

УДК 616.72 – 018.3 – 007.234

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ СУСТАВНОГО ХРЯЩА В УСЛОВИЯХ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

²Новочадов В.В., ¹Гайфуллин Н.М., ²Фролов Д.М.

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, e-mail: info@fbm.msu.ru;

²ФГАОУ ВПО «Волгоградский государственный университет»,
Волгоград, e-mail: biobio@volsu.ru

В эксперименте с использованием 38 белых крыс изучено ремоделирование суставного хряща в норме и при хронической эндогенной интоксикации длительностью 30, 60 и 90 суток. Оценивали морфологию хряща с использованием шкалы Н. Mankin в модификации V.B. Kraus, подсчитывали численную плотность хондроцитов, объемные доли хряща, подлежащей костной пластинки и губчатой кости, а также их поверхностные плотности. Определяли проценты клеток, иммунопозитивных к PCNA, TRAIL и каспазе-3. В результате показано, что хроническая эндогенная интоксикация приводит к нарушениям естественной регенерации и ремоделирования хряща. Это проявляется в одновременном ускорении пролиферации и TRAIL-зависимого апоптоза клеток хондрального ряда, а также снижении содержания протеогликанов в хрящевом матриксе, в результате чего в течение 90 суток в эксперименте в коленных суставах крыс формируется умеренно выраженный остеоартроз.

Ключевые слова: эндогенные интоксикации, липополисахарид, суставной хрящ, хондроциты, остеоартроз, морфология

ARTICULAR CARTILAGE REMODELING DUE TO ENDOGENOUS INTOXICATION

²Novochadov V.V., ¹Gaifullin N.M., ²Frolov D.M.

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: info@fbm.msu.ru;

²Volgograd State University, Volgograd, e-mail: biobio@volsu.ru

The aim of study is to establish the details of cartilage remodeling due to chronic endogenous intoxication. Thirty two rats received bacterial lipopolysaccharide with tetrachlormethane or gentamycin by author's technique due to 30, 60 or 90 days. Six rats composed the control group. The spectrum of morphological methods included the estimation of cartilage morphology using Mankin – Kraus scale, the calculation of chondrocyte volume density, cartilage volume, bone plate volume, cancellous bone volume, and their surface densities, the indices of proliferation and apoptosis. The increase of endogenous toxic substances in bloodstream, monitored on oligopeptide and lipid peroxidation product dynamics, led to disorders in regeneration and remodeling of articular cartilage. The parallel arising of proliferation, TNF-dependent apoptosis, and the decrease of proteoglycan content in cartilage matrix resulted in moderate osteoarthritis formation in rat knee till 90th day of experiment.

Keywords: endogenous intoxication, lipopolysaccharide, hyaline cartilage, chondrocyte, osteoarthritis, morphology

Уникальной особенностью суставного хряща, как всех опорных тканей, является то, что его основные функциональные свойства во многом определяются наличием высокомолекулярного внеклеточного матрикса. Постоянное ремоделирование матрикса происходит за счет деятельности хондроцитов и хондробластов, регуляция функций которых непосредственно осуществляется сложным комплексом эндокринных и медиаторных механизмов, поскольку суставной хрящ не содержит сосудов и нервных окончаний [3, 10].

Множество процессов в организме сопровождаются образованием и накоплением эндогенных токсических соединений, негативные последствия избытка которых описываются как эндогенная интоксикация, а при наличии морфологических проявлений со стороны органов-мишеней (печени, легких, почек) – как эндотоксикоз [2, 5], хотя подтверждается и необходимость участия ряда подобных веществ в физио-

логических процессах [7, 8]. В развитии хронической эндогенной интоксикации (ХЭИ), помимо прямого действия токсинов, гораздо большее участие принимают компоненты вегетативной, эндокринной дисрегуляции и цитокины системного воспалительного ответа [3, 7, 14].

