

© Группа авторов, 2010

УДК 616.728-018.3-007.248-003.93]-092.4

Экспериментальные аспекты изучения репаративной регенерации суставного хряща в условиях туннелирования субхондральной зоны с введением аутологичного костного мозга

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

The experimental aspects of studying articular cartilage reparative regeneration under subchondral zone tunneling with autologous bone marrow infusion

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

Федеральное государственное учреждение

«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий», г. Курган
(и.о. генерального директора — профессор А.Н. Дьячков)

Представлены предварительные результаты изучения репаративной регенерации суставного хряща в условиях экспериментального моделирования остеоартроза с последующим туннелированием субхондральной зоны и трансплантацией аутологичного костного мозга. В данных экспериментальных условиях собственные регенераторные возможности хряща выражались повышением пролиферативной и биосинтетической активности хондроцитов. Обнаруженные в очагах ремоделирования хряща клеточные скопления, окруженные межклеточным веществом, являлись признаком активно идущего репаративного процесса.

Ключевые слова: суставной хрящ, моделирование остеоартроза, субхондральная туннелизация, репаративная регенерация.

The work deals with the preliminary results of studying articular cartilage reparative regeneration under osteoarthritis experimental modeling with subsequent tunneling subchondral zone and autologous bone marrow transplantation. Under such experimental conditions the proper regeneration potentials of cartilage were manifested in the increase of chondrocyte proliferative and biosynthetic activity. The cellular accumulations, surrounded by intercellular substance, which were found in the foci of cartilage remodeling, indicated to actively proceeding reparative process.

Keywords: articular cartilage, osteoarthritis modeling, subchondral tunneling, reparative regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема регенерации гиалинового хряща суставов — одна из актуальных проблем современной медицины и биологии. Ограниченные способности суставного хряща к регенерации привели к развитию заместительных операций: пересадка надкостницы, надхрящницы, пластика костно-хрящевыми ауто- и аллотрансплантатами [1, 3, 6, 8, 9, 15 и др.]. Каждый из этих методов успешно применяется и может лишь частично восстановить функцию сустава. Ни один из этих способов не приводит к образованию гиалинового хряща, способного выдерживать нагрузку, которая прилагается к суставу в естественных условиях. Проблема заключается в том, что после трансплантации жизнеспособные хондроциты обладают пониженной пролиферативной и синтетической активностью [3]. Это послужило основанием для разработки новых подходов в лечении дефектов хряща на основе

культивирования клеток [12, 13, 16, 18]. Однако высокая стоимость технологии культивирования и пересадки клеток ограничивает развитие и широкое внедрение в практику этого метода.

В настоящее время среди способов стимуляции репаративного остео- и хондрогенеза широкое распространение получили: субхондральная туннелизация, абразия и формирование микропереломов субхондральной кости, объединенные названием — «костномозговая стимуляция». В условиях туннелирования биохимическое окружение — биологически активные вещества, образующиеся при некротизации костной стружки, белковые биорегуляторы костного мозга; биофизические факторы — уровень содержания кислорода, давление, могут иметь существенное влияние на пролиферацию, остео- и хондрогенную дифференцировку клеток. Благоприятное влияние субхондральной туннели-

зации при лечении гонартроза подтверждено многими исследователями [5, 11, 14, 17 и др.].

В связи с этим, с целью обеспечения положительного анатомо-функционального результата в настоящее время актуален поиск более эффективных способов туннелирования и оптимальных условий репаративной регенерации

суставного хряща.

Цель – изучение особенностей структурно-функционального реагирования и регенерации суставного хряща в условиях экспериментального моделирования остеоартроза с последующим туннелированием субхондральной зоны и трансплантацией аутологичного костного мозга.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент разделен на 2 серии: 1 серия – моделирование остеоартроза ($n=5$, 10 суставов), 2 серия – после моделирования остеоартроза на правом коленном суставе проводили туннелирование субхондральной зоны с введением аутологичного костного мозга, левый сустав не туннелировали ($n=1$). Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли согласно приказу МЗ СССР № 755, 1977 г.

