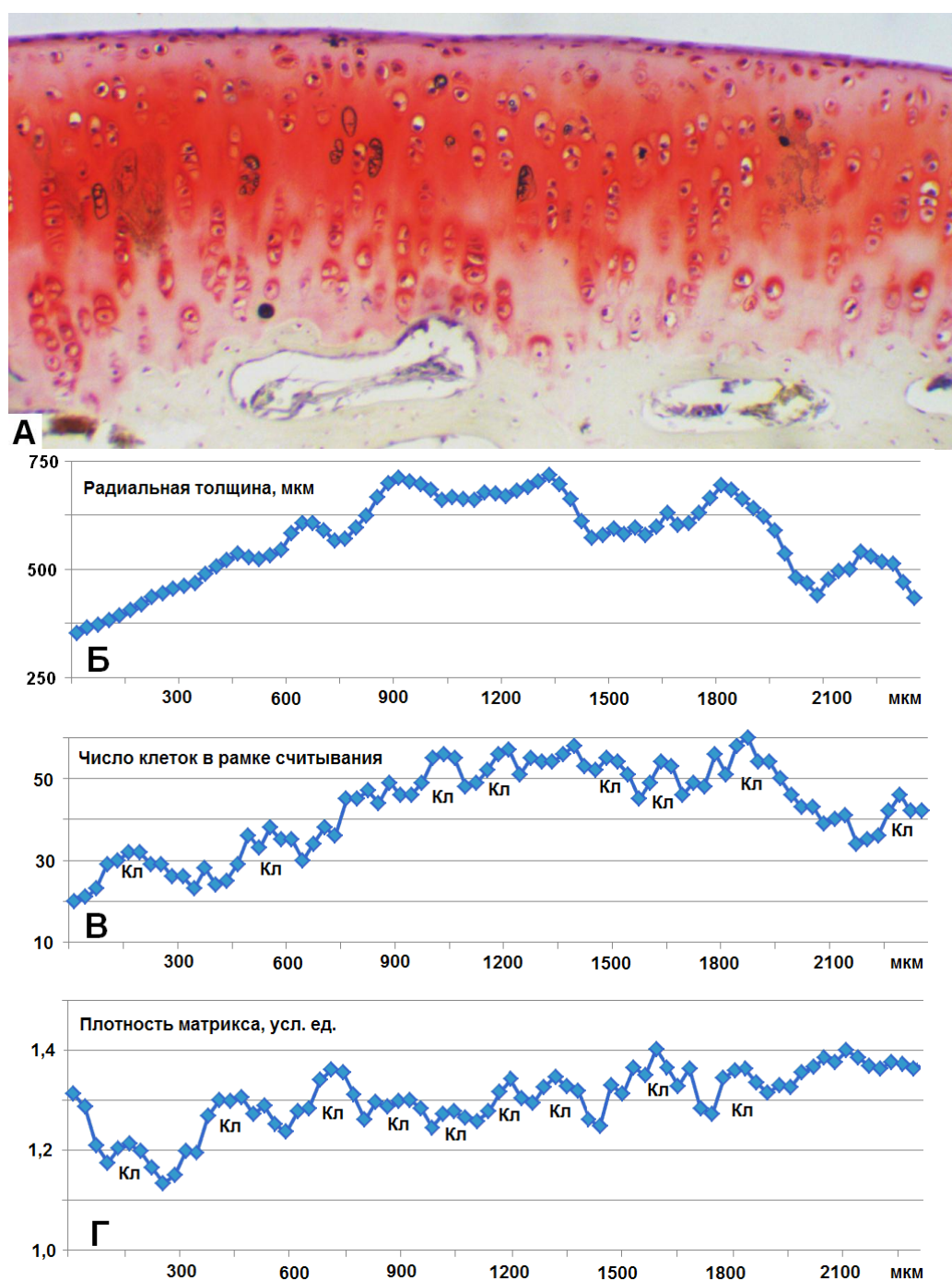


Рис. 1. Суставной гиалиновый хрящ нагружаемой области плечевого сустава кролика. А. Зональное строение и горизонтальная неоднородность плотности хряща в окраске сафранином О (ув. при съемке 240). Б-Г. Сканогаммы радиальной толщины, численной плотности клеток и оптической плотности матрикса этого препарата с шагом сканирования 25 мкм. Кластеры помечены знаками Кл