В связи с этим, естественно предположить, что длительно существующая ХЭИ способна напрямую или через описанные системные механизмы влиять на ремоделирование хрящевой ткани, покрывающей суставные поверхности. Практически с аналогичными процессами связывают возникновение и прогрессирование хронической дегенеративной патологии хряща, традиционно описываемой в отечественной литературе как дисметаболическое заболевание – «остеоартроз», а за рубежом – как воспалительное, osteoarthritis [3, 9, 12]. Детальная проверка этой гипотезы на настоящем этапе знаний возможна только в эксперименте.

Цель работы – установить закономерности физиологической регенерации и ремоделирования суставного хряща в условиях хронической эндогенной интоксикации, как одного из возможных факторов в развитии его дегенеративной патологии.

Материал и методы исследования

Работа была выполнена с использованием 38 белых крыс-самцов массой от 180 до 240 г, полученных из нелинейных стоков Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Протокол экспериментов соответствовал этическим нормам, изложенным в «Международном кодексе медицинской этики» (1994), Правилах лабораторной практики (GLP), Хельсинской декларации (2000) и Директивах Европейского сообщества 86/609ЕЕС. Закономерности ремоделирования хрящевой ткани были изучены у 16 крыс в условиях ХЭИ, а также у 8 животных, содержащихся в обычных условиях вивария (контрольная группа). Моделирование ХЭИ проводили по оригинальной методике [5], основанной на раздельном введении малых доз тетрахлорметана и бактериального липополисахарида. В качестве интегральных показателей развития ЭТ использовали определение в сыворотке крови концентрации олигопептидов (ОП, г/л) и продуктов свободно-радикального (перекисного) окисления липидов по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ППОЛ, мкмоль/л). Животных выводили из опыта по 5–6 особей через 30, 60 и 90 суток от начала ХЭИ передозировкой нембутала (100 мг/кг массы).

Перед изготовлением микропрепаратов проводили фиксирование костно-хрящевых фрагментов в течение 48 ч в 10%-м растворе нейтрального формалина. Затем проводили декальцинацию блоков в 4%-м растворе ЭДТА (трилона Б) в течение 10 суток и дофиксировали вновь в 10%-м растворе нейтрального формалина. После фиксации материал проводили по общепринятой гистологической методике через батарею спиртов возрастающей концентрации, хлороформ и заливали в парафин. С парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5–7 мкм, которые монтировали на предметные стекла с адгезивным покрытием. Окрашивали препараты гематоксилином и эозином по общепринятой методике, для выявления матрикса хрящевой ткани использовали окраску толуидиновым синим [1, 13].

Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение тканевой экспрессии трех маркеров. Для выявления пролиферативной активности использовали поликлональные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA, DakoCytomation, Дания). Процент иммунопозитивных клеток обозначали как пролиферативный индекс. Для выявления маркеров апоптоза использовали моноклональные антитела к TRAIL (апоптоз-индуцирующий лиганд фактора некроза опухоли) и к каспазе-3 (ключевой фермент необратимого каскада апоптоза) производства Novocastra, Великобритания. Результат обозначали, соответственно, как проапоптотический и апоптотический индексы. Все этапы исследования проводили в соответствии с протоколами производителей, используя вариант температурной демаскировки антигенов, использовали позитивные и негативные контроли антигенов, а также негативные контроли антител.

Морфометрическое исследование было проведено в соответствии с принципами системного количественного анализа, для этого использовали аппаратно-компьютерный комплекс «Видеотест-Морфо» 3.0 (Россия). Использовали шкалу полуколичественной оценки Н. Mankin в модификации V.V. Kraus et al. [11], учитывающей структуру поверхности хряща (0–8 баллов), содержание протеогликанов в окраске толуидиновым синим (0–6), плотность расположения хондроцитов и кластеризацию (0–3), целостность остеохондральной линии (0–1) и наличие остеофитов (0–9 баллов). Оценки по критериям выставляли два исследователя по четыре микропрепарата одного и того же случая каждый. Подсчитывали численную плотность хондроцитов в глубоких зонах хряща (1/мм²), объемные доли хряща, подлежащей костной пластинки и губчатой кости на стандартном сечении глубиной в 10 мм (ОД, мм³/мм³), а также их поверхностные плотности (1/мм) [13].

