

ГИСТОТОПОГРАФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА ДИСТАЛЬНОГО ЭПИФИЗА БЕДРЕННОЙ КОСТИ СТАРЕЮЩИХ КРЫС

Попова О.А.¹, Сахаров А.В.¹, Макеев А.А.¹, Просенко А.Е.¹, Кандалинцева Н.В.¹

¹ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет», Новосибирск, Россия (630126, г. Новосибирск, ул. Вилуйская, 28)

Методом биохимического анализа у крыс двух возрастных групп исследовано состояние процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов и активность системы антиоксидантной защиты. У стареющих крыс в плазме крови обнаружено превышение интегральных показателей окислительного стресса по сравнению с молодыми животными. Исследование в проходящем свете образцов суставного хряща дистального эпифиза бедренной кости у животных данной возрастной группы позволило в рамках единой суставной поверхности выявить особенности структурной организации гиалинового хряща, выстилающего медиальный и латеральный мыщелки. Морфологические особенности проявляются в статистически достоверном уменьшении толщины суставного хряща медиального мыщелка по сравнению с латеральным. Обнаруженная асимметрия суставного хряща на тканевом уровне обусловлена нарушением его гистоархитектоники. Полученные результаты позволяют прогнозировать высокую степень травматического повреждения суставного хряща медиального мыщелка по сравнению с латеральным.

Ключевые слова: старение, активные кислородные метаболиты, суставной хрящ, нарушение гистоархитектоники.

HISTOTOPOGRAPHIC PECULIARITIES OF HYALINE CARTILAGE OF DISTAL FEMUR EPIPHYSE OF AGING RATS

Popova O. A.¹, Sakharov A. V.¹, Makeyev A. A.¹, Prosenko A. E.¹, Kandalintseva N.V.¹

¹Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russia (630126, Novosibirsk, street Viluiskaya, 28)

The state of the lipid peroxidation processes and the system of antioxidative protection activity in rats of two age-grade were studied by the use of biochemical analysis. Comparing to young animals plasma of aging rats have excess of integrated indicators of oxidative stress. Research of specimens of articular cartilage of the distal epiphyse of the femur in the aging group of animals in transmitted light allowed to evolute peculiar properties of the structural organization of the hyaline cartilage lining the medial and lateral condyles within a single articular surface. Morphological peculiarities appear in statistically significant thinning of the articular cartilage of the medial condyle as compared to lateral. The observed asymmetry of the articular cartilage on the tissue level is determined by damage of its histoarchitectonics. The obtained results allow us to predict a high degree of traumatic injure of the articular cartilage of the medial condyle as compared to lateral.

Key words: aging, reactive oxygen metabolites, articular cartilage, the damage of histoarchitectonics.

Введение

В связи с особенностями локомоции и биомеханики крупных суставов периферического скелета распределение векторов нагрузки на латеральный и медиальный мыщелки при равном уровне компрессии происходит неравномерно [3]. Безусловно, что в рамках единой суставной поверхности структурно-функциональная организация хряща мыщелков дистального эпифиза бедренной кости должна иметь особенности гистологического строения. В соответствии с классическими представлениями о единстве структуры и функции, уровни повреждения и регенерации суставного хряща в соответствующих компартментах при травме будут неодинаковыми. Особенности структурной организации гиалинового хряща в данном аспекте в публикациях отечественных и зарубежных авторов

освещены крайне недостаточно [7; 9]. С точки зрения фундаментальной медицины, изучение морфофункциональных характеристик суставного хряща в его различных компартментах позволит подойти к решению проблемы научно обоснованных подходов к управлению посттравматической регенерацией и оценке риска уровня его повреждения при травме.