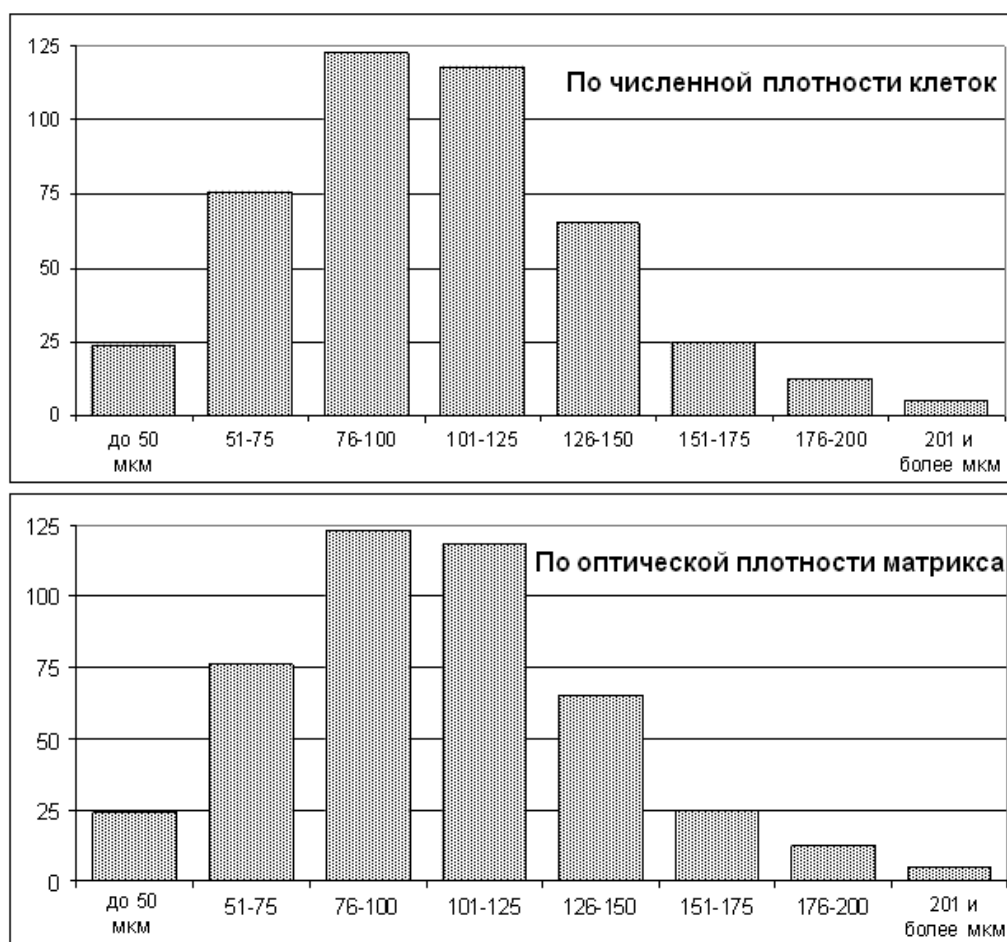


Рис. 2. Распределение микрокластеров суставного хряща по величине поперечного размера на уровне промежуточной зоны хряща (мкм). По оси ординат – число микрокластеров

Таблица 2

Некоторые количественные характеристики микрокластеров гиалинового хряща в нагружаемых областях плечевого сустава кролика

Показатель	Параметры вариационного ряда				
	Me	Min	Max	1-й кв.	3-й кв.
Средний поперечник, мкм:					
- в наружной зоне	118	40	275	94	136
- в промежуточной зоне	91	40	224	72	125
- в глубокой зоне	76	42	185	61	103
Среднее число клеток в кластере					
- на 1 срезе	126	36	448	92	188
- в пересчете на объем	943	144	6325	589	1719
Отношение плотности клеток в кластере и окружении	1,21	1,07	1,54	1,16	1,33
Отношение плотности матрикса в кластере и окружении	1,31	1,12	1,72	1,25	1,42

жение и особенности трехмерного строения таких кластеров являются основой для понимания векторов сил, действующих в хряще при перераспределении статических и динамических нагрузок в процессе функционирования крупных суставов. Дальнейшее изучение выявленного феномена предполагает раскрытие молекулярных особенностей хондроцитов и матрикса в составе микрокластеров, механизмов их возникновения, динамического регулирования и изменений при наиболее распространенных заболеваниях суставов.

Выводы

Гиалиновый хрящ локтевого сустава кролика имеет на светооптическом уровне характерную неоднородность строения, заключающуюся в наличии мозаично расположенных участков (микрокластеров), отличающихся от окружения относительно более высокой плотностью расположения хондроцитов, структурой и оптической плотностью хрящевого матрикса. Микрокластеры занимают в нагружаемых областях до 40% объема суставного хряща, и могут быть описаны как полигональные усеченные пирамиды с поперечником сечения вблизи остеохондральной линии порядка 60-100 мкм и расширяющиеся к наружной зоне хряща до 100-150 мкм в поперечнике. Наличие микрокластеров следует учитывать при расчете векторов сил, опосредующих статические и динамические нагрузки на суставную поверхность, изучении механизмов динамического ремоделирования хряща и его изменений в процессе развития патологии суставов.