Обработку количественных данных проводили непосредственно из общей матрицы данных Excel 7.0 (Microsoft, USA) с привлечением возможностей программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) с учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Для анализа различий между выборками использовали критерий Манна-Уитни. Проводили анализ корреляционной зависимости между отдельными морфометрическими и иммуногистохимическими показателями [4].

Результаты исследования и их обсуждение

На всех сроках опыта в сыворотке крови животных с ХЭИ определялись высокие концентрации ОП. Они составляли $260,3 \pm 31,5$ мг/л на 30-е сутки, $289,4 \pm 33,5$ мг/л – на 60-е сутки и $310,5 \pm 37,4$ мг/л – на 90-е сутки, в сравнении со $115,5 \pm 16,8$ мг/л у животных контрольной группы (все $P < 0,01$). Параллельно увеличивалось содержание ППОЛ в сыворотке крови: до $9,33 \pm 0,70$ ммоль/л на 30-е сутки, до $10,12 \pm 0,93$ ммоль/л – на 60-е сутки, до $12,07 \pm 1,03$ ммоль/л – на 90-е сутки, в сравнении с $5,33 \pm 0,43$ ммоль/л у животных контрольной группы (все $P < 0,01$). Содержание маркеров ХЭИ было повышено, таким образом, в 1,7–2,7 раза (рис. 1).

Данные количественного гистоморфологического анализа приведены в табл. 1, количественные данные о выявлении маркеров пролиферации и апоптоза – в табл. 2.

Развитие ХЭИ сопровождалось, начиная с 30-х суток эксперимента, появлением небольших неровностей поверхности хряща, к 90-м суткам – явлениями поверхностного растрескивания и разволокнения.

В глубоких зонах хряща выявлялась гиперцеллюлярность, но без явной кластеризации хондроцитов, изменения остеохондральной линии были минимальными, единичные остеофиты выявлялись только

к 90-м суткам опыта. В окраске толуидиновым синим показано снижение содержания протеогликанов матрикса до половины поверхностной зоны хряща к 30-м суткам ХЭИ, до половины всей толщины хряща – к 90-м суткам. Все это позволяло отнести обнаруженные изменения к умеренным

проявлениям остеоартроза, что подтверждалось результатами оценки по полуколичественной шкале. В контрольной группе в единичных случаях могла быть выставлена оценка в 1–2 балла, но на 30-е сутки оценка возрастала почти до 5 баллов, а к 90-м суткам – свыше 10.

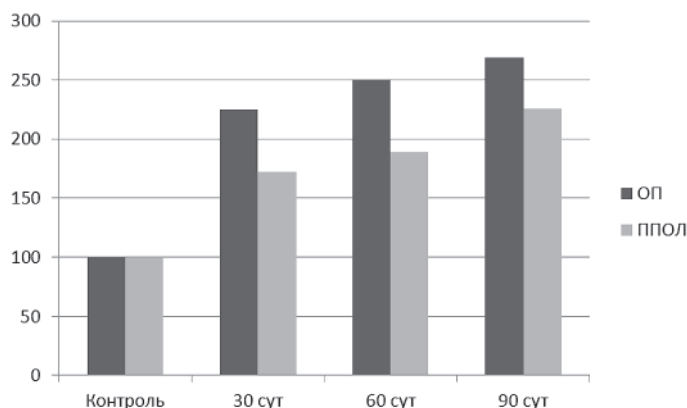


Рис. 1. Относительное увеличение содержания интегральных маркеров ХЭИ в сыворотке крови крыс опытной группы (100% – показатели животных контрольной группы)

