

Оригінальні дослідження УДК 616.72-018.3-018-053.8-092,906:616.395+612.392.3:611.316.018.094

ЕЛЕКТРОННО–МІКРОСКОПІЧНА ТА ГІСТОЛОГІЧНА ОЦІНКА СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ СУГЛОБОВОГО ХРЯЦА КОЛІННОГО СУГЛОБА ПІСЛЯ МНОЖИННОЇ СКЕЛЕТНОЇ ТРАВМИ**А.С. Ткаченко, Г.Ф. Ткач**

Сумський державний університет, м. Суми, Україна

Ключові слова:

електронна мікроскопія, суглобовий хрящ, щури, експериментальна множинна скелетна травма.

Буковинський медичний вісник. 2020. Т.24, № 3 (95), С. 114-119.

DOI:

10.24061/2413-0737.XXIV.3.94.2020.81

E-mail:artemstkachenko@ukr.net
tkachgf732@gmail.com**Мета роботи** – встановити мікро- та ультрамікроскопічні особливості суглобового хряща колінного суглоба у щурів за умов множинної скелетної травми діафізів стегнової та великогомілкової кісток.**Матеріал і методи.** Експеримент проведено на 40 білих лабораторних щурах-самцях зрілого віку, розподілених на дві групи: I – контрольна група (20 щурів); II – дослідна група (20 щурів). Щурам II групи одночасно змодельований дірчастий дефект у діафізі великогомілкової та стегнової кісток. Дослідження суглобових поверхонь обох кісток проводили через 6 місяців після завдання травми. Світлову мікроскопію проводили з використанням мікроскопа Олутрис ВН-2 (Японія), Ультрамікроскопічне дослідження проводили з використанням трансмісійного електронного мікроскопа (JEM-1230, JEOL, Japan) та растрового електронного мікроскопа «SEO-SEM Inspect S50-B».**Результати.** За умов множинної скелетної травми діафізів стегнової та великогомілкової кісток найбільш вразливим виявився суглобовий хрящ проксимального епіфіза великогомілкової кістки. При цьому деструктивні перетворення розвилися в усіх його зонах. Глибока зона майже повністю була заміщена кістковою тканиною із залишками хондроцитів. У суглобовому хрящі дистального епіфіза стегнової кістки деструктивні зміни та руйнування (загибель) хондроцитів також відбулися, але у меншому ступені. Суглобова поверхня була більш збереженою, не мала руйнівних змін порівняно із суглобовою поверхнею проксимального епіфіза великогомілкової кістки. Проміжна та глибока зона добре простежувалася, але містила хондроцити, які знаходились у різних функціональних станах.
Висновки. Виявлені структурні зміни суглобового хряща колінного суглоба вказують на високий ризик прогресування деградації суглобового хряща та розвитку остеоартрозу.**Ключевые слова:**

електронная микроскопия, суставной хрящ, крысы, экспериментальная множественная скелетная травма.

Буковинский медицинский вестник. 2020. Т.24, № 3 (95), С. 114-119.

ЭЛЕКТРОННО–МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ И ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ СУСТАВНОГО ХРЯЩА КОЛЕННОГО СУСТАВА ПОСЛЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ СКЕЛЕТНОЙ ТРАВМЫ**А.С. Ткаченко, Г.Ф. Ткач****Цель работы** – установить микро- и ультрамикроскопические особенности суставного хряща колленного сустава у крыс в условиях множественной скелетной травмы диафизов бедренной и большеберцовой костей.**Материал и методы.** Эксперимент проведен на 40 белых лабораторных крысах-самцах зрелого возраста, разделенных на две группы: I - контрольная группа (20 крыс) II - экспериментальная

Оригінальні дослідження

група (20 крыс). Крысам II группы был одновременно смоделирован дырчатый дефект диафиза большеберцовой и бедренной костей. Исследование суставных поверхностей обеих костей проводили через 6 месяцев после нанесения травмы. Световую микроскопию проводили с использованием микроскопа Olympus BH-2 (Япония), ультрамикроскопические исследования проводили с использованием трансмиссионного электронного микроскопа (JEM-1230, JEOL, Japan) и растрового электронного микроскопа «SEO-SEM Inspect S50-B».

