



DOI: <https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2021.2.1>

UDK 576.7

LBC 28.06



## MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CHONDROCYTE PROLIFERATION IN EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS IN RATS

**Tatyana S. Lyzo**

Volgograd State University, Volgograd, Russian Federation

**Anastasia A. Korchagina**

Volgograd State University, Volgograd, Russian Federation

**Pavel A. Krylov**

Volgograd State University, Volgograd, Russian Federation

**Abstract.** Osteoarthritis is one of the most common degenerative joint diseases. The study of the causes of its occurrence and development is relevant to this day. The lack of data on the causes of its occurrence and development complicates the treatment process. It is known that with the development of this disease, the proliferation of chondrocytes in the articular cartilage progresses at different stages, but the mechanism of this process is poorly understood. An increase in proliferation leads to a sharp increase in the process of autophagy, which in turn affects a decrease in the lubricating function of both cartilage and synovial fluid, which leads to an irreversible stage of joint degeneration. The problem of reducing the viscoelastic properties of cartilage can be solved by introducing natural chondroprotectors, one of which is surfactant proteins. To study the proliferative properties, a research work was carried out, during which osteoarthritis was experimentally simulated in Wistar rats by introducing a solution of medical talc. This led to a decrease in the lubricating function of the synovial fluid and an increase in the number of chondrocytes. However, when using a lubricant based on a substance containing surfactant proteins, the lubricating function of the synovial fluid improved, which contributed to the restoration of cartilage in osteoarthritis.

**Key words:** osteoarthritis, proliferation, chondrocytes, articular cartilage, synovial fluid, surfactant.

**Citation.** Lyzo T.S., Korchagina A.A., Krylov P.A. Morphofunctional Characteristics of Chondrocyte Proliferation in Experimental Osteoarthritis in Rats. *Prirodnye sistemy i resursy* [Natural Systems and Resources], 2021, vol. 11, no. 2, pp. 5-11. DOI: <https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2021.2.1>

УДК 576.7

ББК 28.06

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИФЕРАЦИИ ХОНДРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОАРТРОЗЕ У КРЫС

**Татьяна Сергеевна Лызо**

Волгоградский государственный университет, г. Волгоград, Российская Федерация

**Анастасия Александровна Корчагина**

Волгоградский государственный университет, г. Волгоград, Российская Федерация

## Павел Андреевич Крылов

Волгоградский государственный университет, г. Волгоград, Российская Федерация

**Аннотация.** Остеоартроз является одним из распространенных дегенеративных заболеваний суставов. Изучение причин его возникновения и развития актуально и по сей день. Отсутствие данных о причинах его возникновения и развития усложняет процесс лечения. Известно, что при развитии данного заболевания пролиферация хондроцитов в суставном хряще прогрессирует на разных стадиях, однако механизм данного процесса малоизучен. Повышение пролиферации приводит к резкому увеличению процесса аутофагии, что в свою очередь влияет на уменьшение смазочной функции как у хряща, так и у синовиальной жидкости, что приводит к необратимой стадии дегенерации сустава. Решить проблему снижения вязко-эластичных свойств хряща можно при помощи введения природных хондропротекторов, одними из которых являются белки сурфактанты. Для изучения пролиферативных свойств была проведена исследовательская работа, в ходе которой было у крыс линии вистар был экспериментально смоделирован остеоартроз путем введения раствора медицинского талька. Это приводило к снижению лубрикативной функции синовиальной жидкости и увеличению численности хондроцитов. Однако при использовании лубриканта на основе субстанции, содержащей белки сурфактанта, улучшилась смазочная функция синовиальной жидкости, что способствовало восстановлению хряща при остеоартрозе.

**Ключевые слова:** остеоартроз, пролиферация, хондроциты, суставной хрящ, синовиальная жидкость, сурфактант.

**Цитирование.** Лызо Т. С., Корчагина А. А., Крылов П. А. Морфофункциональная характеристика пролиферации хондроцитов при экспериментальном остеоартрозе у крыс // Природные системы и ресурсы. – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 5–11. – DOI: <https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2021.2.1>

### Введение

Остеоартрозом называют заболевание суставов, которое затрагивает субхондральную кость, суставной хрящ, синовиальную оболочку и связки и приводит к таким последствиям, как повреждение хряща, образование остеофитов и изменение субхондральной кости и мениска [7; 11].