Таблица 1

Основные морфометрические показатели суставного хряща в норме и при хронической эндогенной интоксикации (M ± m)

Группа	Сроки эксперимента			
	Контроль	30 суток	60 суток	90 суток
Оценка по шкале V.B. Краус, баллов	0,2 ± 0,1	4,8 ± 0,6*	7,9 ± 0,8*	10,7 ± 0,9
Численная плотность хондроцитов в глубоких зонах хряща, 1/мм ³	54,3 ± 3,6	68,3 ± 4,2*	75,2 ± 4,0*	61,9 ± 3,7*
Объемная доля хрящевой ткани, мм ³ /мм ³	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,22 ± 0,02*
Объемная доля подлежащей костной пластинки, мм ³ /мм ³	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,27 ± 0,03*
Объемная доля губчатой кости, мм ³ /мм ³	0,45 ± 0,03	0,47 ± 0,05	0,54 ± 0,07	0,51 ± 0,05
Поверхностная плотность хряща, 1/мм	1,15 ± 0,08	1,22 ± 0,10	1,47 ± 0,12*	1,53 ± 0,14*
Поверхностная плотность костной пластинки, 1/мм	1,73 ± 0,13	1,80 ± 0,14	2,64 ± 0,21*	2,93 ± 0,23*
Поверхностная плотность губчатой кости, 1/мм	3,12 ± 0,26	3,15 ± 0,30	7,09 ± 0,54*	7,44 ± 0,59*

Таблица 2

Экспрессия маркеров клеточной пролиферации и апоптоза клеток суставного хряща в норме и при хронической эндогенной интоксикации (M ± m)

Группа	Сроки эксперимента			
	Контроль	30 суток	60 суток	90 суток
Пролиферативный индекс (по PCNA)	2,24 ± 0,18	4,33 ± 0,34 *	6,45 ± 0,45 *	5,71 ± 0,36 *
Проапоптотический индекс (по TRAIL)	1,55 ± 0,11	6,60 ± 0,54 *	7,05 ± 0,51 *	5,92 ± 0,42 *
Апоптотический индекс (по каспазе-3)	0,21 ± 0,03	2,51 ± 0,19 *	2,48 ± 0,22 *	3,69 ± 0,32 *

Численная плотность хондробластов и хондроцитов в глубоких слоях хряща возрастала к 30-м суткам в 1,25 раза ($P < 0,05$), к 60-м суткам – в 1,38 раза ($P < 0,05$), в дальнейшем несколько уменьшаясь. ОД хряща уменьшалась за время эксперимента в 1,41 раза ($P < 0,05$) при параллельном уве-

личении ОД костной пластинки в 1,50 раза ($P < 0,01$), так что ОД губчатой кости существенно не изменялась. За счет явлений разволокнения, а также ремоделирования глубоких слоев хряща и субхондральной кости поверхностные плотности всех изучаемых границ достоверно возрастали: в 1,33 раза

для хряща, в 1,69 раза – для подлежащей кости, в 2,38 раза – для губчатой кости.

При определении пролиферативной активности PCNA-позитивные хондроциты у крыс контрольной группы составляли в суставном хряще чуть более 2% от всех клеток. При ХЭИ их количество возрастало к 30-м суткам в 1,9 раза, к 60-м суткам – в 2,9 раза и оставалось почти на этом уровне к 90-м суткам эксперимента. TRAIL-позитивных клеток в суставном хряще крыс контрольной группы

было около 1,5%, при ХЭИ величина этого показателя возрастала более чем в 4 раза с максимумом на 60-е сутки (более 7%). Клеток, позитивных к каспазе-3, было при ХЭИ меньше (порядка 2,5–3,7%), но эти значения более чем в 10 раз превышали аналогичные в суставном хряще крыс контрольной группы. Соотношение апоптоза и пролиферации в суставном хряще при ХЭИ, таким образом, явно смещалось в сторону запрограммированной гибели хондроцитов (рис. 2).