Результаты. В условиях множественной скелетной травмы диафизов бедренной и большеберцовой костей наиболее уязвимым оказался суставной хрящ проксимального эпифиза большеберцовой кости. Причем деструктивные преобразования развились во всех его зонах. Глубокая зона почти полностью была замещена костной тканью с остатками хондроцитов. В суставном хряще дистального эпифиза бедренной кости деструктивные изменения и разрушения хондроцитов также произошли, но в меньшей степени. Суставная поверхность была более сохранной, не было разрушительных изменений по сравнению с суставной поверхностью проксимального эпифиза большеберцовой кости. Промежуточная и глубокая зона хорошо прослеживалась, но содержала хондроциты, которые находились в разных функциональных состояниях.

Выводы. Выявленные структурные изменения суставного хряща коленного сустава указывают на высокий риск прогрессирования дегенерации суставного хряща и развития остеоартроза.

Key words: electron microscopy, articular cartilage, rats, experimental multiple skeletal trauma.

Bukovinian Medical Herald. 2020. V.24, № 3 (95). P. 114-119.

ELECTRON MICROSCOPIC AND HISTOLOGICAL EVALUATION OF STRUCTURAL COMPONENTS OF THE ARTICULAR CARTILAGE OF THE KNEE JOINT AFTER MULTIPLE SKELETAL TRAUMA

A.S. Tkachenko, G.F. Tkach

Objective – to determine the micro- and ultramicroscopic features of articular cartilage of the knee joint in rats under conditions of multiple skeletal trauma of the femoral and tibial diaphysis.

Material and methods. The experiment was performed on 40 white laboratory mature male rats, divided into 2 groups: I – control group (20 rats); II - study group (20 rats). Group II rats were simultaneously simulated the holey defect in the femoral and tibial diaphysis. The study of the articular surfaces of both bones was performed 6 months after the injury. Light microscopy was performed using an Olympus BH-2 microscope (Japan), Ultramicroscopic examination was performed using a transmission electron microscope (JEM-1230, JEOL, Japan) and a scanning electron microscope "SEO-SEM Inspect S50-B".

Results. An articular cartilage of the proximal tibial epiphysis was the most vulnerable under conditions of multiple skeletal trauma of the femoral and tibial diaphyses. Moreover, the destructive transformations have developed in all its zones. The deep zone was almost completely replaced by bone tissue with remnants of chondrocytes. In the articular cartilage of the distal epiphysis of the femur, the destructive changes and destruction (death) of chondrocytes also occurred but to a lesser extent. The articular surface was more remain, there were no destructive changes in comparison with the articular surface of the proximal epiphysis of the tibia. The intermediate

and deep zone was well traced but contained chondrocytes which were in different functional states.

Conclusions. *The identified structural changes in the articular cartilage of the knee joint indicate the high risk of progression of articular cartilage degradation and the development of osteoarthritis.*

Вступ. Патологія кістково-м'язової системи належить до найбільш поширених захворювань, що турбують людей у сучасному суспільстві в усьому світі. За даними ВООЗ, смертність від травматичних ушкоджень посідає третє місце після серцево-судинних та онкологічних захворювань і має тенденцію до зростання. Пошкодження нижньої кінцівки є однією із найтяжчих травм скелета людини, що зумовлено його анатомічною та функціональною особливістю [1]. Травми колінного суглоба становлять до 14 % від загальної кількості уражень [2]. Остеоартроз є третім із найбільш поширених діагнозів, які виставляють лікарі загальної практики хворим літнього віку, що є причиною передчасної втрати працездатності [3].

Надмірні навантаження на суглобові поверхні, як поодинокі (гострий вплив), так і повторювані (кумулятивне контактне напруження), можуть викликати зміни в суглобовому хрящі та розвиток остеоартрозу як наслідок прямої травми на колінний суглоб [4]. Посттравматичний остеоартрит, як результат травми суглоба, викликає у багатьох мільйонів людей біль протягом усього життя і призводить до інвалідності [5-10].

Значна поширеність остеоартрозу, численні форми потенційного лікування та недостатність доказів, невизначеність щодо впливу травми кінцівок на можливі зміни в суглобовому хрящі, що можуть бути пусковими факторами на розвиток гонартрозу, підтверджують актуальність подальшого дослідження.