Экспериментальное моделирование остеоартроза проводили на взрослых беспородных собаках, подобранных по принципу условных аналогов по возрасту и весу. Оперативные вмешательства осуществляли в условиях операционной одновременно на обоих коленных суставах экспериментальных животных. После обработки операционного поля, с медиальной поверхности бедра через прямолинейный разрез мягких тканей выделяли бедренную артерию на уровне средней части бедренной кости. Артерию 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. После иммобилизации сустава осуществляли одномоментную компрессию суставных поверхностей при помощи резьбовых стержней шарнирных узлов.

На момент снятия аппарата (28 суток иммобилизации) клинически у животных наблюдалась разгибательная контрактура коленного сустава и болезненность при пассивных движениях в суставе. Для контроля развития остеоартроза использовался рентгенографический метод. Через 28 суток после рентгенографического подтверждения развития артроза коленных суставов (сужение суставной щели, остеопороз метафиза бедра, очаговый остеосклероз субхондральной зоны) животных выводили из опыта.

Во второй серии, через 7 суток после снятия аппаратов, на правом коленном суставе прово-

дили туннелирование с введением в субхондральную зону бедра и голени аутологичного костного мозга при помощи электродрели, инъекционной иглы и шприца типа «рекорд». Туннелирование медиальных мыщелков производили с латеральной стороны сегментов, и наоборот латеральных – с медиальной. Забор костного мозга производили из проксимального метафиза плечевой кости при помощи иглы Кассирского. В каждом мыщелке бедра и голени делали по 4 туннеля, объем вводимого костномозгового субстрата составлял 0,2 мл на 1 введение (в каждый туннель). Через 14 суток после туннелирования животного выводили из опыта.

Суставные поверхности оценивали макроскопически (форма, контур, цвет). Для светоптического исследования применяли парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином и полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим (гистохимическая реакция на сульфатированные гликозаминогликаны) и метиленовым синим основным фуксином. Гистоморфометрические исследования проведены по перпендикулярным суставной поверхности эпоксидным полутонким срезам большой площади (6-8 мкм^2). Изображения микропрепаратов оцифровывали на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф» (Москва) и анализировали в программе «ВидеоТест-Мастер-Морфология». Определяли толщину хряща ($h_{\text{хр}}$, мкм), рассчитывали объемную ($V_{\text{хц}}$, %) и численную ($NA_{\text{хц}}$, мкм^{-2}) плотности всех хондроцитов, численную плотность клеток в составе изогенных групп – пролиферировавших хондроцитов ($NA_{\text{пхц}}$) и величину их пула ($BPIIXu$) – выраженное в процентах отношение $NA_{\text{пхц}}/NA_{\text{хц}}$, численную плотность пустых клеточных лакун. В качестве контроля изучали суставной хрящ интактных животных ($n=5$, 5 суставов).

Анализ цифрового материала проводили методами описательной статистики. Достоверность различий оценивали с помощью программы AtteStat, версия 1.0 [2] в электронных таблицах Microsoft Excel 97, в зависимости от характера распределения и объема выборок использовали критерий Стьюдента и критерий Вилкоксона для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В 1 серии при моделировании остеоартроза наблюдали разволокнение суставной поверхности,

выявлены дистрофические изменения, выражающиеся гибелью и деструкцией части хондроцитов,

неравномерным окрашиванием межклеточного матрикса и сопровождающиеся снижением толщины хряща. В субхондральной кости наблюдали разрежение костных трабекул. Отмеченные изменения являлись следствием нарушения обменных процессов (ремоделирования) суставного хряща, свидетельствующих о снижении синтеза и преобладании катаболических процессов. Известно, что при иммобилизации сустава происходит нарушение диффузионно-нагрузочного механизма снабжения его трофическими и пластическими веществами, нарушение микроциркуляции всех тканей сустава [7, 10, 19]. Кроме того, в условиях эксперимента было предусмотрено создание гипоксии и ухудшение трофики субхондральной кости (пересечение бедренной артерии). Максимально дистрофические изменения были выражены в хондроцитах промежуточной зоны (рис. 1), которые равноудалены от васкулярного и синовиального факторов питания (более 50 % клеток в состоянии деструкции).

Необходимо отметить, что в данных условиях эксперимента наиболее уязвимым оказался камбий суставного хряща, так как физиологическое самовосстановление его структуры осуществляется механизмами интерстициального роста – благодаря постоянно поддерживающейся репродукции хондроцитов в промежуточной зоне [4].