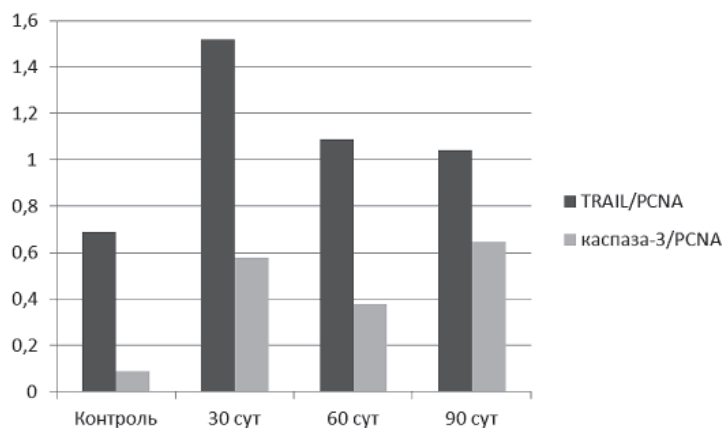


Рис. 2. Отношения апоптотического и пролиферативного процессов в суставном хряще крыс опытной группы

Выявленные изменения свидетельствуют о том, что при ХЭИ суставной хрящ, как и многие уже изученные высокоспециализированные тканевые системы, становится мишенью эндогенных токсических соединений и вызываемых ими медиаторных, нейро-эндокринных и метаболических сдвигов в организме. Происходящие изменения можно описать с позиций дегенеративной патологии хряща, то есть как проявления остеоартроза. Ускорение пролиферации и обновления матрикса при этом явно не восполняет прогрессирующую убыль клеточных элементов и протеогликанов в суставном хряще. Большое количество TRAIL-позитивных хондроцитов на поздних сроках опыта свидетельствует о возрастании потенциальной их уязвимости к любым иным воздействиям, сопровождающимся активацией провоспалительного цитокинового каскада, и является залогом прогрессирования патологического процесса.

Заключение

При хронической эндогенной интоксикации ткань суставного хряща становится мишенью эндогенных токсических соединений и опосредованных ими системных воздействий (прежде всего – медиаторов цитокинового каскада), что приводит к на-

рушениям естественной регенерации и ремоделирования ткани. Это проявляется в одновременном ускорении пролиферации и TRAIL-зависимого апоптоза клеток хряща, а также снижении содержания протеогликанов в хрящевом матриксе, в результате чего в течение 90 суток в эксперименте в коленных суставах крыс формируется умеренно выраженный остеоартроз.

Список литературы

1. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
2. Индивидуальные различия органов-мишеней и иммунной системы при экспериментальном эндотоксикозе / О.В. Макарова, А.М. Яблонская, Л.П. Михайлова, Н.В. Яглова, Д.И. Солдатов // Архив патологии. – 2009. – № 4. – С. 37–42.
3. Маланин Д.А., Писарев В.Б., Новочадов В.В. Восстановление поврежденных хряща в коленном суставе. – Волгоград: Волгогр. н. Изд-во, 2010. – 518 с.
4. Новиков Д.А., Новочадов В.В. Статистические методы в экспериментальной биологии и медицине. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2005. – 84 с.
5. Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2008. – 320 с.
6. Полякова Л.В., Калашникова С.А., Щеголев А.И. Морфологическая характеристика эндокринных органов при хронической эндогенной интоксикации // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151, №2. – С. 211–214.

7. Яковлев М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека // Физиология человека. – 2003. – Т. 29. – № 4. – С. 98–109.

8. Beloborodova N.V., Osipov G.A. Small molecules originating from microbes (SMOM) and their role in microbes-host relationship // *Microb. Ecol. Health Disease*. – 2000. – Vol. 12, № 1. – P. 12–21.

