



УДК 616.72-018.3:577.3

ББК 28.07

НЕОДНОРОДНОСТЬ СТРОЕНИЯ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА КОЛЕННОГО СУСТАВА У ИНТАКТНЫХ КРЫС И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОАРТРОЗЕ ¹

Новочадов Валерий Валерьевич

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой биоинженерии и биоинформатики,
Волгоградский государственный университет
novovv@rambler.ru, biobio@volsu.ru
просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

Крылов Павел Андреевич

Аспирант кафедры биоинженерии и биоинформатики,
Волгоградский государственный университет
p.krylov.volsu@yandex.ru, biobio@volsu.ru
просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

Зайцев Валерий Геннадьевич

Доцент кафедры биоинженерии и биоинформатики,
Волгоградский государственный университет
biobio@volsu.ru
просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

Аннотация. С целью исследования структурных изменений кластерной организации (мозаичности) гиалинового хряща при остеоартрозе коленного сустава были проведены опыты по его моделированию у 14 белых крыс путем двусторонней перерезки передних крестообразных связок. Морфология хряща была изучена на 4-й, 8-й и 12-й неделях с момента перерезки связок, 12 образцов суставов от 6 интактных крыс составили контрольную группу. Степень развития остеоартроза оценивали с помощью полуколичественной шкалы V.V. Кгаус. Количественная морфология (морфометрия) включала в себя определение фактора поверхности, радиальной толщины хряща, среднюю численную плотность хондроцитов и удельную оптическую плотность матрикса в окраске сафранином О. Микрокластеры идентифицировали по перепадам плотности матрикса и численной плотности хондроцитов.

Иммуногистохимическими методами оценивали экспрессии агреккана и лубрицина, по которым оценивали синтетические способности хондроцитов в соответствующих зонах хряща. В результате исследования показано, что развитие остеоартроза в эксперименте сопровождается изменениями микрокластерной организации хряща: в поверхностной и промежуточной зонах он становится более однородным и менее плотным, нарушается продукция лубрицина; в базальной зоне формируются более крупные кластеры с характерной гиперцеллюлярностью и неоднородностью плотности матрикса, нарушаются структурные соотношения с подлежащей костью, появляются единичные остеоциты. Полученные данные могут частично объяснить механизмы прогрессирования структурно-функциональных изменений в суставном хряще при остеоартрозе.

Ключевые слова: суставной хрящ, хондроциты, экстрацеллюлярный матрикс, иммуногистохимия, остеоартроз.

Гиалиновый хрящ суставов является примером высокоспециализированных тканей, для которых способность выполнять уникальные функции обеспечивается формированием и поддержанием необходимых структурных и функциональных характеристик экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) [1; 13; 16]. Это придает хрящу множество специфических свойств: относительную мономорфность клеточного состава, отсутствие сосудов и нервов, выраженную зональность строения. Одной из серьезных проблем, возникающих в результате такой дифференцировки, становится крайне низкая способность суставного хряща к регенерации [6; 11; 18].

Современные условия жизни человека предъявляют к крупным суставам человека требования, выходящие за пределы регенераторных возможностей хрящевой ткани. Помимо феномена прямохождения, к которому адаптивные приспособления формировались в течение порядка двух миллионов лет, в последние столетия лавинообразно нарастало воздействие таких факторов, как увеличение продолжительности жизни и доли пожилых людей с потребностью в активном образе жизни, появление у многих лиц избыточной массы тела, накопление генетического груза аномалий, а также «травматическая эпидемия» XXI века в связи с экспансией технологий и вызовами экстремизма [2; 8; 19]. В итоге остеоартроз (ОА) крупных суставов вышел на лидирующие позиции в патологии опорно-двигательного аппарата и на пятое место – по числу оперативных манипуляций в развитых странах мира [10].

Ранее, исходя из общебиологического принципа мозаичности, мы предположили, что в строении хряща внутри одного сустава, помимо известных различий, позволяющих выделять в нем глубокую, среднюю и поверхностную зоны, нагружаемые и ненагружаемые области, можно найти трехмерную неоднородность ЭЦМ хряща. Найденные объекты в суставном хряще кролика были охарактеризованы как микрокластеры, имели размерность порядка 0,1–0,2 мм и занимали до трети объема хряща. Наличие подобного феномена было связано с различиями в экспрессии отдельных генов и биохимических процессов в хондроцитах [5].

Поскольку при развитии ОА происходят существенные изменения молекулярных процессов в хряще, сопровождающиеся хорошо описанными нарушениями его структуры и функциональных свойств [9; 11; 14; 17], представляется целесообразным изучить динамику найденных микрообъектов при моделировании экспериментальной патологии.