Суставной хрящ – это упругая эластичная ткань, которая выполняет смазочную функцию для соединения и смягчения нагрузки на субхондральную кость [8; 10]. Он состоит из хондроцитов, заключенных во внеклеточный матрикс, которые располагаются в четырех зонах: поверхностной, средней, глубокой и кальцинированной (кальцифицированной) [1; 13]. В нормальном состоянии они синтезируют матричные белки: коллагеновые волокна, обеспечивающие прочность хряща, и протеогликаны отвечающие за устойчивость к давлению. При развитии остеоартроза хрящевая матрица видоизменяется. Первоначально у хондроцитов наблюдается повышение пролиферативных способностей, но в последствии они деградируют, что приводит к патологическому процессу [2; 3; 5]. За счет повышенной пролиферации развивается аутофагия – процесс апоптоза при наличии гиперклеточности

хондроцитов, который сначала резко усиливается, а затем уменьшается в клетках, измененных остеоартрозом [4; 5; 14].

Помимо суставного хряща остеоартроз воздействует также и на синовиальную жидкость, которая заполняет полость суставов и выполняет роль смазочного покрытия и источника питания для поверхностей суставов [6; 12]. При развитии остеоартроза в синовиальной жидкости скапливаются медиаторы воспаления и продукты разрушения хряща, а также вырабатываемые при синовиальном воспалении противовоспалительные медиаторы и, следовательно, протеолитические ферменты, приводящие к разрушению хряща. Это приводит к потере функциональных способностей синовиальной жидкости, что мешает нормальному функционированию и физическому ограничению движения сустава [2; 9].

### Материалы и методы

Работа проводилась на 15 белых крысах линии Wistar. Содержание животных и выведение их из опыта осуществлялось согласно приказу «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и директиве Европейского Парламента и Сове-

та Европейского Союза 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в научных целях.

Для экспериментальной части изымались обе пары коленных суставов у всех особей. Были сформированы 4 группы: интактная группа, ОА 3 недели, ОА 6 недель и ОА 6 недель с добавлением сурфактант-ассоциированных белков.

Были изучены: норма, введение медицинского талька и введение вещества, содержащего белки-сурфактанты. Для ускорения стирания суставной поверхности, в коленный сустав вводился медицинский тальк. Для улучшения смазочной функции синовиальной жидкости в остеоартрозный сустав вводились белки-сурфактанты, для контроля проводилась ложная операция – введение стерильного физиологического раствора.

При введении в суставной хрящ медицинского талька, физраствора, смазывающей субстанции, а также выведении животных из эксперимента использовалось миорелаксирующее вещество «Рометар».

Целью первой серии исследования являлось моделирование экспериментального ОА путем внутрисуставного введения раствора медицинского талька. Медицинский тальк («АГАТ-МЕД», Россия) вводили в суставную полость в соотношении физиологического раствора к стерильному медицинскому тальку 5:1. Непосредственно в сустав инъецировали раствор в объеме 0,2 миллилитра. В этой модели экспериментов животных выводили из него через 3 недели и 6 недель.

Для второй серии экспериментов в суставную полость вводили смесь, содержащую сурфактант-ассоциированные белки и фосфолипиды. Сначала животным моделировали остеоартроз путем введения раствора медицинского талька. Через 3 недели вводили смесь, содержащую белки сурфактанта в концентрации 40 миллиграмм на миллилитр. Одну группу выводили сразу, вторую – через 3 недели.

Протокол подготовки суставного материала для гистологического исследования:

1. После выведения животных из эксперимента изымался коленный сустав.

2. С боковой стороны делали надрез до суставной полости.

3. В растворе 10%-го формалина коленные суставы фиксировали в течение 24–48 часов.

4. Суставы очищали от раствора формалина проточной водой в течение 2–3 часов, затем оставляли в воде на 12–24 часа.

5. Декальцинация. Объем декальцинирующего раствора должен минимум в 25 раз преобладать над объемом декальцинируемого материала. Раствор меняли каждые 48 часов и постоянно перемешивали.

6. Декальцинированный материал подрезали при необходимости.

7. Полученную костную ткань разрезали на микротоме.

8. Для этапа демаскировки антигена использовали 10 мМ цитратный буфер. Стекла с нарезанным микропрепаратом упаковали в пластиковые держатели и поместили в ванночку. Демаскировку антигена провели в микроволновой печи мощностью 700 Вт, при температуре 90–95 градусов, в течение 20 минут.

9. Остужали при комнатной температуре в течение 15–20 минут.

10. Полученные гистологические срезы окрашивали сафранином–О и гематоксилин–эозин.