Во 2 серии в гиалиновом хряще левого сус-

тава (туннелизацию не проводили, срок эксперимента 21 сутки после снятия аппарата) нарушена гомогенность межклеточного вещества поверхностной зоны, разволокнена верхняя суперфициальная ее часть. Большая часть хондроцитов в состоянии лизиса (рис. 2, А).

Клетки теряли способность к окрашиванию, хотя и сохраняли свои обычные размеры, границы цитоплазмы становились нерезкими. Основная часть хондроцитов промежуточной зоны в состоянии деструкции. Хрящевые клетки располагались одиночно, изогенные группы отмечены единично (рис. 2, Б). Хондроциты глубокой зоны находились в неактивном состоянии или состоянии деструкции (рис. 2, В). Как и в промежуточной зоне выявлено большое количество пустых клеточных лакун. Были обнаружены лакуну с некротизированными клетками, клеточным детритом. Целостность базофильной линии не нарушена. В части наблюдений отмечено ее расслоение, неравномерное окрашивание.

В гиалиновом хряще правого сустава (14 суток после туннелирования) сохранялось разволокнение суставной поверхности. В поверхностной зоне хондроциты были аномальной формы с пикнотичными ядрами (рис. 3, А). Большая часть хондроцитов промежуточной и глубокой зон была функционально активна (рис. 3, Б, В). Отмечено появление 2, 4-членных изогенных групп.

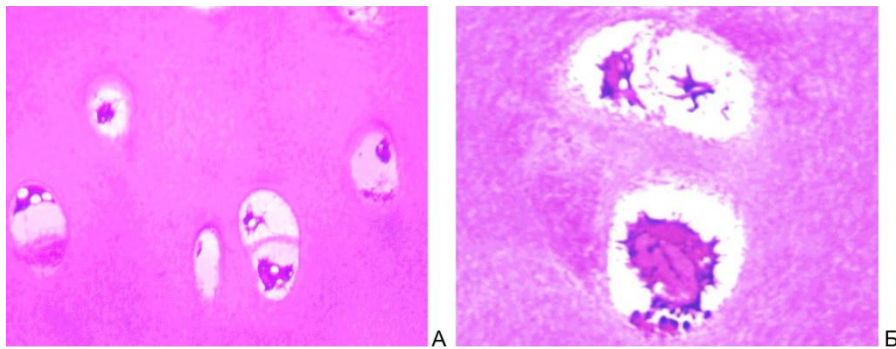


Рис. 1. Собака № 4779. 1 серия эксперимента. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим основным фуксином. Суставной хрящ мышечка бедра, промежуточная зона. А – об.40, ок. 12,5. Б – об.100МИ, ок. 12,5

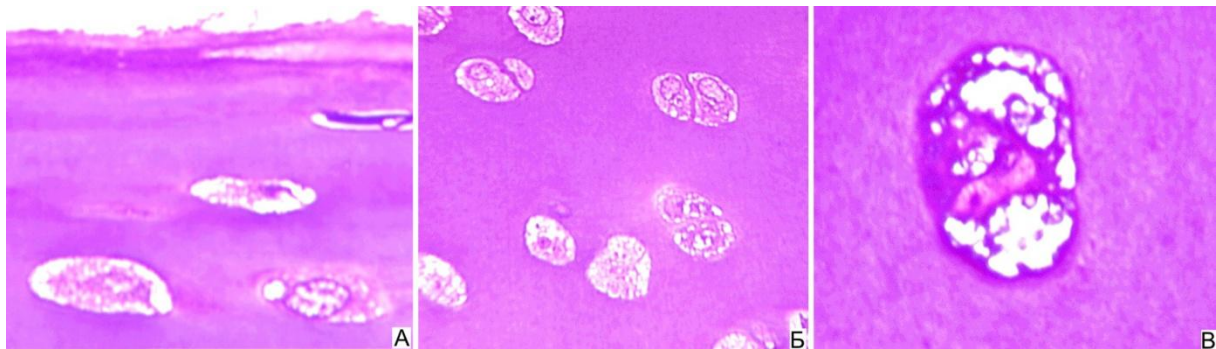


Рис. 2. Собака № 4793, 2 серия, левый сустав. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим основным фуксином. Суставной хрящ мышечка бедра. А – поверхностная зона, об.100МИ, ок. 12,5. Б – промежуточная зона, об.40, ок. 12,5. В – хондроцит глубокой зоны, появление в цитоплазме гигантских вакуолей, об.100МИ, ок. 12,5

