

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения влияния бишофита на обмен веществ, продуктивность, воспроизводительные функции свиноматок, на их потомство, на качества продукции.

SUMMARY

The article demonstrates the results of the research of hischofile influence upon metabolism, productivity and reproductive functions of sows, upon their breed and quality of products.

УДК 619.611

Р.Ф. Капустин

(Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени К.И. Скрябина)

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО ХОНДРОГЕНЕЗА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ГОНАРТРОЗЕ У ЖИВОТНЫХ

Выявление особенностей структурной организации, адаптивных перестроек тканей опорно-двигательного аппарата и особенностей хондрогенеза в зависимости от биомеханических требований среды обитания — одна из актуальных проблем фундаментальной и прикладной биологии. В этой связи особое значение приобретает изучение морфофункционального состояния компонентов аппарата движения как сложной органоспецифической системы, а также поиск надежных методов диагностики структурно-метаболических нарушений его тканей и разработка способов их коррекции [В.Ф. Сыч, 2002; Л.М. Дильмухаметова и соавт., 2004]. Решение всех этих вопросов имеет большое значение в связи с возрастанием повреждений локомоторного аппарата, сопровождающихся нарушением структурной и метаболической организации костной и хрящевой тканей и обусловленных влиянием целого ряда экзогенных факторов (вибрация, гиперкинезия, гипокинезия, иммобилизация, продолжительное действие малых доз радиации и так далее). Такая коррекция возможна путем использования препаратов хондроиндуцирующего действия, ингибирующих изменения деструктивного генеза, стимулирующих репаративные процессы. В последние годы внимание исследователей обращено на субстанции, являющиеся необходимыми в цепи метаболических процессов в тканях опорно-двигательного аппарата. Разработка и научное обоснование применения препаратов хондро- и остеоиндукторов приобретает особую актуальность, связанную с запросами ветеринар-

ной и гуманитарной медицины [Н.В. Дедух, 1996; Н.А. Слесаренко, А.И. Торба, 2004].

Цель исследования — вскрыть особенности репаративного хондрогенеза в условиях моделирования деструктивных процессов в коленном суставе у животных.

Исследования проводили на половозрелых белых крысах, кроликах, собаках, которых выводили из эксперимента с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. В исследовании использовали комплексный методический подход, включающий анатомическое препарирование структур коленного сустава. Коленные суставы фиксировали в 10% нейтральном формалине, декальцинировали в 5% азотной кислоте, проводили по спиртам возрастающей крепости и заключали в целлоидин. Срезы готовили на микротоме «Reichert» и окрашивали гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизону, изучение общей морфологической картины в световом микроскопе (Jenamed-2, Karl-C, Jena) проводили после окраски гистологических срезов гематоксилином и эозином, фуксином по Харту для оценки эластических волокон, а также использовали способ комбинированного окрашивания хрящевой ткани с красителями тиазинового ряда [П.М. Мажуга, 1994]. Морфометрию структур проводили под микроскопом «МБИ-7» (ок. 7, 10, об. 8, 10, 20) с использованием окуляр-микрометра 1×16.

Для изучения макромолекулярной организации межклеточного вещества связок и хрящевого покрытия использовали метод поляризационно-оптического ана-

лиза. Применение поляризованного света позволяет с высокой степенью чувствительности выявлять макромолекулы матрикса и изучать их характер и пространственную упорядоченность по рефракции гистохимической реакции. Изучение ориентационной упорядоченности основных макромолекул матрикса суставного хряща и связочного аппарата проводили в поляризованном свете под микроскопом «Polaris-A» (Польша) путем количественной оценки (с помощью компенсатора $\lambda/4$ величины рефракции (двойного лучепреломления) макромолекул, выявленных в гистологических реакциях; для коллагена — феноловая, с пикросириусом красным, для гликозаминогликанов — с толуидиновым синим (при pH 1,5; 2,5; 3,5). Для исследования пространственной упорядоченности макромолекул гликозаминогликанов использовали метод метахроматического окрашивания толуидиновым синим. Этот метод чувствителен и селективен для исследования сульфатированных форм гликозаминогликанов. Для изучения гликозаминогликанов были поставлены реакции с толуидиновым синим: при pH 1,5 — для выявления высокосульфатированных форм гликозаминогликанов (кератансульфат); при pH 2,5 — для оценки сульфатированных форм гликозаминогликанов (хондроитинсульфаты); при pH 3,5 — для характеристики суммарных гликозаминогликанов. Для изучения макромолекулярной организации сульфатированных форм гликозаминогликанов, в частности, хондроитинсульфатов и кератансульфатов гистосрезы окрашивали толуидиновым синим при pH 2,5 и 1,5, соответственно.