Морфофункциональное исследование. В качестве основных морфометрических критериев использовали следующие параметры: радиальную толщину хрящ (мкм.), численную плотность хондроцитов ( $1/\text{мм}^2$ ), площадь лакун ( $\text{мкм}^2$ ) и количество хондроцитов в лакунах (ед.), ядерно-цитоплазматическое отношение (безразмерная величина).

Для оценки степени развития ОА использовали шкалу полуколичественной оценки Н. Mankin в модификации V.B. Krauset et al.

## Результаты и обсуждение

1. Снижение лубрикативных свойств синовиальной жидкости при экспериментальном ОА привело к структурным изменениям суставного хряща.

В промежуточной зоне зафиксировано увеличение размеров и численной плотности клеток, пикноз ядер, усиленная пролиферация клеток. В одной изогенной группе количество хондроцитов было в 2 раза больше, чем у интактных животных.

Радиальная толщина хряща на всех неделях эксперимента в 2 раза меньше в сравнении с интактным суставным хрящом.

Численная плотность хондроцитов выросла в 2,5 раза на 3-й неделе во всех зонах. На 6-й неделе численная плотность в промежуточной и глубокой зонах по отношению к интактным животным выросла почти в 5 раз, а в промежуточной зоне была в 3,75 раз выше.

На 6-й неделе эксперимента ядерно-цитоплазматическое отношение было в 3 раза меньше, чем в суставном хряще интактных животных. С уменьшением данного показателя возрастало количество хондроцитов.

2. После введения лубриканта на основе субстанции, содержащей белки сурфактанта, в суставном хряще наблюдалось увеличение концентрации компонентов хрящевого матрикса в промежуточной зоне. На изображениях суставного хряща коленного сустава крысы в группе с экспериментальным ОА на 3-й неде-

ле были выявлены патологические изогенные группы хондроцитов. На 6-й неделе эксперимента после введения субстанции было заметно снижение повреждений поверхностной зоны. К 6-й неделе в промежуточной зоне снизилось количество патологических изогенных групп (рис. 1).

Радиальная толщина хряща незначительно выросла после введения субстанции, содержащей сурфактантные белки, по сравнению с контрольной и экспериментальной группой (ОА6). Численная плотность хондроцитов в промежуточной зоне не отличалась от экспериментальной группы, но при этом была в 2 раза выше по сравнению с контрольной. Численная плотность в промежуточной и глубокой зонах после введения смазывающей субстанции снизилась в 1,5 раза, в сравнении с

Таблица 1

Модель экспериментального ОА

Модель	Временной интервал	Количество животных	Количество суставов
<b>Интактные животные</b>	Начальный этап	3	6
<b>Снижение смазочной функции синовиальной жидкости, для ускорения стирания суставной поверхности</b>			
<b>Введение медицинского талька</b>	3 недели	3	6
	6 недель	3	6
<b>Повышение смазочной функции синовиальной жидкости при экспериментальном остеоартрозе</b>			
<b>Введение вещества, содержащего белки сурфактанта</b>	Контроль	3	6
	6 недель	3	6

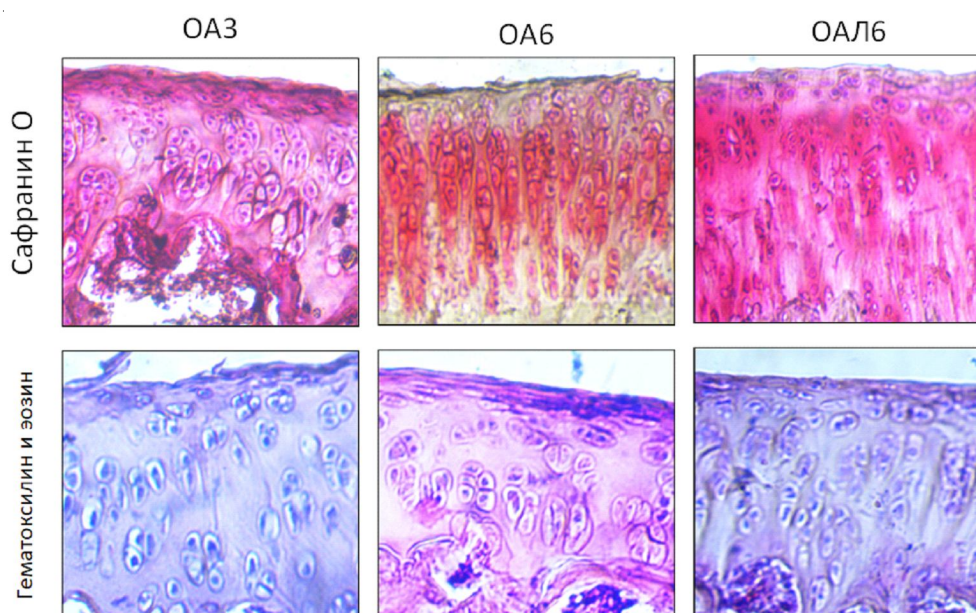


Рис. 1. Суставной хрящ коленного сустава крысы при разных условиях эксперимента. Окраска Сафранином О, Гематоксилином и эозином. Увеличение x240