В настоящее время высказывается мнение о высокой роли активных кислородных метаболитов в механизмах развития приспособительных и дегенеративных изменений суставного хряща [1]. С влиянием активных кислородных метаболитов (АКМ) связывают угнетение биосинтеза и пролиферативной активности хондрогенных клеток, повреждение молекул межклеточного вещества [4]. Эти процессы особенно выражены и достаточно четко идентифицируются у стареющих индивидуумов. При этом состояние уровня липопероксидации и функциональной активности ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ) рассматривается в качестве надежных биохимических маркеров биологического старения [5]. Изучение особенностей гистоархитектоники суставного хряща дистального эпифиза бедренной кости латеральной и медиальной локализации у стареющих животных явилось основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования – изучить гистотопографические особенности суставного хряща дистального эпифиза бедренной кости стареющих крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на крысах самцах линии Wistar. В соответствии с рекомендациями О.А. Гелашвили (2008) о периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крысы были сформированы группы из молодых ($n = 10$) и стареющих ($n = 10$) животных 3- и 9-месячного возраста соответственно [2]. Верификацию развития биологического старения оценивали по биохимическим маркерам старения в плазме крови. Для этого у крыс всех групп под эфирным наркозом из каудальной полой вены забирали кровь, получали плазму и исследовали на содержание малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК) и активность ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). МДА в плазме крови определяли в реакции с трихлоруксусной и 2-тиобарбитуровой кислотами. ДК выявляли в реакции с гептан-изопропаноловой смесью. Активность КАТ изучали в реакции перекиси водорода с добавлением молибдата аммония [6]. Активность СОД регистрировали по степени ингибирования хемилюминесценции раствора ксантина, лицигенина и ксантинооксидазы сывороткой крови [10].

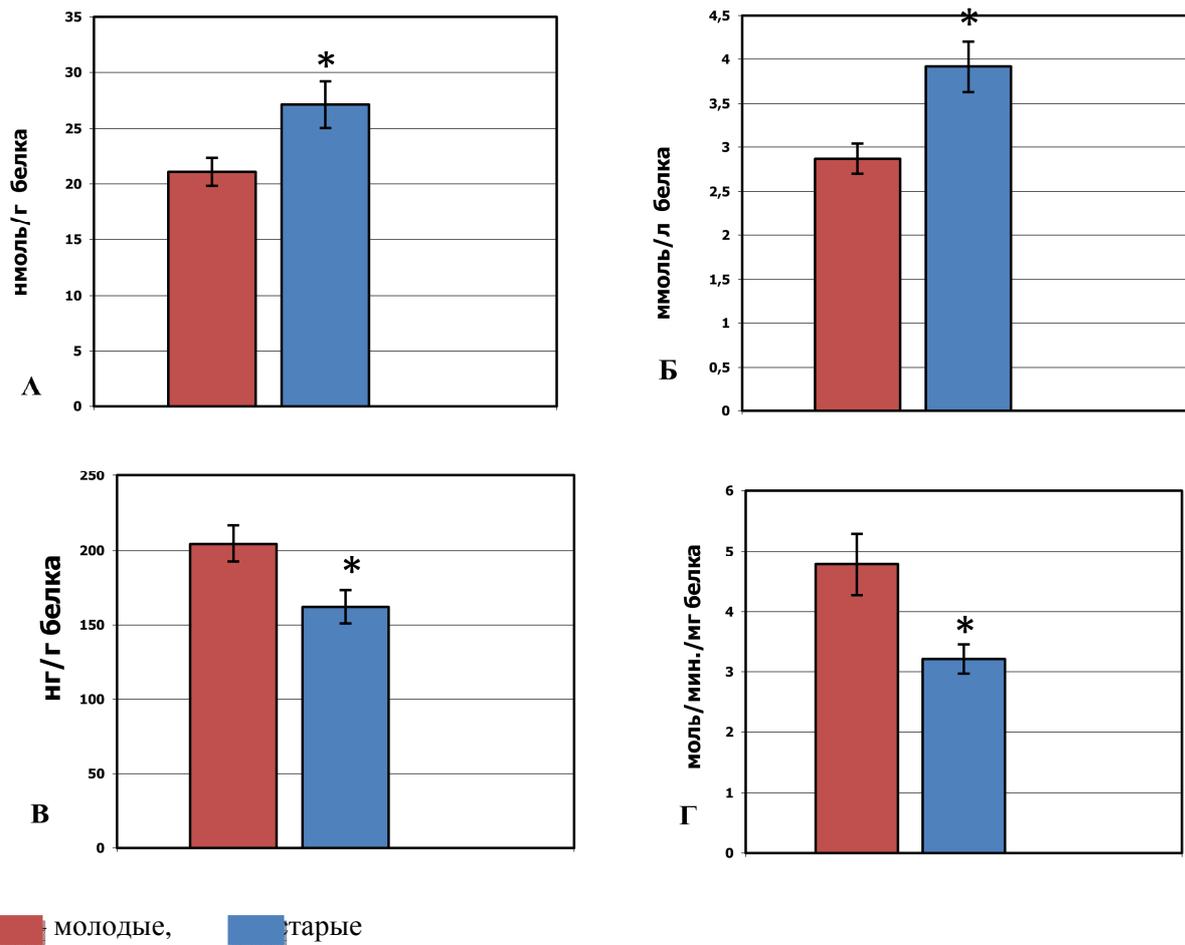
Для изучения морфологических особенностей суставного хряща латерального и медиального мышечков дистального эпифиза бедренной кости стареющих крыс выводили из эксперимента путем передозировки ингаляционного наркоза хлороформом. У животных в течение 10 мин после эвтаназии выпиливали эпифизы бедренной кости и помещали материал