Мета дослідження – встановити мікро- та ультрамікроскопічні особливості суглобового хряща колінного суглоба у щурів за умов множинної скелетної травми діяфізів стегнової та великогомілкової кісток.

Матеріал і методи

Експериментальне дослідження проведено на 40 білих лабораторних щурах-самцях віком 7–9 місяців, розподілених на дві групи: I – контрольна, для проведення коректного порівняльного аналізу одержаних даних (20 щурів); II – тварини з множинною скелетною травмою діяфізів стегнової та великогомілкової кісток (20 щурів).

Піддослідних тварин доглядали відповідно до загальноприйнятих рекомендацій, вимог та положень щодо догляду за лабораторними тваринами: Гельсінкська декларація Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000); Положення «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург,

1985)).

Щурам II групи одночасно змодельований дірчастий дефект діяфізів стегнової та великогомілкової кісток лівої кінцівки з метою подальшого дослідження особливостей суглобових поверхонь дистального епіфіза стегнової кістки та проксимального епіфіза великогомілкової кістки на мікро- та ультраструктурному рівнях. Оперативне втручання проводили в асептичних умовах під кетаміновим наркозом (ксилазин (3 мг/кг) та кетамін (8 мг/кг)). Робили розрізи завдовжки 0,8–1,5 см уздовж переднього краю великогомілкової кістки та по бічній поверхні стегна з подальшим тупим розведенням м'язів. За допомогою портативної зуботехнічної бормашини стерильними борами (d 1,6 мм) при малих обертах з охолодженням у діяфізі великогомілкової та стегнової кісток формували отвір до кістково-мозкового каналу. З експерименту тварин виводили шляхом передозування тіопенталового наркозу (4мг/100 г маси тіла) через 6 місяців після завдання травми.

З метою вивчення мікроскопічної будови відпрепаровані колінні суглоби травмованої кінцівки фіксували в 10 % розчині формаліну, потім проводили демінералізацію в 5 % водному розчині Трилону Б. Далі зразки зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафін. Потім з отриманих препаратів робили зрізи на санному мікроскопі MC-2 товщиною 4–6 мкм. Забарвлення проводили гематоксиліном і еозином, світлову мікроскопію – з використанням мікроскопа Olympus BH-2 (Японія).

Для ультрамікроскопічного дослідження з використанням трансмісійної електронної мікроскопії шматочки суглобової поверхні дистального епіфіза стегнової кістки та проксимального епіфіза великогомілкової кістки видаляли та фіксували у 2,5 % розчині глутарового альдегіду на 0,2 М какодилатному буфері з рН = 7,2 за температури +4 °C і постфіксували в 1 % розчині OsO₄ впродовж 4 годин за температури +4 °C, дегідрували за допомогою серії етилового спирту висхідної концентрації. Після витримки в пропіленоксиді зразки заключали в суміш епоксидних смол. Робили ультратонкі зрізи (40-60 нм) та контрастували їх уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом та досліджували з використанням трансмісійного електронного мікроскопа (JEM-1230, JEOL, Japan).

Для ультрамікроскопічного дослідження з використанням растрової електронної мікроскопії суглобові поверхні видаляли та фіксували у 2,5 %

Оригінальні дослідження

розчині глутарового альдегіду на 0,2 М какодилатному буфері з pH = 7,2 і постфіксували в 1 % розчині OsO₄, дегідратували за допомогою серії етилового спирту висхідної концентрації. Фіксували на графітових столиках та висушували на повітрі. Перед дослідженням зразки напилювали золотом у вакуумному універсальному пості «ВУП-5» та вивчали в растровому електронному мікроскопі «SEO-SEM Inspec S50-B».