Целью работы явилась попытка охарактеризовать структурную неоднородность гиалинового хряща в естественных условиях и в динамике развития экспериментального остеоартроза.

Материал и методы

Исследование проводили на 20 белых крысах-самцах линии Wistar массой 240–290 г. Все процедуры проводили в соответствии с этическими нормами, изложенными «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Ди-

рективе 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Для наркоза использовали препарат «Золетил» в дозе 40 мг/кг массы внутривенно, для выведения из эксперимента – в дозе 200 мг/кг массы.

Экспериментальный ОА вызывали перерезкой передних крестообразных связок [19] обоих коленных суставов у 14 животных. Четырех крыс выводили из эксперимента спустя 4 недели после перерезки, 5 животных – спустя 8 недель и еще пять – спустя 12 недель с момента инициализации процесса. У шести крыс контрольной группы оставляли суставы в интактном состоянии.

Для исследования у крыс забирали материал методом частичной препаровки с каждой стороны единым костно-мышечным блоком в объеме от дистальных эпифизов бедренной кости до проксимальных эпифизов большеберцовой кости включительно, надрезом с латеральной стороны не полностью разъединяя мягкие ткани коленного сустава для обеспечения доступа фиксатора в суставную полость. Материал фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального забуференного формалина (pH = 7,4) и декальцинировали в растворе «Cal-Ex®» (Fisher Scientific). После дофиксации в 10 %-ном растворе нейтрального формалина материал проводили по общепринятой гистологической методике и заливали в парафин.

Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, для выявления структуры ЭЦМ – сафранином О [12].

Для оценки степени развития ОА использовали шкалу полуколичественной оценки Н. Mankin в модификации V.B. Kraus et al. [20]. Оценки по критериям выставляли два исследователя по два препарата одного и того же случая каждый (16 оценок в выборке). Учитывали структуру поверхности хряща (0–8 баллов), структуру и плотность ЭЦМ в окраске сафранином О (0–6), плотность расположения хондроцитов и кластеризацию (0–3), целостность остеохондральной линии (0–1) и наличие остеофитов (0–9 баллов).

Морфометрическое исследование было проведено в соответствии с принципами системного количественного имидж-анализа, для этого использовали программу свобод-

ного доступа «ImageJ» (США). Все измерения проводили в двух препаратах от одного образца в пяти полях зрения, в итоге в каждую выборку были включены результаты от 50 до 60 измерений [12].

Определяли радиальную толщину хряща (мкм), фактор поверхности (безразмерная величина – отношение длины криволинейного отрезка, соответствующего фактической границе хряща, между точками на расстоянии 100 мкм друг от друга, к этому расстоянию), среднюю численную плотность хондроцитов в глубокой и средней зонах (1/мм³) и оптическую плотность ЭЦМ в окраске сафранином О (усл. ед.). Для выявления структурной неоднородности ЭЦМ строили функции распределения оптической плотности в горизонтальном и радиальном направлениях с шагом 25 мкм. В последнем случае данные измерений были нормализованы к средней радиальной толщине хряща.

Для выявления тканевых и клеточных маркеров применяли иммуногистохимические методики. Использовали козы моноκлональные антитела к агрекану (Aggrecan C20, SC-16493, Santa Cruz Biotechnology, США) как маркеру синтетически активных хондроцитов средней зоны суставного хряща, и к лубрицину (Lubricin E19, SC 50079, Santa Cruz Biotechnology, США), с которым ассоциировали синтетическую активность хондроцитов поверхностной зоны. Использовали вариант температурной демаскировки антигенов, вторичные anti-goat-антитела, меченные щелочной фосфатазой, визуализацию в системе Fast Red, негативные контроли антигенов и антител. Процент иммунопозитивных клеток обозначали как соответствующий индекс синтетической активности, дополнительно определяли объемную долю (%) агрекан- и лубрицин-позитивных участков.

Количественные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) с расчетом показателей, принятых для характеристики непараметрических выборок в медико-биологических исследованиях: медиана [1-й квартиль ÷ 3-й квартиль]. Для доказательства достоверности различий применен дисперсионный анализ с использованием непараметрического критерия Фридмана для множественных групп (p < 0,01).

**Результаты
и их обсуждение**

Гиалиновый хрящ коленного сустава крыс контрольной группы имел гладкую суставную поверхность, отчетливую остеохондральную линию, между которыми можно было выделить три типичных зоны – базальную, переходную и поверхностную (рис. 1, А). В нагружаемых областях сустава визуально, а более отчетливо – при сканировании оптической плотности ЭЦМ в направлении, параллельном суставной поверхнос-

ти, выявлялись микрокластеры размерностью порядка 60–150 мкм, отстоящие друг от друга на соразмерные расстояния. Прирост оптической плотности ЭЦМ внутри микрокластеров по амплитуде составлял от 10 до 25 % от плотности ЭЦМ между микрокластерами (рис. 1, Б).

В суставном хряще крыс контрольной группы микрокластеры занимали от 25 до 40 % объема хряща (в нагружаемых областях), имели на срезах форму неправильной трапеции, расширяющейся по направлению от базальной зоны к поверхностной.

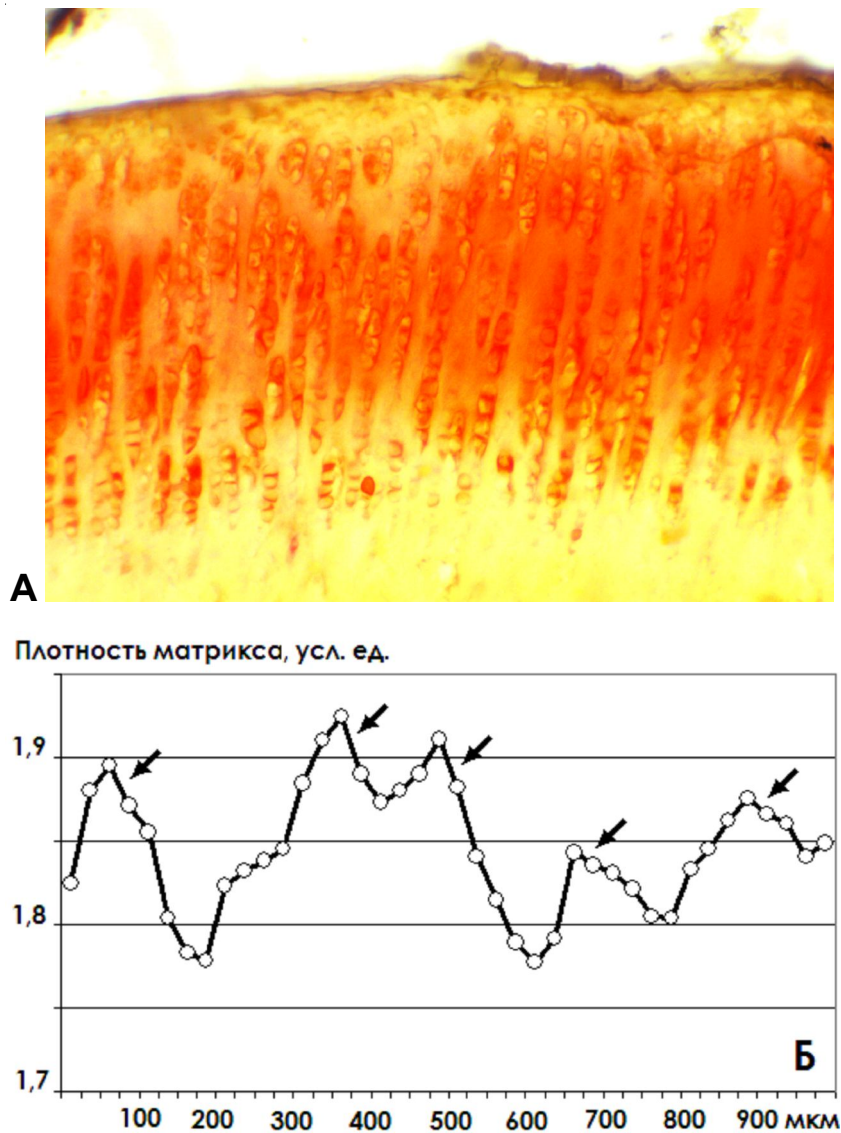


Рис. 1. Гиалиновый хрящ нагружаемой области коленного сустава крыс:

- А – зональное строение и горизонтальная неоднородность плотности хряща в окраске сафранином О (×240);
- Б – кривая распределения оптической плотности матрикса при сканировании параллельно суставной поверхности с шагом 25 мкм. Микрокластеры выделены стрелками

Результаты количественной морфологии суставного хряща у крыс опытной и контрольной групп приведены в таблице 1.

При оценке степени ОА по шкале V.V. Kraus суставной хрящ у животных контрольной группы в подавляющем большинстве случаев оценивался в 0 или 1 балл. Один или два балла могли быть получены за счет фиксации нерегулярности суставной поверхности, в единичных случаях – за счет снижения плотности ЭЦМ в поверхностной зоне хряща.

На 4-й неделе оценка по морфологической шкале ОА возрастала незначительно, также за счет оценки качества поверхности и плотности ЭЦМ. На 8-й неделе после перерезки передней крестообразной связки в части коленных суставов уже фиксировались истинные фиссуры, в базальной и промежуточной зонах наблюдались участки гиперцеллюлярности, в большинстве суставов регистрировалось уменьшение плотности ЭЦМ различной интенсивности (от 1 до 3 баллов по шкале V.V. Kraus). На поздних сроках эксперимента наиболее часто степень ОА оценивалась на уровне от 5 до 11 баллов, к вышеописанным признакам прибавлялись факты обнаружения истинных кластеров, единичных остеоцитов в базальной зоне хряща, а также повреждений остеохондральной линии. Все это позволяло отнести обнаруженные изменения на 8-й неделе к минимальным, а к 12-й неделе – к умеренным признакам ОА.

Перерезка крестообразных связок практически не сопровождалась изменениями радиальной толщины хряща в нагружаемых областях сустава – в большинстве случаев она варьировалась возле 190 мкм с разбросом по квартилям от 160 до 230 мкм с заметным увеличением разброса значений к поздним срокам эксперимента. Полученные данные соответствуют описанию модели [19].

Фактор суставной поверхности, отражающий степень ее регулярности, при измерении образцов тканей варьировался в суставах интактных животных от 1,04 до 1,16 с медианой 1,08. По мере развития ОА величина этого показателя увеличивалась, превышая значения в контрольной группе к 8-й неделе на 13,9 %, к 16 неделе – на 25,9 % ($p < 0,01$). Численная плотность хондроцитов в промежуточной зоне хряща возрастала к 4-й неделе эксперимента в 1,13 раза, к 8-й неделе – 1,45 раза ($p < 0,01$), в последующем уменьшаясь практически до значений показателя в контрольной группе. Оптическая плотность ЭЦМ составляла в среднем 1,84 усл. ед., варьируясь по квартилям в пределах 20 %. По мере нарастания сроков эксперимента наблюдалось достоверное уменьшение средней оптической плотности ЭЦМ: к 8-й неделе после перерезки передних крестообразных связок – в 1,18 раза, к 16-й неделе – в 1,22 раза ($p < 0,01$). Перерезка передних крестообразных связок, приводящая к развитию экспериментального ОА, сопровождалась из-

Таблица 1

Основные морфометрические показатели суставного хряща интактных крыс и при экспериментальном остеоартрозе (М [1-й квартиль ÷ 3-й квартиль])

Группа	Интактные крысы	Сроки эксперимента		
		4 недели	8 недель	12 недель
Оценка по шкале V.V. Kraus [20], баллов	0 [0 ÷ 1]	1 [0 ÷ 3]	4 [1 ÷ 9]	8 [5 ÷ 11]*
Радиальная толщина хряща, мкм	185 [170 ÷ 202]	190 [166 ÷ 210]	183 [168 ÷ 230]	190 [160 ÷ 227]
Фактор суставной поверхности	1,08 [1,04 ÷ 1,16]	1,14 [1,06 ÷ 1,25]	1,23 [1,15 ÷ 1,30]	1,36 [1,22 ÷ 1,57]*
Численная плотность хондроцитов, 1/мм ³	860 [693 ÷ 1037]	974 [801 ÷ 1142]	1244 [980 ÷ 1468]*	920 [785 ÷ 1063]
Оптическая плотность матрикса, усл. ед.	1,84 [1,63 ÷ 1,96]	1,74 [1,59 ÷ 1,86]	1,56 [1,48 ÷ 1,65]*	1,51 [1,43 ÷ 1,64]*

Примечание. Здесь и в следующей таблице: * – достоверные различия со значениями показателя у интактных животных.

менениями микрокластерной организации суставного хряща (рис. 2).

Средние размеры кластеров увеличивались по мере нарастания сроков эксперимента: к 4-й неделе – в 1,13 раза, к 8-й неделе – на треть ($p < 0,01$), к 16 неделе – в 1,39 раза ($p < 0,01$) от величины аналогичного показателя в контрольной группе. Параллельно регистрировалось падение относительной плотности ЭЦМ: если в микрокластерах хряща у крыс контрольной группы величина показателя составляла в среднем 1,24, то к 12-й неделе эксперимента – только 1,08.

Результаты полуколичественного определения синтетической активности хондроцитов в промежуточной и поверхностной зонах суставного хряща приведены в таблице 2.

Объемная доля агреккан-позитивных участков в промежуточной зоне хряща составляла более 60 %, внутри микрокластеров – более 80 %. После перевязки передней крестообразной связки существенной динамики показателя не прослеживалось, за исключением тенденции к незначительному снижению к 12-й неделе эксперимента. Индекс синтетической активности в промежуточной зоне хряща у крыс контрольной группы варьировался в пределах от 68 до 82 % с медианой 75 %. При экспериментальном ОА индекс синтетической активности агреккана начинал уменьшаться с 8-й недели, составляя к 12-й неделе опыта 81,3 % от значения показателя в группе интактных животных.

Объемная доля лубрицин-позитивных участков в поверхностной зоне хряща была

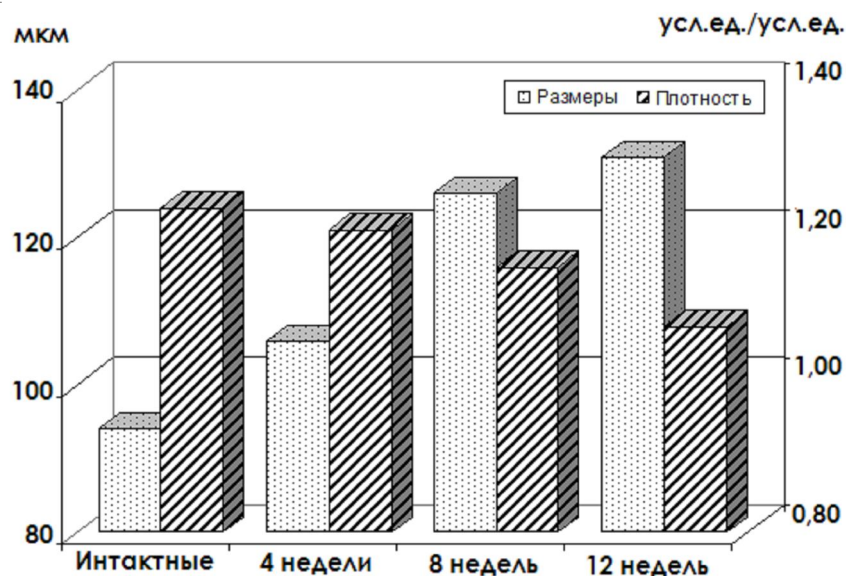


Рис. 2. Изменения размеров и относительной плотности матрикса микрокластеров суставного хряща крыс при моделировании экспериментального остеоартроза

Таблица 2

Экспрессия агреккана и лубрицина в суставном хряще интактных крыс и при экспериментальном остеоартрозе

Группа	Интактные крысы	Сроки эксперимента		
		4 недели	8 недель	12 недель
Объемная доля агреккан-позитивных участков, %	64 [59 ÷ 70]	62 [56 ÷ 67]	67 [60 ÷ 73]	58 [52 ÷ 65]
Индекс синтетической активности агреккана, %	75 [68 ÷ 82]	76 [67 ÷ 82]	72 [64 ÷ 77]	61 [49 ÷ 69]*
Объемная доля лубрицин-позитивных участков, %	28 [24 ÷ 34]	22 [19 ÷ 30]	11 [6 ÷ 17]*	9 [5 ÷ 14]*
Индекс синтетической активности лубрицина, %	45 [40 ÷ 53]	30 [23 ÷ 36]	24 [17 ÷ 31]	19 [13 ÷ 26]

несколько меньше агреган-позитивной зоны – около 30 %, внутри микрокластеров – до 50 %. К 4-й неделе эксперимента она уменьшалась в 1,27 раза, к 8-й неделе – в 2,55 раза ($p < 0,01$), к 12-й неделе – более чем втрое ($p < 0,01$). Индекс синтетической активности в поверхностной зоне хряща у крыс контрольной группы варьировался на уровне 45 %, а по мере развития экспериментального ОА монотонно снижался, составляя к 12-й неделе 42,2 % от величины показателя у интактных животных.

Полученные данные указывают, прежде всего, на наличие феномена микрокластерной организации (мозаичности) строения суставного хряща у крыс так же, как это ранее было показано на суставах кролика [5]. Участки хряща, характеризующиеся более высокой плотностью хондроцитов с высокой синтетической активностью, оказываются окруженными более плотным ЭЦМ и представляют в итоге своего рода объемный прочный каркас внутри относительно менее плотного окружения, более податливого к внешним нагрузкам.

Достижение необходимого фенотипа хондроцитов, различающегося как между отдельными зонами хряща, так и, по результатам наших исследований, внутри микрокластеров и между ними, происходит путем динамического регулирования сигнальными молекулами и в ответ на механическую стимуляцию хондроцитов. В итоге достигается определенное соотношение процессов синтеза и распада ЭЦМ [4; 15].

Трехмерная архитектура микрокластеров может быть использована как прототип для биомиметического моделирования ЭЦМ при создании скаффолдов в тканевой инженерии хряща, где в последнее время основное внимание уделяется трехмерной реконструкции строения и свойств ЭЦМ [3; 7].

Для дальнейшего изучения выявленного феномена целесообразно более детально охарактеризовать особенности фенотипа, метаболома и транскриптома изо групп хондроцитов в составе микрокластеров и вне их, а также в составе патологических кластеров хондроцитов при ОА, чему авторы намерены посвятить дальнейшие исследования.

Заключение

Гиалиновый хрящ коленного сустава крыс имеет на светооптическом уровне неоднородное строение, в котором, помимо общепринятого деления на зоны, можно выделить полнослойные участки (микрокластеры) в виде колонок или полигональных усеченных пирамид, расширяющихся к суставной поверхности. Микрокластеры занимают около трети объема хряща и характеризуются относительно более высокой плотностью ЭЦМ и численной плотностью хондроцитов.

Развитие экспериментального ОА сопровождается изменениями микрокластерной организации хряща: в поверхностной и средней зонах он становится более однородным и менее плотным, нарушается продукция лубрицина; в базальной зоне формируются более крупные кластеры с характерной гиперцеллюлярностью и неоднородностью плотности ЭЦМ, нарушаются структурные соотношения с подлежащей костью, появляются единичные остеоциты.

Характер выявленной неоднородности в строении суставного хряща в норме и при экспериментальном ОА целесообразно учитывать при дальнейшем изучении механизмов динамического ремоделирования хряща в норме и патологии, а также как принцип создания тканеинженерных конструкций, учитывающий феномен мозаичности строения ЭЦМ и суставного хряща в целом.

ПРИМЕЧАНИЕ

¹ Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-01679 а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ежов, М. Ю. Математическая модель развития изменений в суставных тканях при различных по интенсивности физических нагрузках / М. Ю. Ежов, Н. Н. Берендеев, С. В. Петров // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 7-3. – С. 550–554.
- Инновационные технологии в восстановлении коленного сустава при его повреждениях и заболеваниях / Д. А. Маланин, В. В. Новочадов, С. Р. Самусев [и др.] // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2009. – № 2. – С. 7–13.

3. Новочадов, В. В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща (обзор литературы) / В. В. Новочадов // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11, Естественные науки. – 2013. – № 1. – С. 19–28.

4. Особенности метаболизма протеогликанов из разных топографических зон коленного сустава у больных остеоартрозом: вариабельность фенотипа хондроцитов / Т. В. Русова, Е. Л. Строкова, А. А. Воропаева, Е. И. Щелкунова // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2013. – Т. 33, № 5. – С. 78–86.

5. Признаки мозаичного строения гиалинового хряща: количественное морфологическое исследование локтевого суставов кролика / В. В. Новочадов, А. Ю. Алексеенко, П. А. Крылов, Е. Ю. Шувалова // Российский медико-биологический вестник им. академика И. П. Павлова. – 2014. – № 3. – С. 33–39.

6. Articular cartilage: structure and regeneration / J. Becerra, J. A. Andrades, E. Guerado [et al.] // Tissue Eng. Part B. Rev. – 2010. – Vol. 16, № 6. – P. 617–627.

7. Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering / J. A. M. Steele, S. D. McCullen, A. Callanan [et al.] // Acta Biomater. – 2014. – Vol. 10, № 5. – P. 2065–2075.

8. Development and validation of a computational model of the knee joint for the evaluation of surgical treatments for osteoarthritis / R. Mootanah, C. W. Imhauser, F. Reisse [et al.] // Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin. – 2014. – Vol. 17, № 13. – P. 1502–1517.

9. Doyle, J. J. Matrix-dependent perturbation of TGF- β signaling and disease / J. J. Doyle, E. E. Gerber, H. C. Dietz // FEBS Lett. – 2012. – Vol. 586. – P. 2003–2015.

10. Epidemiology and burden of osteoarthritis / A. Litwic, M. H. Edwards, E. M. Dennison, C. Cooper // Br. Med. Bull. – 2013. – Vol. 105. – P. 185–199.

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

12. Handbook of histology methods for bone and cartilage / Y. H. An, K. L. Martin (eds.). – N.Y. : Humana Press, 2003. – 587 p.

13. Hubmacher, D. The biology of the extracellular matrix: novel insights / D. Hubmacher, S. S. Apte // Curr. Opin. Rheumatol. – 2013. – Vol. 25, № 1. – P. 65–70.

14. Increase of TNF- α -stimulated osteoarthritic chondrocytes apoptosis and decrease of matrix metalloproteinases-9 by NF- κ B inhibition / Y. Wang Y., L. de Li, X. B. Zhang [et al.] // Biomed. Environ. Sci. – 2013. – Vol. 26. – P. 277–283.

15. Krylov, P. A. The grouping of chondrocyte receptors according to their control over cartilage tissue remodeling / P. A. Krylov // Eur. J. Mol. Biotech. – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 4–10.

16. Mechanomics: an emerging field between biology and biomechanics / J. J. Wang, D. Lü, D. Mao, M. Long // Protein Cell. – 2014. – Vol. 5, № 7. – P. 518–531.

17. Meszaros, E. Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity / E. Meszaros, J. J. Malemud // Ther. Adv. Chronic Dis. – 2012. – Vol. 3. – P. 219–229.

18. Novochadov V.V. Growth factor technologies in cartilage tissue engineering (review) // Eur. J. Mol. Biotech. – 2013. – Vol. 1, №1. – P. 28–37.

19. Shen, J. Recent progress in osteoarthritis research / J. Shen, D. J. Chen // Am. Acad. Orthop. Surg. – 2014. – Vol. 22, № 7. – P. 467–468.

20. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig / V. B. Kraus, J. L. Huebner, J. DeGroot, A. A. Bendele // Osteoarthritis Cartil. – 2010. – Vol. 18, suppl. 3. – S. S5–S52.

REFERENCES

1. Ezhov M. Yu., Berendeev N.N., Petrov S.V. Matematicheskaya model razvitiya izmeneniy v sustavnykh tkanyakh pri razlichnykh po intensivnosti fizicheskikh nagruzkah [Mathematical Model of the Articular Tissue Changes in Various Physical Activities]. *Fundamentalnye issledovaniya*, 2013, no. 7-3, pp. 550-554.

2. Malanin D.A., Novochadov V.V., Samusev S.R., et al. Innovatsionnye tekhnologii v vosstanovlenii kolennogo sustava pri ego povrezhdeniyakh i zabolevaniyakh [Innovative Technologies in Restoration of Damaged or Diseased Knee Joint]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2009, no. 2, pp. 7-13.

3. Novochadov V.V. Problema upravleniya kletochnym zaseleniem i remodelirovaniem tkaneinzhenernykh matrits dlya vosstanovleniya sustavnogo khryashcha (obzor literatury) [The Control of the Cell Settlement and Scaffold Remodeling in Cartilage Tissue Engineering: A Review]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 11, Estestvennye nauki* [Science Journal of Volgograd State University. Natural Sciences], 2013, no. 1, pp. 19-28.

4. Rusova T.V., Strokovaya E.L., Voropaeva A.A., Shchelkunova E.I. Osobennosti metabolizma proteoglikanov iz raznykh topograficheskikh zon kolennogo sustava u bolnykh osteoartrozom: variabelnost fentipa hondrocytov [Specific Metabolism of Proteoglycans From Different Topographical Zones of the Knee in Patients With Osteoarthritis: The Variability]. *Bulleten Sibirskogo otdeleniya RAMN*, 2013, vol. 33, no. 5, pp. 78-86.

5. Novochadov V.V., Alekseenko A, Yu., Krylov P.A., Shuvalova E. Yu. Priznaki mozaichnogo stroeniya gialinovogo hryashha: kolichestvennoe morfologicheskoe issledovanie loktevoogo sustavov krolika [Mosaicism of Hyaline Cartilage: Quantitative Morphological Study on Rabbit Elbow Joint]. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik im. akademika I.P. Pavlova*, 2014, no. 3, pp. 33-39.
6. Becerra J., Andrades J.A., Guerado E., et al. Articular Cartilage: Structure and Regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2010, vol. 16, no. 6, pp. 617-627.
7. Steele J.A.M., McCullen S.D., Callanan A., et al. Combinatorial Scaffold Morphologies for Zonal Articular Cartilage Engineering. *Acta Biomater*, 2014, vol. 10, no. 5, pp. 2065-2075.
8. Mootanah R., Imhauser C.W., Reisse F., et al. Development and Validation of a Computational Model of the Knee Joint for the Evaluation of Surgical Treatments for Osteoarthritis. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, 2014, vol. 17, no. 3, pp. 1502-1517.
9. Doyle J.J., Gerber E.E., Dietz H.C. Matrix-Dependent Perturbation of TGF-beta Signaling and Disease. *FEBS Lett.*, 2012, vol. 586, pp. 2003-2015.
10. Litwic A., Edwards M.H., Dennison E.M., Cooper C. Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. *Br. Med. Bull.*, 2013, vol. 105, pp. 185-199.
11. Goldring M.B. Chondrogenesis, Chondrocyte Differentiation, and Articular Cartilage Metabolism in Health and Osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, 2012, vol. 4, no. 4, pp. 269-285.
12. An Y.H., Martin K.L., eds. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. New York, Humana Press, 2003. 587 p.
13. Hubmacher D., Apte S.S. The Biology of the Extracellular Matrix: Novel Insights. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2013, vol. 25, no. 1, pp. 65-70.
14. Wang Y., de Li L., Zhang X. B., et al. Increase of TNF- α -stimulated Osteoarthritic Chondrocytes Apoptosis and Decrease of Matrix Metalloproteinases-9 by NF- κ B Inhibition. *Biomed. Environ. Sci.*, 2013, vol. 26, pp. 277-283.
15. Krylov P.A. The Grouping of Chondrocyte Receptors According to Their Control Over Cartilage Tissue Remodeling. *Eur. J. Mol. Biotech.*, 2014, vol. 2, no. 1, pp. 4-10.
16. Wang J., Lü D., Mao D., Long M. Mechanomics: an Emerging Field Between Biology and Biomechanics. *Protein Cell.*, 2014, vol. 5, no. 7, pp. 518-531.
17. Meszaros E., Malemud C. J. Prospects for Treating Osteoarthritis: Enzyme-Protein Interactions Regulating Matrix Metalloproteinase Activity. *Ther. Adv. Chronic Dis.*, 2012, vol. 3, pp. 219-229.
18. Novochadov V.V. Growth Factor Technologies In Cartilage Tissue Engineering (Review). *Eur. J. Mol. Biotech.*, 2013, vol. 1, no. 1, pp. 28-37.
19. Shen J., Chen D.J. Recent Progress in Osteoarthritis Research. *Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2014, vol. 22, no. 7, pp. 467-468.
20. 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, pp. 35-52.

CLUSTERIZATION OF KNEE JOINT HYALINE CARTILAGE OF INTACT RATS AND RATS WITH EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS

Novochadov Valeriy Valeryevich

MD, Professor,
Head of Department of Bioengineering and Bioinformatics,
Volgograd State University
novovv@rambler.ru, biobio@volsu.ru
Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

Krylov Pavel Andreevich

Postgraduate Student,
Department of Bioengineering and Bioinformatics,
Volgograd State University
p.krylov.volsu@yandex.ru, biobio@volsu.ru
Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

Zaytsev Valeriy Gennadyevich

Ph.D. in Biology, Associate Professor,
Department of Bioengineering and Bioinformatics,
Volgograd State University
biobio@volsu.ru
Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

Abstract. To reveal and study the structural changes of clusters (mosaic) organization of hyaline cartilage in case of osteoarthritis we carried out experiments on its modeling using bilateral transection of anterior cruciate ligaments in 28 knee joints of 14 white rats. The autopsy material at 4, 8 and 12 weeks after ligament transaction, and 12 samples from 6 intact rats (control group) completed pool for studying the cartilage morphology. The degree of osteoarthritis progression was evaluated using a semiquantitative scale by Kraus. Quantitative morphology included the estimation of surface factor, cartilage thickness, average chondrocyte density, and matrix optical density in Safranin O staining. The chondrocyte density was calculated to identify microcluster variety in the matrix. The expression of aggrecan and lubricin revealed by immunohistochemical assays made it possible to assess the chondrocyte synthetic ability in the corresponding zones of the cartilage. As a result, we have to conclude that the experimental osteoarthritis is accompanied by changes of cartilage microcluster organization. It becomes more homogeneous with less of dense and lubricin production in the superficial zone. Large clusters with a peculiar hypercellularity and heterogeneity of the density matrix are formed in the deep zone. Structural relations with the underlying bone are disordered, single osteophytes appear. The received data may particularly explain the mechanisms of osteoarthritis progression.

Key words: articular cartilage, chondrocytes, extracellular matrix, immune histochemistry, osteoarthritis.