для фиксации в 10%-ный раствор нейтрального формалина. Образцы декальцинировали в забуференном растворе ЭДТА и проводили по стандартной методике. Для изучения общей морфологической картины обзорные препараты окрашивали гематоксилином Бёмера и эозином. Распределение суммарных кислых гликозамингликанов (сГАГ) и коллагена определяли по Сиддмену и Маллори соответственно [9].

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента и считали достоверной при значении $p \leq 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

В соответствии с современной парадигмой старения, свободнорадикальной концепции принадлежит ключевая роль [4]. Установлено, что процессы свободнорадикального перекисного окисления липидов (СПОЛ) постоянно происходят в клетках различных тканей организма, и данный процесс находится под контролем системы АОЗ [1; 4; 5]. При анализе биохимических показателей плазмы крови молодых и стареющих крыс установлено, что уровень МДА и ДК у стареющих животных на 22 и 26% соответственно превышает аналогичные значения молодых крыс (рис. 1 А, Б). Полученные результаты согласуются с известными представлениями о преобладании в процессе старения катаболических процессов над анаболическими и вполне логично объясняют повышение уровня окисления у стареющих животных. Однако высокий уровень СПОЛ не является объективным отражением деструктивных процессов в организме, а показатели МДА и ДК не являются абсолютными маркерами старения. Считается, что оценка состояния физиологических процессов в стареющем организме должно основываться на оценке степени разобщения двух сопряженных процессов – пероксидации и инактивации АКМ. Исследование ключевых ферментов АОЗ в плазме крови крыс обеих групп показало, что у стареющих животных по сравнению с молодыми отмечается статистически достоверное снижение активности СОД и КАТ на 21 и 32% соответственно (рис. 1 В, Г). Результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о развитии окислительного стресса у стареющих животных. Снижение с возрастом синтетических процессов в организме не выходит за рамки существующих классических представлений геронтологии и связано, главным образом, с ограничением возможности клеток организма адекватно синтезировать ферменты АОЗ при нарастающем уровне СПОЛ.



Примечание: достоверные различия с контролем (* $p \leq 0,05$).

Рисунок 1. Содержание продуктов свободнорадикального окисления и активность ферментов антиоксидантной защиты в плазме крови крыс. А – содержание МДА; Б – содержание ДК; В – активность СОД; Г – активность КАТ.

В связи с особенностью биологии хрящевой ткани и эволюционно закрепившимся дефицитом синтеза клетками хондрогенного дифферона ферментов АОЗ она является «мишенью» для продуктов окислительного стресса. Это явилось основанием для изучения морфофункциональной характеристики суставного хряща у стареющих животных. Опираясь на публикации И.М. Зазирного (2004) о дифференциальном действии нагрузки на различные компартменты суставной поверхности коленного сустава, исследовался суставной хрящ дистального эпифиза бедренной кости латерального и медиального мыщелков. На светооптическом уровне гиалиновый хрящ стареющих крыс, покрывающий соответствующие участки эпифиза, имеет неодинаковую толщину. Результаты морфометрического анализа показали, что общая толщина суставного хряща латеральной поверхности у животных данной группы на 29% превосходит аналогичный показатель медиального мыщелка (табл. 1).