Результати дослідження та їх обговорення. Цитоархітектоніка та позиційна організація суглобового хряща, як дистального епіфіза стегнової, так і проксимального епіфіза великогомілкової кістки, була порушеною. Кількість збережених хондроцитів значно знизилась. Поверхнева зона суглобового хряща проксимального епіфіза великогомілкової кістки мала нерівні контури, місця розволокнення колагенових волокон та залишки гіперхромних ядер та зруйнованих клітин. Проміжна зона хряща містила хондроцити, які перебували на різних стадіях руйнування. Цитоплазма багатьох клітин була заповнена численними базофільними включеннями, вакуолями, фрагментованими ядрами та органелами. Також спостерігались гіпертрофовані багатоядерні хондроцити та конгломерати клітинних залишків. Глибока зона майже повністю заміщена кістковою тканиною ьз залишками хондроцитів. Забарвлення хрящового матриксу проміжної та глибокої зон було неоднорідним. Напрямок колагенових волокон дещо різний, що можливо залежало від навантаження, яке здійснено на кістку (рис. 1А).

У тангенціальному шарі поверхневої зони дистального епіфіза стегнової кістки розподіл клітин нерівномірний. Спостерігалися ділянки скупчення клітин та клітини, які розташовувалися відносно віддалено одна від одної. У проміжній та глибокій зонах спостерігали ділянки без хондроцитів та нерівномірного забарвлення. Проміжна зона хряща містила хондроцити, які знаходились у різних функціональних станах. Частина хондроцитів у цих зонах мала розширену, вакуолізовану цитоплазму, численні гіперхромні включення та фрагментовані ядра. Частина хондроцитів була морфологічно збереженою. Демаркаційна лінія глибокої зони порушена, але місцями добре візуалізувалася (рис. 2А).

При електронно-мікроскопічному дослідженні суглобового хряща проксимального епіфіза великогомілкової кістки визначаються хондроцити, які зазнали повної деструкції. Плазмолема клітин зруйнована, цитоплазматичні відростки фрагментовані. Ядра та органели не візуалізувалися. На місці цитоплазми спостерігалися високоосмієфільні залишки цитоплазматичного та ядерного матеріалу. Навколоклітинний простір був розширеним. Колагенові волокна хрящового матриксу навколо таких клітин розміщувалися різнонаправлено, були тонкими та однорідними (рис. 1Б).

При електронно-мікроскопічному дослідженні суглобового хряща дистального епіфіза стегнової кістки хондроцити також зазнали деструктивних змін. Плазмолема клітин була збереженою, але цитоплазматичні відростки, ядра та органели не візуалізувалися. Лише спостерігалися поодинокі розширені цистерни ендоплазматичної сітки та високоосмієфільні включення. Колагенові волокна хрящового матриксу розміщувалися більшою мірою однонаправлено, були тонкими та однорідними (рис. 2Б).

При скануванні поверхні суглобового хряща проксимального епіфіза великогомілкової кістки спостерігали значну деформацію суглобової поверхні. Відзначалося накопичення деградованих

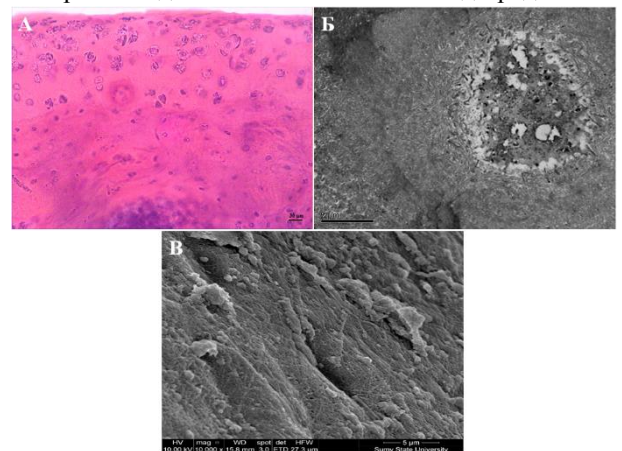


Рис. 1. Суглобовий хрящ проксимального епіфіза великогомілкової кістки щура дослідної групи через 6 місяців за умов множинної скелетної травми діяфізів стегнової та великогомілкової кісток. А – забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400. Б – контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. В – електронна сканограма