Литература

1. Ежов М.Ю. Математическая модель развития изменений в суставных тканях при различных по интенсивности физических нагрузках / М.Ю. Ежов, Н.Н. Берендеев, С.В. Петров // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 7-3. – С. 550-554.
2. Макушин В.Д. К вопросу об активизации процессов, регулирующих восстановление структуры суставного хряща (обзор литературы и собственные данные) / В.Д. Макушин, Т.А. Ступина // *Гений ортопедии*. – 2014. – № 1. – С. 82-88.
3. Маланин Д.А. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе: экспериментальные и клинические аспекты : монография / Д.А. Маланин, В.Б. Писарев, В.В. Новочадов. – Волгоград: Волгоградское научное издательство, 2010. – 518 с.
4. Мозаичная хондропластика в лечении больных с деструктивно-дистрофическими и посттравматическими поражениями гиалинового хряща в коленном суставе – экспериментальные и клинические аспекты / Г.П. Котельников [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 9-2. – С. 252-255.
5. Новочадов В.В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща (обзор литературы) / В.В. Новочадов // *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11. Естественные науки*. – 2013. – № 1. – С. 19-28.
6. Особенности метаболизма протеогликанов из разных топографических зон коленного сустава у больных остеоартрозом: вариабельность фенотипа хондроцитов / Т.В. Русова [и др.] // *Бюллетень Сибирского отделения РАМН*. – 2013. – Т. 33, № 5. – С. 78-86.
7. Четина Е.В. Механизмы эмбриогенеза при остеоартрозе: роль дифференцировки хондроцитов в резорбции суставного хряща / Е.В. Четина // *Научно-практическая ревматология*. – 2010. – № 3. – С. 65-77.
8. Articular cartilage: structure and regeneration / J. Becerra [et al.] // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2010. – Vol. 16, № 6. – P. 617-627.
9. Bhosale A.M. Articular cartilage: structure, injuries and review of management / A.M. Bhosale, J.B. Richardson // *Br. Med. Bull.* – 2008. – Vol. 87. – P. 77-95.
10. Doyle, J.J. Matrix-dependent perturbation of TGF-beta signaling and disease / J.J. Doyle, E.E. Gerber, H.C. Dietz // *FEBS Lett.* – 2012. – Vol. 586. – P. 2003-2015.
11. Goldring, M.B. Chondrogenesis, chon-

- drocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis / M.B. Goldring // Ther. Adv. Musculoskelet. Dis. – 2012. – Vol. 4, № 4. – P. 269-285.
12. Handbook of histology methods for bone and cartilage / eds.: Y.H. An, K.L. Martin. – N.Y.: Humana Press, 2003. – 587 p.
13. Hubmacher D. The biology of the extracellular matrix: novel insights / D. Hubmacher, S.S. Apte // Curr. Opin. Rheumatol. – 2013. – Vol. 25, № 1. – P. 65-70.
14. Krylov P.A. The grouping of chondrocyte receptors according to their control over cartilage tissue remodeling / P.A. Krylov // Eur. J. Mol. Biotech. – 2014. – № 1(3). – C. 4-10.
15. The chondrocyte: biology and clinical application / Z. Lin [et al.] // Tissue Eng. – 2006. – Vol. 12. – P. 1971-1984.

MOSAICISM OF HYALINE CARTILAGE: QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL STUDY ON RABBIT ELBOW JOINT

V.V. Novochadov, A.Yu. Alekseenko, P.A. Krylov, E.Yu. Shuvalova

To study the heterogeneity of hyaline cartilage we have analyzed the tissues of elbow joint received from six intact Chinchilla rabbits. Classic histological assays, step-by-step scanning, and quantitative morphological analysis were performed. The revealed phenomenon at least concluded in an available of mosaic plots (microclusters), different from the environment of the numerical density of chondrocytes, structure and optical density of cartilage matrix. These microclusters took up to 40% of cartilage volume, they could be described as a polygon truncated pyramids with a diameter cross section about 60-100 microns near the basophil line and extending to 100-150 microns by superficial zone of the cartilage. The revealed phenomenon was matched to the biomechanics of the joints to provide for optimal redistribution of static and dynamic loads on the articular surface.

Keywords: *hyaline cartilage, chondrocytes, morphological study.*

Новочадов В.В. – д.м.н., проф., зав. кафедрой биоинженерии и биоинформатики Волгоградского государственного университета.
E-mail: novovv@rambler.ru.

Алексеев А.Ю. – аспирант кафедры биоинженерии и биоинформатики Волгоградского государственного университета.
E-mail: nsashaalekseenko@gmail.com.

Крылов П.А. – аспирант кафедры биоинженерии и биоинформатики Волгоградского государственного университета.
E-mail: p.krylov.volsu@yandex.ru.

Шувалова Е.Ю. – студентка 3-го курса по специальности «биоинженерия и биоинформатика» Волгоградского государственного университета.
E-mail: hritova_katia@mail.ru.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ
в рамках научного проекта № 4-04-01679 а.*