Таблица 1 – Толщина зон суставного хряща медиального и латерального мыщелков

Зона суставного хряща	Локализация	
	Медиальный мыщелок	Латеральный мыщелок
Общая толщина	123,93±11,04	174,78±13,16*
Поверхностная	15,20±3,71	29,18±3,93*
Переходная	51,32±5,87	73,54±6,04*
Базальная	57,41±11,24	72,06±8,29***

Примечание: статистически достоверные различия между показателями медиального и латерального мыщелков ($p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$)*

При детальном анализе препаратов заметно, что различия в толщине обусловлены изменением гистоархитектоники суставного хряща, выстилающего поверхности латерального и медиального мыщелков. Гиалиновый хрящ латерального мыщелка сохраняет типичное для данной гистологической структуры строение (рис. 2А). На тканевом уровне отчетливо заметны клетки поверхностной зоны, пролиферирующие клетки промежуточной зоны, которые формируют изогенные группы, а также дифференцированные клетки зоны колонковых структур. Особенностью суставного хряща медиального мыщелка является замещение клеток и межклеточного вещества зоны колонковых структур костной тканью (рис. 2Б). Обнаруженное морфологическое проявление нарушения динамического равновесия процессов хондро- и остеогенеза, с нашей точки зрения, лежит в основе объяснения гистогенетического механизма уменьшения толщины суставного хряща в данном компартменте по сравнению с латеральным мыщелком у стареющих животных. Можно полагать, что дифференциальный уровень нагрузки на различные отделы сустава должен обеспечиваться неодинаковым уровнем пролиферации клеток и синтетических процессов. При проведении гистохимических реакций основное вещество медиального мыщелка суставного хряща характеризуется слабой альцианпозитивной реакцией. Это свидетельствует о снижении функциональной активности клеток либо деструкции основного вещества под влиянием активных кислородных метаболитов и последующим замещением зоны колонковых структур хряща костной тканью. На препаратах заметно, что в области медиального мыщелка происходит снижение пролиферативной активности клеток поверхностной и промежуточной зон, снижается функциональная активность хондробластов.

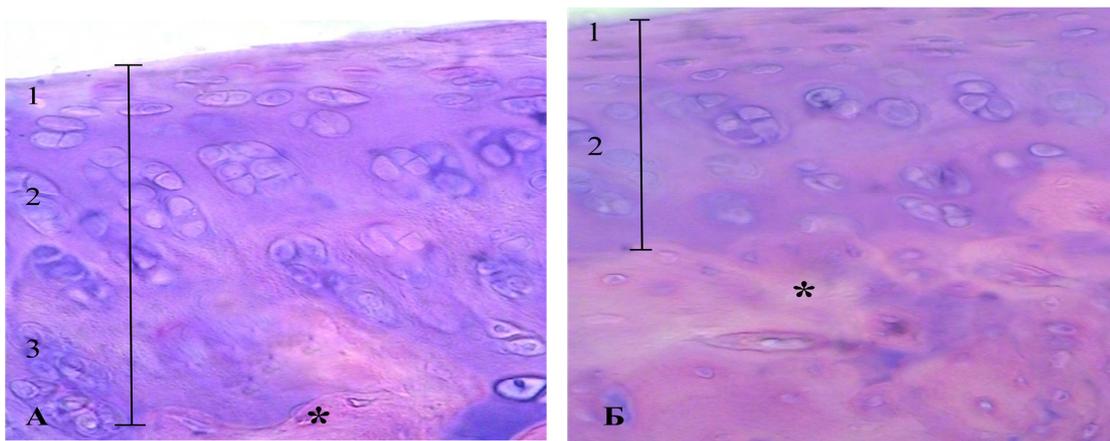


Рисунок 2. Зоны суставного хряща дистального эпифиза бедренной кости стареющих крыс. А – латерального мыщелка; Б – медиального мыщелка. 1 – поверхностная зона; 2 – переходная зона; 3 – базальная зона. Окраска гематоксилином и эозином. * – костная ткань. Ув. 40 х.

Характерной морфологической особенностью суставного хряща стареющих животных являлось формирование узур в области бесклеточной пластинки поверхностной зоны (рис. 3 А, Б). На препаратах, окрашенных по Маллори, отчетливо заметно, что межклеточное вещество поверхностной зоны гиалинового хряща стареющих крыс характеризуется изменением тинкториальных свойств. При реакции на коллаген межклеточное вещество хряща поверхностной зоны не имеет отличий от межклеточного вещества костной ткани.