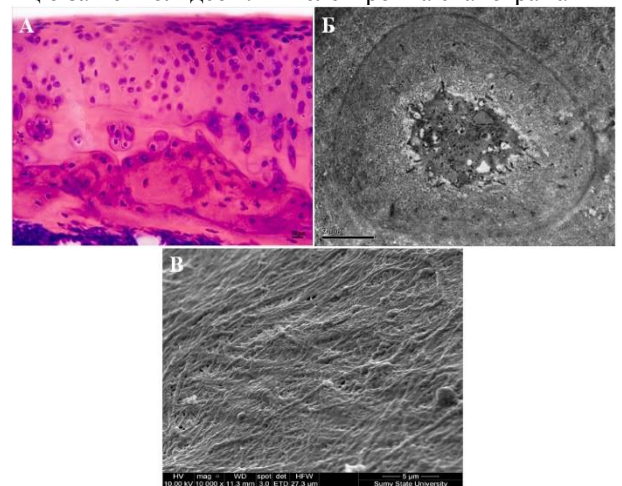


Рис. 2. Суглобовий хрящ дистального епіфіза стегнової кістки щура дослідної групи через 6 місяців за умов множинної скелетної травми діяфізів стегнової та великогомілкової кісток. А – забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. х 400. Б – контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом. В – електронна сканограма

мас матриксу, спостерігалось розрідження волокон. Крім того, поверхня мала глибокі заглибини та випинання, у яких відзначалися пори та щілини різного діаметра (див. рис. 1В).

При скануванні поверхні дистального епіфіза стегнової кістки виявлено незначні її заглибини, дещо розріджений матрикс поверхні та розширені пори. Щілин та розривів не спостерігалось. Відзначалися незначні ділянки скупчення деградованих мас матриксу на його поверхні. Крім того, поверхня мала періодичні вдавлення та випинання (див. рис. 2В).

Висновки

1. За умов множинної скелетної травми діяфізів стегнової та великогомілкової кісток найбільш вразливим виявився суглобовий хрящ проксимального епіфіза великогомілкової кістки, причому деструктивні перетворення розвилися в усіх його зонах, а глибока зона майже повністю заміщена кістковою тканиною із залишками хондроцитів.

2. У суглобовому хрящі дистального епіфіза стегнової кістки спостерігаються деструктивні зміни та руйнування хондроцитів, але в меншому ступені, порівняно з проксимальним епіфізом, а суглобова поверхня була більш збереженою, не мала руйнівних змін.

3. Проміжна та глибока зони добре простежуються, але містять хондроцити різних функціональних станів, що створює високий ризик для прогресування деградації суглобового хряща та розвитку остеоартрозу.

Перспективи подальших досліджень

Наші подальші дослідження спрямовані на вивчення особливостей суглобового хряща колінного суглоба в шурів за умов окремої травми діяфізів стегнової та великогомілкової кістки з використанням растрової та трансмісійної електронної мікроскопії.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана згідно з планом наукових досліджень Сумського державного університету МОН України і є складовою частиною науково-дослідної теми кафедри морфології Сумського державного університету МОН України «Морфофункціональні аспекти порушення гомеостазу організму» (номер державної реєстрації 0118U006611).

Список літератури

- Lyndin M, Gluschenko N, Sikora V, Lyndina Y, Huryavenko N, Tkach G, et al. Morphofunctional features of articular cartilage structure. *Folia Med Cracov.* 2019;59(3):81-93. DOI: 10.24425/fmc.2019.131138.
- Xu Yu, Li Q, Shen T, Su P, Zhu Ya. Early Diagnosis and Treatment of Trauma in Knee Joints Accompanied With Popliteal Vascular Injury. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):9421-29.
- Bruyère O, Cooper C, Pelletier J, Branco J, Brandi M, Guillemin F, et al. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: A report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and

Osteoarthritis (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum.* 2014;44(3):253-63. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2014.05.014.

4. Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, et al. Post-traumatic osteoarthritis: Improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res.* 2011;29(6):802-9. DOI: 10.1002/jor.21359.

5. Brown TD, Johnston JC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *J Orthop Trauma.* 2006;20(10):739-44. DOI: 10.1097/01.bot.0000246468.80635.ef.

6. McKinley TO, Borrelli J Jr, D'Lima DD, Furman BD, Giannoudis PV. Basic science of intra-articular fractures and posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Trauma.* 2010;24(9):567-70. DOI: 10.1097/BOT.0b013e3181ed298d.