Кроме того, проведено исследование трибомеханических свойств суставного хряща. Для этой цели отбирали образцы хрящей мыщелков бедренной (os femoris) и большеберцовой (os tibia) костей, которые подвергали трению на вибротрибометре «Optimol-SRV» (Германия-Швейцария) с автоматической регистрацией силовой нагрузки и постоянной линейной скоростью (мм/с), шкалой 100 Н и скоростью движения 4 см/мин. Трение при данном виде испытаний выступало в роли разрушительной силы. В качестве смазки между трущимися поверхностями использовали индифферентную жидкость — дистиллированную воду. Для биомеханических испытаний компонентов коленного сустава были выбраны проксимальный эпифиз голени и дистальный эпифиз бедра животных. Материал фиксировали в 10% раство-

ре формалина в течение 9 суток. Закрепление образцов осуществляли с помощью акрил-цемента «Surgical Simplex P1ane» (Великобритания) в специально подготовленных металлических оправках, причем суставная поверхность мыщелков голени была закреплена в неподвижном инденторе. При закреплении образцов в испытательной ячейке вибротрибометра головка бедра могла совершать горизонтальные возвратно-поступательные движения, помимо этого она способна была воспринимать нагрузки и совершать ограниченные вертикальные перемещения. Это позволяло в процессе испытания смоделировать экстремальное воздействие, критерием оценки которого явилась величина коэффициента трения, автоматически фиксируемая на диаграмме самописца. Перед испытанием хрящи помещали в проточную струю водопроводной воды с целью предохранения их от высыхания и обеспечения пара трения смазкой — водой. Испытания проводили на вибротрибометре «Optimol SRV» (Германия-Швейцария), предназначенном для изучения свойств смазывающих веществ и определения коэффициентов трения разнообразных сочетаний трущихся материалов.

Статистический анализ полученных данных осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками. Весь цифровой материал подвергнут математической обработке по программе «Интегрированный статистический пакет Statgraf, версия 2–6» для IBM PC/AT.

Проведены серии экспериментов.

1. Интактные животные.
2. Моделирование деструктивного процесса путем введения в коленный сустав преднизолона в дозе 15–25 мл 1–2 раза в две недели в течение месяца.
3. Моделирование деструктивного процесса путем введения в коленный сустав преднизолона в дозе 15–25 мл 1–2 раза в две недели в течение месяца, введение буфера.
4. Моделирование деструктивного процесса путем введения в коленный сустав преднизолона в дозе 15–25 мл 1–2 раза в две недели в течение месяца + глюкозамин гидрохлорид в дозе 15–25 мг внутримышечно 1–2 раза в неделю в течение месяца.

В результате проведенных исследований установлено, что внутрисуставные инъекции преднизолона вызывают в коленном суставе комплекс морфологических изменений деструктивного генеза, проявляющийся как на макроскопичес-

ком, так и на микроскопическом уровнях его организации. Так, по истечении месяца после интраартикулярного введения преднизолона отмечена тугоподвижность коленного сустава, который увеличен в объеме и отечен. Животные предпочитают не включать его в локомоторный акт. Капсула сустава гиперемирована и отечна, в области прикрепления к кости в ней выявлены участки темного цвета, определяемые нами как некротические очаги. Обнаружены внутрисуставные образования с признаками петехий и экхимозов, являющихся, возможно, следствием диапедеза. Суставной хрящ, покрывающий мыщелки, неравномерной толщины, местами скарифицирован до обнажения субхондральной кости. Хрящевое покрытие теряет блеск, имеет матовый оттенок и характеризуется изменением естественной окраски с сероголубой до бурой. Зона дефекта выполнена регенератом белого цвета, структурное оформление которого напоминает эластическую соединительную ткань.

При анализе гистопрепаратов поврежденных мыщелков показано, что деструктивные преобразования затрагивают все компоненты проксимального метаэпифиза: суставной хрящ, субхондральную кость и метафизарный хрящ. Так, суставной хрящ variabelен по толщине, с очагами фибрилляции, трещинами и щелями различной конфигурации и протяженности. Необходимо также отметить, что выявленные микродефекты могут иметь продольное направление. Разволокнение хряща, преимущественно затрагивает его промежуточную зону, в то время как для поверхностной зоны характерна узурация хрящевой поверхности и нарушение ее рельефа. В области трещин и разволокнений обращает на себя внимание нарушение цитоархитектоники хрящевой ткани, что проявляется в уменьшении количественного представительства хондроцитов и появлении их деструктивных форм. В области повреждения суставной поверхности нетрудно видеть нарушение целостности базофильного раздела, что может привести к изменению минерализации хрящевого матрикса. Кроме того, в кальцифицированной зоне хрящевого покрытия отмечена инвазия сосудов, следствием чего является появление гипертрофированных хондроцитов, находящихся в состоянии пикноза и некроза, и замещение хрящевой ткани грубоволокнистой костной.

В участках хряща, смежных с поврежденными, выявлен регенерат, представлен-

ный хондроцитами, которые расположены в виде лентовидных скоплений в кальцифицированной зоне, и волокнистых образований, локализованных в поверхностной зоне. Возможность аналогичного течения регенерации хряща описана в работах, проведенных на половозрелых кроликах [Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко, 1996]. Поляризационно-оптический анализ препаратов убедительно продемонстрировал, что в области повреждения суставного хряща нарушается ориентация коллагеновых конструкций хрящевого матрикса, что выражается в их тангенциальном расположении в глубоких отделах, тогда как у интактных животных они имеют ориентацию вертикально свободной поверхности. В промежуточной зоне хряща отсутствует феномен рефракции, что может быть связано с ее обеднением коллагеновыми волокнами и ослаблением метаболических потенциалов. При окраске препаратов толуйдиновым синим установлено, что поврежденный хрящ, выполненный регенератом, изменяет свои тинкториальные свойства (не обладает метахромазией), что может отражать перераспределение гликозаминогликанов и связанной воды, которая, как известно, определяет устойчивость хряща к силовым нагрузкам на сжатие. Данная особенность в структурной организации поврежденных участков может свидетельствовать об их несостоятельности в биомеханическом отношении. В области повреждения суставного хряща показано преобладание сульфатированных форм гликозаминогликанов, дающих γ -метахромазию. Этот факт может свидетельствовать о высокой биосинтезирующей активности клеток данных участков, в сравнении со смежными зонами, в которых преобладают высокосульфатированные формы этих протеогликанов. Не исключено, что описанные изменения в содержании углеводно-белковых комплексов носят адаптивный характер. Есть основания полагать, что источником регенерата хряща может служить субхондральная кость в его центральных отделах и капсула сустава в периферических зонах. Вместе с тем, новые генерации хряща не успевают достичь той степени морфологической зрелости, которая свойственна хрящевому покрытию у интактных животных, что может быть связано с дополнительной травматизацией молодой хондронной ткани, структурная организация которой не адекватна падающим на нее силовым нагрузкам.

Структурные преобразования субхонд-

ральной кости заключаются в нарушении процессов остеогенеза. Это выражается в истончении и рассасывании костных trabecул с образованием резорбционных лакун, заполненных детритом, уменьшении количественного представительства бластических форм клеток, появлении очагов хондроиды с пикноформными хондроцитами, обрамляющего поврежденные участки хрящевой поверхности.

Использование методов поляризационной микроскопии позволило выявить компенсаторные преобразования в субхондральной кости, выражающиеся в склерозировании костных балок, расположенных в территориальной близости к участкам, имеющим более высокую степень рефракции коллагена, а также повышенное содержание несulfатированных форм гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, закономерно возрастающее по мере приближения к поврежденным отделам. Выявленные особенности могут свидетельствовать об активно протекающих здесь процессах фибриллогенеза в сравнении с дистрофически измененными зонами кости, которые отличаются высоким представительством хондроитинсульфатов, содержание которых, как известно, дает наиболее ценную информацию при определении зрелости и потенциалов хрящевых клеток. Существенные изменения деструктивного генеза обнаружены со стороны метафизарного хряща. Они проявляются в его гипертрофическом развитии, нарушении соотношения структурных зон, среди которых наибольшее представительство имеет зона «монетных столбиков», содержащая обширные кистозные полости и измененные формы клеток. Обращают на себя внимание зоны гипертрофированного и разрушенного хряща. Как показали наши исследования, зона роста отличается гетерогенностью распределения различных фракций гликозаминогликанов по площади гистологического среза, что может отражать специфику силовых нагрузок, падающих на кость в целом и отдельные ее зоны, вследствие повреждения последних в частности.

Внутрисуставные инъекции преднизолона в дозе 15–25 мл 1–2 раза в две недели в течение месяца приводят к выраженным изменениям в суставах, параартикулярных тканях, которые можно квалифицировать как остеоартроз III степени, протекающий по типу асептического некроза. Вместе с тем, компенсаторные реакции поврежденных тканей могут свидетельствовать об их

неполной регенерации и несостоятельности в биомеханическом отношении. В серии экспериментов с введением буфера в сустав после моделирования деструктивного процесса выраженных отличий от вышеизложенных не обнаружено. В связи с этим, сравнительный анализ проведен в группе животных, у которых было смоделировано экстремальное воздействие преднизолоном с последующим введением глюкозамина гидрохлорида.

Проведенный анализ гистологических данных позволил заключить, что применение глюкозамина гидрохлорида у собак вызывает комплекс структурных преобразований в поврежденном суставе адаптационного генеза, который приводит в конечном итоге к полному или частичному восстановлению функциональной пригодности. Так, спустя месяц после первой инъекции подвижность сустава была восстановлена частично или полностью. Пораженная конечность выполняет стато-локомоторную функцию. Суставной хрящ на значительном протяжении сохраняет блеск, тогда как его тусклость отмечена лишь вблизи от зоны дефекта.

Гистологические исследования показали, что зона дефекта суставного хряща заполнена хондроидным пролифератом, характер которого имеет специфику структурного проявления, обусловленную размерами поврежденного участка. Клеточная популяция регенерата представлена в основном гипертрофированными хондроцитами, что может определять их оксифильные тинкториальные свойства. Незначительные по площади повреждения выполнены оксифильным регенератом, не отличающимся по своей морфологической организации от поверхностной и промежуточной зон интактной хрящевой поверхности. Снижение базофилии в области регенерата подтверждает аналогичные данные, полученные в других работах [Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко, 1996]. В территориальной близости от регенерационной зоны отмечены очаги хондроиды, состоящие из пикноформных хондроцитов.

Если повреждения хрящевого покрытия затрагивают значительную площадь, то начальным этапом его репаративной регенерации является образование соединительнотканного регенерата, как бы связывающего между собой неповрежденные участки суставных поверхностей, субрегенераторно дифференцируется волокнистый хрящ, волокна которого ориентированы в соответствии с линиями силовых

нагрузок, испытываемых суставными поверхностями. Результатом репаративных реактивных преобразований со стороны хряща является постепенное выравнивание нарушенных контуров суставной поверхности и образование целостного хрящевого покрытия.

Однако важно подчеркнуть, что новообразованный суставной хрящ имеет тканеспецифические особенности, отличающие его от таковых у интактных особей. Так, после использования глюкозамина гидрохлорида хрящевое покрытие сустава имеет те же структурные зоны, что и у контрольных: поверхностную, промежуточную и глубокую. При этом поверхностная зона на начальных этапах регенераторного процесса имеет большее представительство и структуру, стереотипичную, характерную для волокнистого хряща. Но на более поздних этапах регенераторного процесса она приобретает клеточную специфику гиалиновой хрящевой ткани. Кроме того, промежуточная зона представлена в основном одиночно расположенными хондроцитами, изогенные группы и капсулы можно видеть лишь в ее глубоких отделах.

При анализе степени ориентационной упорядоченности макромолекул межклеточного вещества с помощью поляризационной микроскопии показано, что регенерат в суставном хряще представлен ориентированными коллагеновыми структурами, соответствующими контрольным особям: тангенциально в поверхностной и вертикально в промежуточной и глубокой зонах. Вместе с тем, рефракция этого фибриллярного белка гетерогенна по площади гистологического среза, что может быть связано с неполным завершением процессов внутритканевой дифференцировки вновь образованного хряща. Сравнительное изучение препаратов, окрашенных толуидиновым синим, продемонстрировало высокое содержание в суставном хряще высокосульфатированных фракций гликозаминогликанов, что позволяет думать о его биомеханическом совершенстве. Проведенные исследования позволяют заключить, что источником образования хрящевого регенерата после использования глюкозамина гидрохлорида может явиться синовиальный паннус суставной капсулы, инициирующий в свою очередь стадийность репаративной регенерации суставного хряща, которая включает стадии волокнистого и гиалинового хряща. Показано также, что глюкозамина гидро-

хлорид стимулирует внутритканевую дифференцировку регенерата в сторону хондрогенеза, обеспечивая специфичность гуморального микроокружения суставной поверхности.

В субхондральной кости выявлены репаративные преобразования, заключающиеся в стазе и запустевании инвазированных сосудов, повышении плотности линий склеивания, увеличении количественного представительства остеобластов и остеоцитов. В глубоких отделах сохраняются очаги деструкции кости, однако вблизи них активно протекают процессы регенерации, выражающиеся в формировании новых генераций костной ткани. Кроме того, нами выявлены обширные зоны хондроидного пролиферата в субхондральной кости, состоящего из одиночных хондроцитов, изогенных групп, гипертрофированных форм и значительных по площади участков разрушенного хряща. Можно допустить, что подобные структуры являются гипертрофически развитым метафизарным хрящом, выполняющим роль местного резервуара хондроидных образований в соответствии с представлениями некоторых авторов о регенерации опорных тканей [Ю.А. Ватников, 2004]. При изучении пластин роста показано увеличение их площади в сравнении с таковыми у животных, принятых за норму. Лишь в отдельных случаях сохраняется разволокнение хряща и деструктивные формы клеток, вместе с тем, на большом протяжении ростковых пластин зарегистрировано восстановление их структуры и зональной дифференцировки. Кроме того, в их составе обнаружено высокое содержание кератан- и хондроитинсульфатов в сравнении с деструктивными локусами метафизарного хряща.

Итак, внутрисуставная инъекция преднизолона в дозе 15–25 мг 1–2 раза в две недели в течение месяца вызывает в коленном суставе устойчивую картину остеоартроза III степени. Она проявляется комплексом структурных преобразований деструктивного генеза в суставных и параартикулярных тканях, характерных для некроза. Однако внутримышечное использование глюкозамина гидрохлорида в дозе 15–25 мг 1–2 раза в неделю в течение месяца индуцирует репаративные процессы в суставном хряще, не угнетая синтез коллагена, не вызывая ulcerогенного воздействия, оказывая стабильный хондромодулирующий эффект, что определяет явление репарации.