9. Blagojevic M., Jinks C., Jeffery A., Jordan K.P. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis // *Osteoarthritis Cartil.* – 2010. – Vol. 18. – P. 24–33.

10. Goldring M. B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* – 2012. – Vol. 4, № 4. – P. 269–285.

11. Kraus V. B., Huebner J. L., DeGroot J., Bendele A.A. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig // *Osteoarthritis Cartil.* – 2010. – Vol. 18, Suppl. 3. – P. 35–52.

12. Patra D., Sandell L. J. Recent advances in biomarkers in osteoarthritis // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2011. – Vol. 23. – P. 465–470.

13. Pritzker K.P., Gay S., Jimenez S.A., Ostergaard K., Pelletier J.P., Revell P.A. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging // *Osteoarthritis Cartil.* – 2006. – Vol. 14. – P. 13–29.

14. Wei S.D., Li J.Z., Liu Z.J. et al. Dexamethasone attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by downregulating glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand in Kupffer cells // *Hepato. Res.* – 2011. – Vol. 41. – №.10. – P. 989–999.

References

1. Korzhevskiy D.E., Gilyarov A.V. *Osnovnyy gistologicheskoyechniki* [The basis of histological techniques]. SPb., Speclit, 2010, 95 p.

2. Makarova O.V., Yablonskaya A.M., Mikhaylova M.P., Yaglova N.V., Soldatov D.I. // *Arkhiv patologii* [Archives of Pathology]. 2009. no 4. pp. 37–42.

3. Malanin D.A., Pisarev V.B., Novochadov V.V. *Vostanovleniyepovrezhdeniykhryascha vkolennomsustave* [Restoration of knee cartilage damage]. Volgograd: VNI, 2010. 518 p.

4. Novikov D.A., Novochadov V.V. *Статистические методы в экспериментальной биологии и медицине*. [Statistical methods of the experimental biology and medicine]. Volgograd: VSMU, 2005. 84 p.

5. Pisarev V.B., Bogomolova N.V., Novochadov V.V. *Bakterialnyendotoksikozvzglyadpatologa* [Bacterial endotoxemia: a look of pathologist]. Volgograd: VSMU, 2008. 320 p.

6. Polyakova L.V., Kalashnikova S.A., Schegolev A.I. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Vol. 151, no. 2. pp. 211–214.

7. Yakovlev M.Yu. // *Fiziologiya tcheloveka*. 2003. Vol. 29. pp. 98–109.

8. Beloborodova N. V., Osipov G. A. *Microb. Ecol. Health Disease*. 2000. Vol. 12. pp. 12–21.

9. Blagojevic M., Jinks C., Jeffery A., Jordan K.P. *Osteoarthritis Cartil.* 2010. Vol. 18. pp. 24–33.

10. Goldring M.B. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2012. Vol. 4. pp. 269–285.

11. Kraus V.B., Huebner J.L., DeGroot J., Bendele A.A. *Osteoarthritis Cartil.* 2010. Vol.18, Suppl. 3. pp. 35–52.

12. Patra D., Sandell L.J. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2011. Vol. 23. pp. 465–470.

13. Pritzker K.P., Gay S., Jimenez S.A., Ostergaard K., Pelletier J.P., Revell P.A. *Osteoarthritis Cartil.* 2006. Vol. 14. pp. 13–29.

14. Wei S.D., Li J.Z., Liu Z.J., Chen Q., Chen Y., Chen M., Gong J.P. *Hepato. Res.* 2011. Vol. 41. pp. 989–999.

Рецензенты:

Мальков П.Г., д.м.н., профессор, заведующий централизованной окружной лабораторией патоморфологии и цитологии ГБУЗ Консультативно-диагностический центр №6 Департамента здравоохранения Москвы, г. Москва;

Андреева Ю.Ю., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отделения патологической анатомии МНИОИ им. П.А. Герцена Минздрава России, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 07.11.2012.