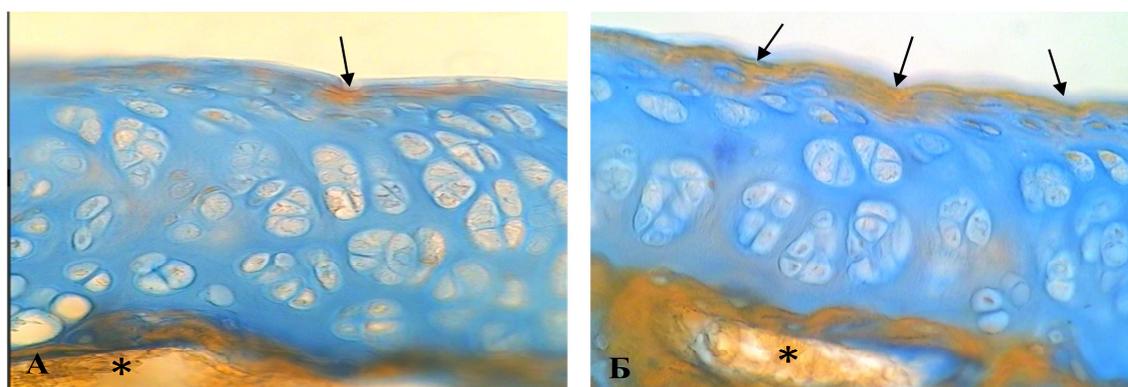


Рисунок 3. Формирование узур в области бесклеточной пластинки поверхностной зоны суставного хряща стареющих крыс. А – латерального мыщелка; Б – медиального мыщелка. Реакция на коллаген по Маллори. Стрелкой показаны узур. * – костная ткань. Ув. 40 х.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют заключить, что неравномерное распределение векторов нагрузки на латеральный и медиальный компартменты суставной поверхности эпифиза бедренной кости определяет различную структурно-функциональную организацию хряща латерального и медиального мыщелков в рамках единой суставной поверхности. По мнению В.Н. Павловой (2011), асимметричное увеличение или уменьшение его толщины рассматривается как реактивный процесс

тканевых элементов в ответ на действие механических факторов и является одним из морфологических отражений приспособительных и дегенеративных изменений суставного хряща [9]. Выявленные особенности асимметрии суставного хряща у стареющих животных имеют важное значение для понимания закономерностей повреждения структурных элементов коленного сустава в поздние периоды онтогенеза. В рамках проведенного исследования удалось показать, что при старении, когда адаптивный потенциал клеток хондрогенного дифферона снижается, выявленные морфогенетические характеристики хряща в области медиального мыщелка позволяют с большой вероятностью прогнозировать риск его травматического повреждения даже при совершенно адекватных нагрузках. Одним из важных заключений, вытекающим из результатов проведенного исследования, является утверждение о дифференциальном репаративном потенциале гиалинового хряща мыщелков дистального эпифиза бедренной кости стареющих животных.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Сорос. образоват. журн. – 2000. – № 12. – С. 13–19.
2. Гелашвили О.А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крысы // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – Т. 22, № 4. – С. 125–126.
3. Заирный И.М. Биомеханика коленного сустава с точки зрения имплантации эндопротеза [Электронный ресурс]. - 2004. - URL: <http://www.orthopedica.org/page4b.htm> (дата обращения: 10.04.2013).
4. Луцак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 8. – С. 995–1017.
5. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин и др. – Новосибирск : АРТА, 2008. – 284 с.
6. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой : метод. указания. – М. : Федеральный центр Россанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 56 с.
7. Павлова В.Н., Копьева Т.Н., Слуцкий А.И., Павлов Г.Г. Хрящ. – М. : Медицина, 1988. – 320 с.
8. Семченко В.В., Барашкова С.А., Артемьев В.Н. Гистологическая техника : учеб. пособие. – Омск, 2006. – 152 с.

9. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение / под ред. В.Н. Павловой, Г.Г. Павлова, Н.А. Шостак, Л.И. Слуцкой. – М. : Медицинское информационное агентство, 2011. – 552 с.
10. Laihia J.K. Lucigenin and linoleate enhanced chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity // Free Radic. Boil. Med., 1993. – Vol. 14. – P. 457–461.

Рецензенты:

Афанасьев Сергей Александрович, доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт кардиологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Томск.

Ефремов Анатолий Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой патофизиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск.