

© Вернигородський С.В., Рибінський М.В

УДК: 611.018.3:611-018.54/.52:612.08

Вернигородський С.В., Рибінський М.В

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна)

ЗАСТОСУВАННЯ ОСНОВНОГО КОРИЧНЕВОГО ДЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ОЦІНКИ РЕГЕНЕРАЦІЇ ГІАЛІНОВОГО ХРЯЩА

Резюме. В даній статті запропоновано новий підхід до оцінки структури гіалінового хряща, а також способи визначення його регенерації за різних умов. Показано, що регенераторний процес, стимульований застосуванням аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми, чітко спостерігається при ушкодженні субхондральної пластинки та якісно виявляється застосуванням основного коричневого при фарбуванні гістологічних зразків.

Ключові слова: збагачена тромбоцитами плазма, хрящовий дефект, хрящовий матрикс, експеримент.

Вступ

На сьогоднішній день існує велика кількість методів відновлення хрящової тканини суглобів - частина з них застосовується, інші - знаходяться на стадії вивчення. Використання відновних методів лікування вимагає повноцінних експериментальних досліджень, на етапі яких вивчаються безпечність, гістологічні особливості та здійснюється біомеханічна оцінка хрящового регенерату.

Всі сучасні стратегії лікування хряща мають на меті повне його відновлення, але на практиці спостерігається утворення регенератів різного типу. Морфологічна оцінка є важливим кінцевим етапом як експериментальних, так і клінічних досліджень, а тому необхідні прості, але показові методики для спостереження за можливим процесом регенерації суглобового хряща.

Мета дослідження: вивчити особливості структури гіалінового хряща та його можливої регенерації при застосуванні основного коричневого.

Матеріали та методи

Для дослідження було використано фрагменти дистальних відділів стегнової кістки 24 дорослих кроликів. У всіх тварин під комбінованою внутрішньовенною анестезією розчинами Кетаміну та Тіопенталу виконано розріз шкіри та підлеглої капсули медіальним парапательним доступом за допомогою скальпеля сформовано повношаровий хрящовий дефект розміром 6 на 4 мм у міжвиростковій ділянці надколінкової поверхні стегнової кістки. Після цього рану промивали фізіологічним розчином та пошарово ушивали м'які тканини. Зашиту рану обробляли Стериліумом та накладали асептичну пов'язку.

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 9.12.2015 року.

Піддослідних тварин розподіляли на основну та контрольну групи. В основній групі під час оперативного втручання формували хрящовий дефект до підхрящової пластинки - підгрупа №1 (n=12) та залучали підхрящову пластинку до появи кров'яної роси - підгрупа №2 (n=12). На 7 добу після оперативного втручання тваринам в прооперовані суглоби вводили збагачену тром-

боцитами плазму. В контрольній групі (по 10 тварин в кожній контрольній групі відповідно до кожної експериментальної) проводили аналогічні оперативні втручання, але без подальшого внутрішньосуглобового введення аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми - підгрупа №1 - без дефекту субхондральної пластинки (n=10), та підгрупа №2 - з дефектом субхондральної пластинки (n=10).

Тварин виводили з експерименту через 4 і 8 тижнів. Для оцінки морфологічних змін дистальний відділ стегнової кістки фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну та піддавали декальцинації. Препарати готували за стандартною методикою, гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм фарбували основним коричневим за Шубічем М.Г. [4], комбінацією основного коричневого та міцного зеленого барвника [2], альціановим синім та пікрофуксином за ван-Гізона [1, 3].

Мікроскопію і фотографування гістологічних препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа OLIMPUS BX 41 при збільшеннях x40, x100, x200 і x400. Отримували і обробляли знімки, проводили морфометрію та статистичну обробку за допомогою програми "Quick PHOTO MICRO 2.3". Вміст клітинних елементів визначали із розрахунку на одиницю умовної площі (1мм²) [1].

Результати. Обговорення

При мікроскопічному дослідженні в групі інтактних тварин міжвиросткова ділянка надколінної поверхні стегнової кістки мала наступну будову: слабо увігнута суглобова ділянка була покрита гіаліновим хрящем з рівним гладким контуром на поперечному зрізі. При використанні основного коричневого зональна будова суглобового хряща диференціювалася, при цьому міжклітинний матрикс добре забарвлювалася в коричневий колір, що свідчило про наявність сульфатованих протеогліканів (рис. 1).

У тварин 1 контрольної групи (без пошкодження кісткової пластинки) через 8 тижнів експерименту суглобова поверхня в місці нанесення ушкодження була позбавлена будь-якого покриття. На найближчій віддалі від місця пошкодження розташовувалися ділянки збе-

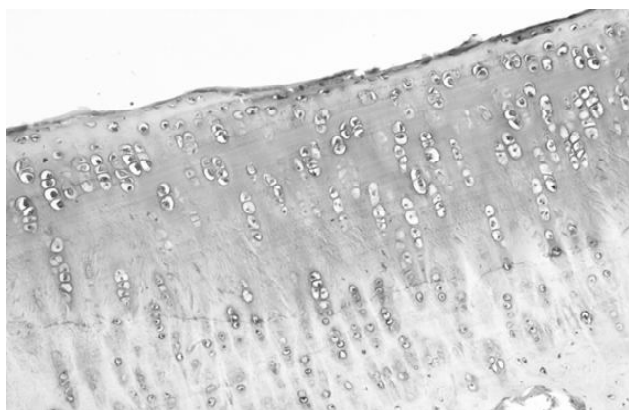


Рис. 1. Інтенсивне коричневе забарвлення міжклітинного матриксу. Інтактна тварина. Основний коричневий. x100.

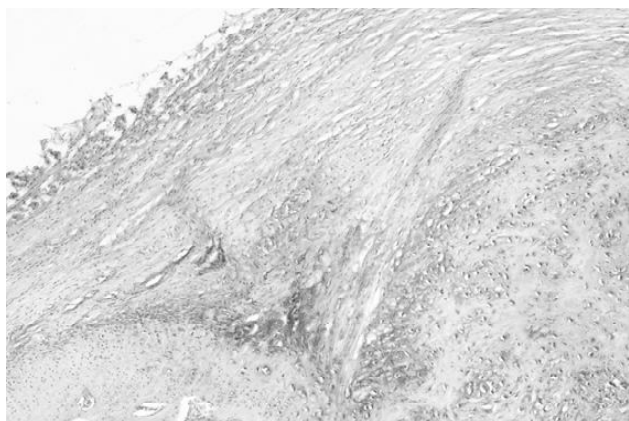


Рис. 3. Дезорганізація сполучнотканинних волокон, зниження інтенсивності забарвлення основної речовини. Перша контрольна група. 8 тижнів. Основний коричневий. x100.

реженого гіалінового хряща. При цьому в ньому було помітні ознаки деструкції та дегенерації. Цитоплазма хондроцитів була значно вакуолізована. Було виявлено розволокнення і дезорієнтація колагенових волокон, відзначалися порожні лакуні і менша гомогенність ізогенних груп, в яких частина хондроцитів була з ознаками деструкції (рис. 2). Такі клітини були зменшені в розмірах, цитоплазматичні вирости не визначались, спостерігали явище гіперконденсації хроматину. Інтенсивність забарвлення основної речовини була зниженою (рис. 3).

У тварин 2 контрольної групи (з пошкодженням субхондральної кісткової пластинки) через 8 тижнів експерименту суглобова поверхня в місці пошкодження була вкрита фіброзною тканиною з великим числом активних фіброblastів і колагенових волокон. У субхондральних ділянках реєстрували клітинні проліферати фіброblastів, хондробlastів та утворення гомогенного хрящового матриксу між ними. В зонах проліферуючих хондробlastів і в матриксі виявлено інтенсивну альціан-позитивну реакцію (рис. 4). У ряді випадків на фоні гомогенного хондромукоїда визначали зони проліферації низькодиференційованих хондробlastів ем-

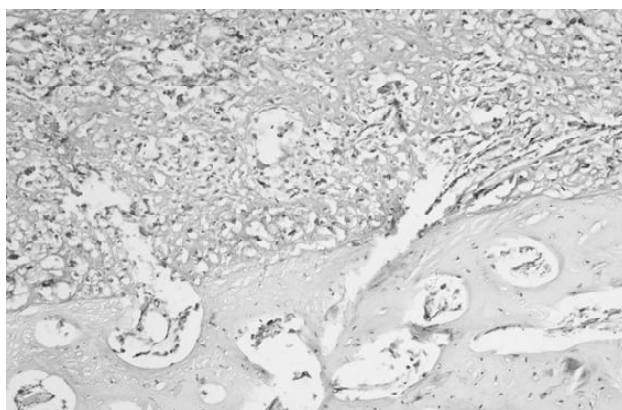


Рис. 2. Деструктивно-дегенеративно змінені хондроцити, порожні лакуні. Перша контрольна група. 8 тижнів. Основний коричневий. x200.

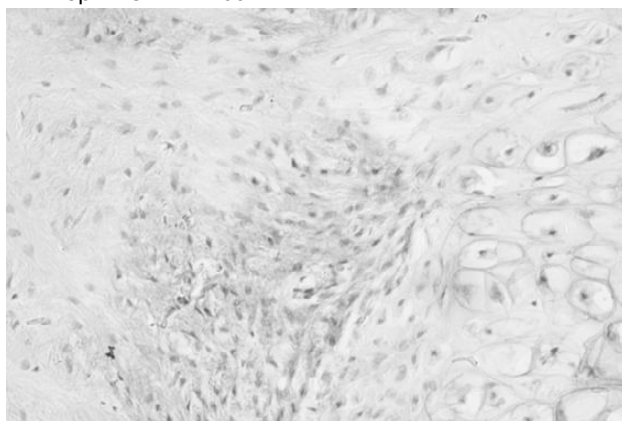


Рис. 4. Вогнищева альціанофілія основної речовини міжклітинного матриксу в ділянці проліферуючих хондробlastів. Друга контрольна група. 8 тижнів. Альціановий синій. x400.

бріонального типу з великим ядром і вузьким обідком цитоплазми. Іноді ці клітини розташовувалися радіально, іноді хаотично. У центрі клітинних скупчень спостерігали осередковані некробіотичні зміни. В інших ділянках подібні клітинні проліферати були відсутніми.

У частини тварин дослідної групи вже через 4 тижні експерименту гістологічно слабо увігнута суглобова поверхня в місці пошкодження на більшому протязі була покрита хрящем складної будови. В зоні новоутвореного гіалінового хряща реєстрували інтенсивне забарвлення основної речовини основним коричневим, що свідчило про відновлення функціональних властивостей хондроцитів (рис. 5). Колір міжклітинного матриксу практично наближався до такого ж в інтактного гіалінового хряща, а отже, PRP-індукована стимуляція відновлення хрящової тканини якісно відрізнялась від аналогічного процесу в контрольній групі тварин.

На сьогодні відомо декілька методів забарвлення основної речовини хряща (альціановий синій, сафранін О тощо) [5, 6], що використовують для оцінки його регенеративних властивостей. Використання відомого забарвлення пікрином та фуксиною кислотою за Ван Гізоном, на протигагу описаного нами методу, дозво-

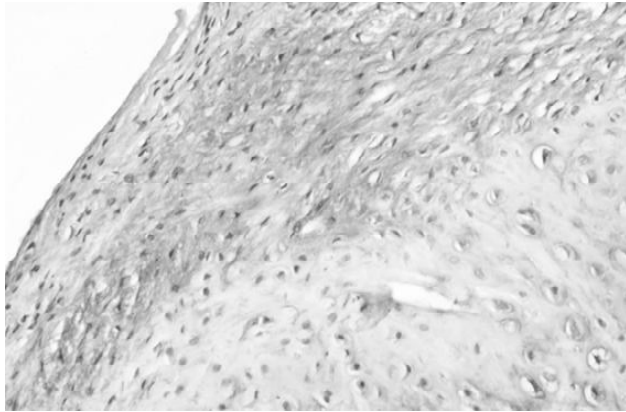


Рис. 5. Інтенсивне забарвлення основної речовини міжклітинного матриксу. Друга дослідна група. 4 тижня. Основний коричневий. x200.

ляє оцінити вміст колагену у препаратах і не дає ніякої ні кількісної, ні якісної оцінки вмісту специфічного гіалінового матриксу.

Згідно отриманих нами даних основний коричневий не поступається іншим барвникам, а у порівнянні з альціановим синім більш інтенсивно забарвлює сульфатовані протеоглікани, котрі активно продукуються хондробластами та хондроцитами при відновленні пошкодженого хряща. В нашому дослідженні застосування основного коричневого дозволило чітко визначити морфологічні особливості гіалінового хряща в нормі та у випадку пошкодження субхондральної кісткової пластинки, при цьому осередки накопичення оновленого міжклітинного матриксу дозволили встановити чіткий зв'язок з подальшою диференціацією хондробластів та розмежувати формування волокнистого та гіалінового компонентів хряща.

Матрикс хрящової тканини включає в себе тканинну

Список посилань

1. Автандилов, Г.Г. (2002). *Основы количественной патологической анатомии*. М.: Медицина.
2. Голофеевский, В.Ю., Щербак, С.Г. (1987). Сочетанная окраска гистологических срезов основным коричневым и прочным зеленым. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*, 4, 101.
3. Сапожников, А.Г., Доросевич, А.Е. (2000). *Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство*. Смоленск: САУ.
4. Шубич, М.Г. (1961). Метод элективной окраски кислых (сульфатированных) мукополисахаридов основным коричневым. *Бюллетень экспериментальной биологии*, 2, 116-120.
5. Li, S., Sengers, B.G., Oreffo, R.O., Tare, R.S. (2015). Chondrogenic potential of human articular chondrocytes and skeletal stem cells: A comparative study. *Journal of Biomaterials Applications*, 29 (6), 824-836.
6. Rutgers, M., van Pelt, M.J., Dhert, W.J., Creemers, L.B., Saris, D.B. (2010). Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(1), 12-23.

Вернигородский С.В., Рыбинский М.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСНОВНОГО КОРИЧНЕВОГО ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Резюме. В данной статье предложен новый подход к оценке структуры гиалинового хряща, а также способы определения его регенерации при различных условиях. Показано, что регенераторный процесс, стимулируемый применением аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы, четко наблюдается при повреждении субхондральной пластинки и качественно определяется применением основного коричневого при окраске гистологических образцов.

Ключевые слова: обогащенная тромбоцитами плазма, хрящевой дефект, хрящевой матрикс, эксперимент.

Vernygorodskiy S.V., Rybinskiy M.V.

APPLICATION OF THE BASIC BROWN FOR THE EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE HYALINE CARTILAGE REGENERATION

Summary. This article proposes a new approach to the evaluation of the structure of hyaline cartilage, as well as ways to evaluate

рідину та структуру зі специфічних макромолекул, що надає хрящу його форми і стабільності. Взаємодія між ними надає тканині її механічних властивостей, стабільності та жорсткості. Тому визначення структурного складу матриксу дозволить повноцінно оцінити можливі біомеханічні особливості досліджуваної тканини. Великі молекули протеогліканів, як основного компоненту міжклітинного матриксу, інтенсивно продукуються молодими хондробластами, тому збільшення вмісту таких молекул опосередковано свідчить про збільшення числа високоактивного клітинного компоненту. В свою чергу, звичайний гіаліновий матрикс слугує рецепторним полем для хондроцитів, котрі, зазвичай, розташовуються ізольовано і не утворюють міжклітинних зв'язків. Мінімальні коливання хімічного складу матриксу зумовлюють відповідну специфічну реакцію клітини у вигляді синтезу тих, чи інших молекул, що дозволяє їй правильно розвиватися в умовах постійних циклічних навантажень.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Використання основного коричневого для фарбування гістологічних зрізів хрящової тканини дозволяє швидко оцінити структурні особливості тканини.

2. Специфічна афінність барвника до сульфатованих протеогліканів дає змогу визначити вміст саме хрящового міжклітинного матриксу у зразках, а також розрізнити наявність регенераторного потенціалу хряща у відновленій тканині фіброзного типу.

Перспективним є використання барвника для оцінки вмісту сполучнотканинних та матриксних компонентів за різних патологічних умов а також при поєднанні основного коричневого з барвниками, специфічними для інших типів тканин.

its regeneration under different conditions. It was shown that the regenerative process, stimulated by the use of autologous platelet-rich plasma, is clearly observed when subchondral plate is damaged and qualitatively manifested by the use of the basic brown coloration of histological specimens.

Key words: *plasma-enriched platelets, cartilage defect, cartilage matrix, experiment.*

Рецензент - д.мед.н., проф. Півторак В.І.

Стаття надійшла до редакції 3.07.2017р.

Вернигородський Сергій Вікторович - д.мед.н., професор, професор кафедри патологічної анатомії, судової медицини та права ВНМУ ім. М.І. Пирогова, vernset@rambler.ru

Рибінський Максим Володимирович - аспірант, асистент кафедри травматології та ортопедії ВНМУ ім. М.І. Пирогова restful88@gmail.com