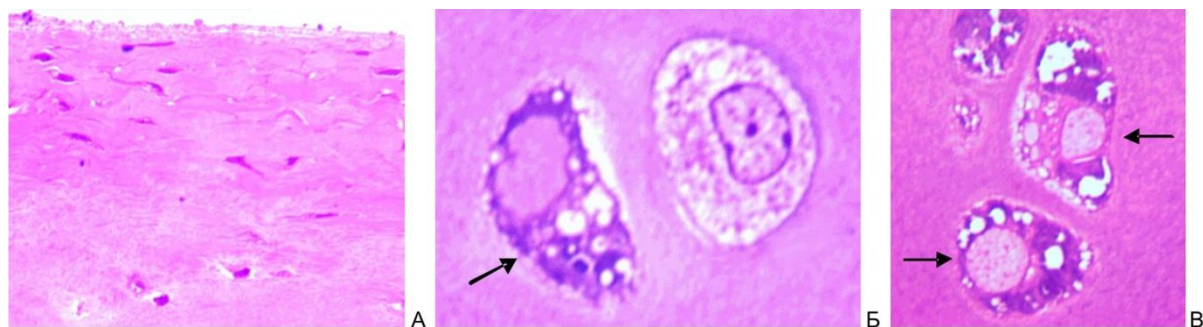


Рис. 3. Собака № 4793, 2 серия, правый сустав. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Суставной хрящ мыщелка бедра. А –поверхностная зона, об.40, ок. 12,5. Функционально активные хондроциты (стрелки) промежуточной (Б) и глубокой (В) зон. Об.100МИ, ок. 12,5

Увеличивалось число секреторно-активных клеток, которые имели рыхлые крупные ядра, базофильную цитоплазму, содержащую секреторные гранулы, вакуоли. Гистохимически отмечалась метахромазия перичеллюлярного матрикса (рис. 4). Среди таких клеток наблюдались и клетки, находящиеся в состоянии деструкции.

В отдельных участках хряща отмечено нарушение гомогенности межклеточного вещества вплоть до промежуточной и глубокой зон, демаскировка и деструкция коллагеновых волокон, гибель части хондроцитов. В таких участках, на границе поверхностной и промежуточной зон, выявлены очаги регенерации, представленные островками клеточных скоплений. Клетки располагались группами, в которых содержалось до 10 и более клеток (рис. 5).

По морфологическим признакам эти клетки относятся к хондроцитам. Они были округлой,

овальной формы, размер их в группах различен, плотно прилегали друг к другу, цитоплазма их слабо базофильна, у некоторых вакуолизирована. Ядра овальной формы, гомогенны, имели 1 – 2 ядрышка и четкую ядерную оболочку. Определялись клетки различной степени зрелости – недифференцированные округлые клетки, типичные функционально активные хондроциты и хондроциты, находящиеся в состоянии вакуольной дистрофии. Клетки продуцировали межклеточное вещество, образуя вокруг себя гомогенные ободки – перичеллюлярный матрикс, формировалась перичеллюлярная капсула, территориальный матрикс. Тесный контакт межклеточного вещества с хрящевыми клетками и отсутствие его вне связи с ними (межтерриториальный матрикс не сформирован) указывал, что данные клетки являлись источником новообразованного межклеточного вещества.

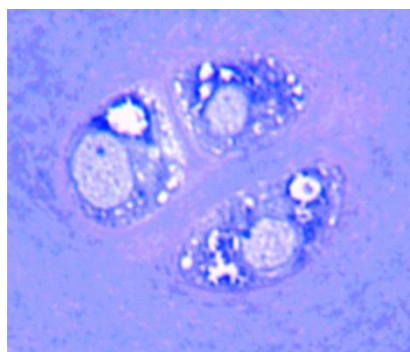


Рис. 4. Собака № 4793, 2 серия, правый сустав. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим. Функционально активные хондроциты промежуточной зоны, метахромазия перичеллюлярного матрикса. Об.100МИ, ок. 12,5

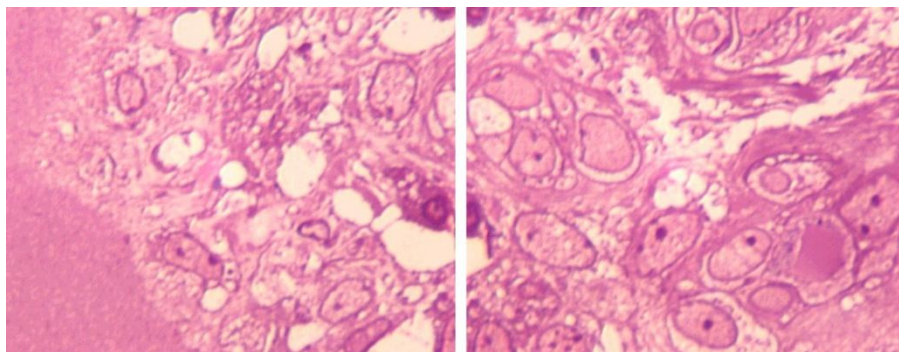


Рис. 5. Собака № 4793, 2 серия, правый сустав. Участки ремоделирования суставного хряща. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим – основным фуксином. Об.100МИ, ок. 12,5

В правом эпифизе через 14 суток после туннелирования субхондральной зоны в очагах активного ремоделирования наблюдалось образование густой мелкопетливой сети молодых трабекул, отличающихся от зрелых трабекул содержанием большого количества клеток. Межбалочные промежутки в участках костеобразования были заполнены красным костным мозгом, в котором отмечены очаги миелопоэза, присутствовали очаги свободно расположенных эритроцитов. В субхондральных отделах туннелированного сустава красный костный мозг занимал большую площадь, чем в левом, в субхондральных отделах которого преобладал желтый костный мозг.

Предварительные морфометрические исследования выявили достоверное ($p < 0,001$) увеличение толщины хряща до $484,95 \pm 1,67$ мкм, при моделировании остеоартроза этот параметр составлял $318,6 \pm 2,7$ мкм, у интактных животных – $475,5 \pm 1,3$ мкм. Относительно контроля и 1 серии эксперимента обнаружено достоверное ($p < 0,05$) увеличение численной плотности клеток – $10,55 \pm 0,8$ (при моделировании остеоартроза – $5,4 \pm 0,3$, в контроле – $6,2 \pm 0,56$). Увеличение данного параметра обусловлено увеличением количества клеток во всех зонах хряща. Величина пула пролиферирующих хондроцитов приближалась к контрольным значениям – 14,5 % и составила 14,2 % (при моделировании остеоартроза изогенные группы отмечены единично, входящие в их состав клетки находились в состоянии гибели). Процентное содержание пустых клеточных лакун по сравнению с 1 серией (43,39 %) снижалось до 16,23 % (у интактных животных – 13,6 %). Объемная плотность хондроцитов составила 5,98 %, что достоверно ($p < 0,05$) выше данного показателя в 1 серии (при моделировании остеоартроза – 4,66 %), но достоверно ($p < 0,05$) ниже этого показателя в контроле – 9,03 %.

Таким образом, полученные результаты оценки морфофункционального состояния суставного хряща животных 1 серии показали, что

данная экспериментальная модель позволяет получить гонартроз, патогенетически основное место в развитии которого занимает фактор изменений режима функциональных нагрузок и кровоснабжения сустава, определяющие диффузное питание хряща. При данном патологическом процессе собственные регенераторные возможности суставного хряща подавлены, и поэтому его восстановление невозможно без дальнейшего потенцирования внешних по отношению к хрящу механизмов.

Полученные предварительные результаты исследования во 2 серии показали, что в суставном хряще левого сустава через 21 сутки после моделирования остеоартроза основная часть клеток находилась в состоянии лизиса, что свидетельствовало о глубоких метаболических нарушениях хрящевой ткани. Репаративная регенерация проявлялась слабовыраженной пролиферацией хондроцитов. Изогенные группы отмечены единично, клетки, входящие в их состав, находились в состоянии деструкции.

Результаты гистоморфометрического исследования суставного хряща правого сустава при туннелировании субхондральной зоны и трансплантации в туннели аутологичного костного мозга свидетельствовали о том, что массовая гибель хондроцитов и деструкция матрикса компенсировались быстрой репопуляцией клеточного состава и активизацией синтеза компонентов межклеточного матрикса, в результате чего восстанавливалась толщина хряща. Собственные регенераторные возможности хряща выражались повышением пролиферативной и биосинтетической активности хондроцитов. Обнаруженные в очагах ремоделирования хряща клеточные скопления, окруженные межклеточным веществом, являлись признаком активного идущего репаративного процесса.

На основании полученных результатов, способ субхондральной туннелизации с введением аутологичного костного мозга можно рассматривать как перспективный в плане стимуляции репаративной регенерации хряща.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беллендир Э. Н. Теоретическое обоснование и применение пластических операций при костно-суставном туберкулезе // Травматология и ортопедия России. 1995. № 6. С. 7-13.
2. Гайдышев И. П. Анализ и обработка данных : спец. справочник. СПб. : Питер, 2001. 752 с.
3. Лаврищева Г. И., Оноприенко Г. А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. М. : Медицина, 1996. С. 144-166.
4. Мажуга П. М. Источники трофики и структурного самовосполнения суставного хряща // Морфология. 1999. № 1. С. 43-50.
5. 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.
6. Маленков И. Ю. Экспериментально-теоретическое обоснование перихондропластики в костно-суставной хирургии // Травматология и ортопедия России. 1995. № 6. С. 58-61.
7. Об оптимальных условиях репаративной регенерации опорных органов / Г. И. Лаврищева [и др.] // Гений ортопедии. 2002. № 1. С. 120-125.
8. Пластика полнослойных дефектов покровного хряща коленного сустава цилиндрическими костно-хрящевыми ауто- и аллотрансплантатами малого размера (экспериментальное исследование) / Д. А. Маланин [и др.] // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2000. № 2. С. 16-21.
9. Поляков В. Ю., Кудрявцева И. П., Антипов А. В. К вопросу о замещении дефектов суставных поверхностей костно-хрящевыми аллотрансплантатами (экспериментальное исследование) // Травматология и ортопедия России. 2000. № 1. С. 37-40.

10. Стецула В. И., Веклич В. В. Основы управляемого чрескостного остеосинтеза. М. : Медицина, 2003. 224 с.
11. Экспериментальные аспекты изучения хондрогенного потенциала мезенхимальных плюрипотентных и малодифференцированных клеток, «культивированных» in vivo / Д. А. Маланин [и др.] // Гений ортопедии. 2002. № 1. С. 90-97.
12. Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering / F. Guilak [et al.] // Biorheology. 2004. Vol. 41. P. 389-399.
13. Brittberg M. Articular Cartilage repair in the knee joint with autologous chondrocytes and periosteal graft // Orthopedics and Traumatology. 2001. No 3. P. 185-194.
14. Buckwalter J. A., Mankin H. J. Articular Cartilage: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation // Instr. Course Lect. 1998. Vol. 47. P. 487-504.
15. Driscoll S. W., Fitzsimmons J. S. The role periosteum in cartilage repair // Clin. Orthop. Relat Res. 2001. Vol. 391. P. 190-207.
16. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells / D. W. Wang [et al.] // J. Cell. Physiol. 2005. Vol. 204, No 1. P. 184-191.
17. Newman A. P. Articular Cartilage Repair. Current concept // American J. Sports Med. 1998. Vol. 26, No 2. P. 309-324.
18. Oreffo R. O. C., Triffitt J. T. Future potential for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics // Bone. 1999. Vol. 25, Suppl. 2. P. 5S-9S.
19. Wayne J. S., McDowell C. L., Willis M. C. Long-term survival of regenerated cartilage on a large joint surface // J. Rehabil. Res. Dev. 2001. Vol. 38, No 2. P. 191-200.

Рукопись поступила 20.10.09.

Сведения об авторах:

1. Шевцов Владимир Иванович – член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор;
2. Макушин Вадим Дмитриевич – ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова», главный научный сотрудник лаборатории патологии суставов, д.м.н., профессор;
3. Ступина Татьяна Анатольевна – ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова», научный сотрудник экспериментального отдела травматологии и ортопедии, к.б.н.;
4. Степанов Михаил Александрович – ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова», ведущий научный сотрудник экспериментального отдела травматологии и ортопедии, к.в.н.

Памяти Илизарова

15 июня 2010 года исполнилось бы 89 лет основателю Курганского научного центра, автору аппарата и метода, академику РАН Гавриилу Абрамовичу Илизарову. В память об академике ежегодно в ФГУ «РНЦ «ВТО» будут проводиться Всероссийские научно-практические конференции с международным участием «Илизаровские чтения». Первая такая научная конференция проводится 3-4 июня 2010 г.