Глюкозамина гидрохлорид вызывает

выраженный хондромодулирующий эффект и стимулирует репаративные процессы в хрящевой и костной тканях. В гиалиновом хряще в зонах повреждения формируется гиалиновая хрящевая ткань без позиционной специфичности, характерной для суставного хряща. На основе комплексного морфологического анализа компонентов коленного сустава и парартикулярных тканей, показано, что преднизолон может быть использован для моделирования деструктивных процессов, преимущественно в хрящевой ткани, протекающих по типу остеоартрозов и асептического некроза. Выявлена специфика структурных преобразований в хрящевой и костной тканях, заключающаяся в том, что в условиях действия преднизолона в суставном хряще имеют место два активно протекающих процесса: деструкция и регенерация. Деструктивные изменения заключаются в лизисе и пикнозе клеток, разрушении матрикса. Репаративные процессы носят характер «неполной» регенерации и приводят к формированию волокнистого хряща на участках гиалинового, что позволяет моделировать адекватную ситуацию согласно цели и задачам исследования.

Таким образом морфофункциональное обоснование репарации конструкции коленного сустава (*art. genus*), адаптированное к характеру стато-локомоции, обеспечивается композиционными особенностями косто-связочного аппарата, трибологическими свойствами суставного хряща, упорядоченностью коллагеновых волокон, гетерогенностью распределения коллагена по степени морфологической зрелости, соотношением фракций гликозаминогликанов. Внутрисуставное воздействие преднизолона вызывает в коленном суставе комплекс изменений деструктивного генеза, отражающий особенности клеточных механизмов ремоделирования. Морфологически это выражается в изменении позиционно-специфического распределения хондроцитов и как следствие — морфометрических свойств

матрикса, проявляющихся в перераспределении гликозаминогликанов в сторону высокосульфатированных форм, в узурации хрящевой поверхности, нарушении целостности базофильного раздела и пространственной ориентации волокнистых конструкций хрящевой и костной тканей. Характер и направленность репаративного хондрогенеза после интраартикулярного введения преднизолона регламентированы масштабом повреждения хряща и костной ткани и особенностями их метаболизма в условиях клеточного дисбаланса. Спонтанный процесс воздействия преднизолона характеризуется дефектами хрящевого покрытия и костной ткани и обширными реконструктивно-восстановительными процессами, связанными с образованием фрагментов соединительной ткани, а при незначительных масштабах повреждения — волокнистого хряща. В поврежденном коленном суставе на фоне внутримышечных инъекций глюкозамина гидрохлорида происходят структурно-функциональные преобразования адаптационного генеза (восполнение хрящевого дефекта хондронидным пролифератом, выравнивание суставной поверхности, восстановление пространственной ориентации коллагеновых конструкций хряща и кости, увеличение содержания гликозаминогликанов и появление новых костных генераций). Глюкозамина гидрохлорид стимулирует процессы внутритканевой дифференцировки пролиферата в сторону хондрогенеза на основе гистогенетической преемственности и взаимосвязи между тканями локомоторного аппарата. Источником образования регенерата при компенсаторном воздействии глюкозамина гидрохлорида является синовиальный паннус суставной капсулы, инициирующий стадийность репарации, включающего стадию волокнистого и гиалинового хрящей, что определяет его хондропрокторные свойства.

Приоритетность исследований защищена охраноспособными документами (патенты RU 2246304, RU 2246305).

Литература

1. Ватников Ю.А. Организация репаративного остеогенеза животных. МГУПБ, 2004. 146 с.
2. Дедух Н.В. Структурно-функциональная организация суставного хряща // Морфология. 1996. Т. 109. № 2. С. 47.
3. Лавришова ГИ., Оноприенко Г.А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. М.: Медицина, 1996. 208 с.
4. Мажуга П.М. Особенности дифференцировки клеток в хондрогенезе и остеогенезе // Ортопедия, травматология и протезирование. 1994. № 4. С. 90.
5. Дильмухаметова Л.М., Вагапова В.Ш., Борзилова О.Х., Гибадуллина Ф.Б. Морфология передней зоны синовиальной мембраны коленного сустава в эмбриогенезе // Морфологические ведомости (приложение). 2004. № 1–2. С. 33.
6. Слесаренко Н.А., Торба А.И. Морфологическая характеристика индуцированного гонартроза у собак // Морфологические ведомости (приложение). 2004. № 1–2. С. 95.
7. Сыч В.Ф. Морфология и филогенетика: новый аспект взаимосвязей // Морфология. 2002. Т. 120. № 4. С. 85.