7. Bhatia D, Bejarano T, Novo M. Current Interventions in the Management of Knee Osteoarthritis. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5(1):30-8. DOI: 10.4103/0975-7406.106561.

8. Pathria MM, Chung CB, Resnick DL. Acute and stress-related injuries of bone and cartilage: pertinent anatomy, basic biomechanics, and imaging perspective. *Radiology.* 2016;280(1):21-38. DOI: 10.1148/radiol.16142305.

9. Sun Q, Fan G, Li X, Gong J, Ge W, Cai M. Relationship Between Femur and Femoral Arteries for Identifying Risk Factors for Vascular Injury. *Med Sci Monit.* 2017;23:1733-40. DOI: 10.12659/MSM.900252.

10. Brandt KD, Dieppe P, Radin EL. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008;34(3):531-59. DOI: 10.1016/j.rdc.2008.05.011.

References

- Lyndin M, Gluschenko N, Sikora V, Lyndina Y, Huryavenko N, Tkach G, et al. Morphofunctional features of articular cartilage structure. *Folia Med Cracov.* 2019;59(3):81-93. DOI: 10.24425/fmc.2019.131138.
- Xu Yu, Li Q, Shen T, Su P, Zhu Ya. Early Diagnosis and Treatment of Trauma in Knee Joints Accompanied With Popliteal Vascular Injury. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):9421-29.
- Bruyère O, Cooper C, Pelletier J, Branco J, Brandi M, Guillemin F, et al. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: A report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum.* 2014;44(3):253-63. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2014.05.014.
- Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, et al. Post-traumatic osteoarthritis: Improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res.* 2011;29(6):802-9. DOI: 10.1002/jor.21359.
- Brown TD, Johnston JC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of prevalence, and burden of disease. *J Orthop Trauma.* 2006;20(10):739-44. DOI: 10.1097/01.bot.0000246468.80635.ef.
- McKinley TO, Borrelli J Jr, D'Lima DD, Furman BD, Giannoudis PV. Basic science of intra-articular fractures and posttraumatic osteoarthritis. *J Orthop Trauma.* 2010;24(9):567-70. DOI: 10.1097/BOT.0b013e3181ed298d.
- Bhatia D, Bejarano T, Novo M. Current Interventions in the Management of Knee Osteoarthritis. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5(1):30-8. DOI: 10.4103/0975-7406.106561.
- Pathria MM, Chung CB, Resnick DL. Acute and stress-related injuries of bone and cartilage: pertinent anatomy, basic

Оригінальні дослідження

biomechanics, and imaging perspective. Radiology. 2016;280(1):21-38. DOI: 10.1148/radiol.16142305.

9. Sun Q, Fan G, Li X, Gong J, Ge W, Cai M. Relationship Between Femur and Femoral Arteries for Identifying Risk Factors for Vascular Injury. Med Sci Monit. 2017;23:1733-40.

DOI: 10.12659/MSM.900252.

10. Brandt KD, Dieppe P, Radin EL. Etiopathogenesis of osteoarthritis. Rheum Dis Clin North Am. 2008;34:(3)531-59. DOI: 10.1016/j.rdc.2008.05.011.

Відомості про авторів

Ткаченко Артем Сергійович – аспірант кафедри морфології Сумського державного університету, м. Суми, Україна.

Ткач Геннадій Федорович – д-р. мед. наук, проф. кафедри морфології Сумського державного університету, м. Суми, Україна.

Сведения об авторах

Ткаченко Артём Сергеевич – аспирант кафедры морфологии Сумского государственного университета, г. Сумы, Украина.

Ткач Геннадий Федорович, – д-р. мед. наук., проф. кафедры морфологии Сумского государственного университета, г. Сумы, Украина.

Information about the authors

Tkachenko Artem Sergiyovych – PhD-student of the Morphology Department of Sumy State University, Sumy, Ukraine.

Tkach Gennadii Fedorovich – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Morphology Department of Sumy State University, Sumy, Ukraine.

Надійшла до редакції 23.06.20
Рецензент – проф. Цигикало О.В.
© А.С. Ткаченко, Г.Ф. Ткач, 2020