экспериментальной группой, но при этом в 2 раза выше, чем в контрольной. Ядерно-цитоплазматическое соотношение незначительно возросло на 6-й неделе после введения субстанции (см. рис. 2).

### Выводы

Выявлено, что снижение лубрикативной функции синовиальной жидкости приводит к развитию остеоартроза, и на 6-й неделе был получен самый высокий балл по шкале V.B. Kraus. Происходит сильное повреждение поверхност-

ной зоны суставного хряща, при этом численная плотность хондроцитов значительно возрастает со сроком эксперимента. Повышается пролиферативная активность хондроцитов, но она обладает дегенеративным эффектом.

Также выявлено, что при введении субстанции, содержащей белки сурфактанта, происходит усиленная пролиферация хондроцитов.

Повышенная скорость деления клеток приводит к дегенерации сустава. Белки-сурфактанты в свою очередь являются природным хондропротекторами. Они способны улучшать смазочную функцию синовиальной жид-



Рис. 2. Морфологические изменения параметров суставного хряща и изогенных хондроцитов промежуточной зоны при разных условиях эксперимента

кости. Сурфактантные белки могут быть использованы в качестве собственного хондропротектора, стимулирующего процесс восстановления при остеоартрозе.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Гайворонский, И. В. Анатомия и физиология человека / И. В. Гайворонский, Г. И. Ничипорук, А. И. Гайворонский. – М. : Академия. – 2011. – 495 с.
2. Морфология суставного хряща при экспериментальном остеоартрозе при коррекции состава синовиальной жидкости сурфактант-ассоциированными белками / П. А. Крылов [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2017. – Том. 23, № 3. – С. 50–55.
3. Basic Science of Articular Cartilage / C. Carballo [et al.] // Clinics in Sports Medicine. – 2017. – Vol. 36, № 3. – P. 413–425. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.001>.
4. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis / G. Musumeci [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16, № 9. – P. 20560–20575. – DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms160920560>.
5. CircGcN1L1 Promotes Synoviocyte Proliferation and Chondrocyte Apoptosis by Targeting miR-330-3p and TNF- $\beta$  in TMJ Osteoarthritis / Z. Huimin [et al.] // Cell Death & Disease. – 2020. – Vol. 11, № 4. – P. 284. – DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2447-7>.
6. Compromised Autophagy Precedes Meniscus Degeneration and Cartilage Damage in Mice / J. Meckes [et al.] // Osteoarthritis and Cartilage. – 2017. – Vol. 25, № 11. – P. 1880–1889. – DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2017.07.023>.
7. D'Arcy, M. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy / M. D'Arcy // Cell Biology International. – 2019. – Vol. 43, № 6. – P. 482–492. – DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
8. Fibroblast-Like Synoviocyte Metabolism in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis / M. F. Bustamante [et al.] // Arthritis Research & Therapy. – 2017. – Vol. 19, № 110. – DOI: <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1303-3>.
9. Geyer M., Schönfeld C. Novel Insights into the Pathogenesis of Osteoarthritis / M. Geyer, C. Schönfeld // Current Rheumatology Reviews. – 2018. – Vol. 12, № 2. – P. 98–107. – DOI: <https://doi.org/10.2174/1573397113666170807122312>.
10. Inflammation and Epigenetic Regulation in Osteoarthritis / J. Shen [et al.] // Connective Tissue

Research. – 2017. – Vol. 58, № 1. – P. 49–63. – DOI: <https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1208655>.

11. Multi-Omics Analysis of Synovial Fluid: A Promising Approach in the Study of Osteoarthritis / G. Vicenti [et al.] // Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. – 2018. – Vol. 32, № 6. – P. 9–13.
12. Osteoarthritis Biomarker Responses and Cartilage Adaptation to Exercise: A Review of Animal and Human Models / M. Mazor [et al.] // Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports. – 2019. – Vol. 29, № 8. – P. 1072–1082. – DOI: <https://doi.org/10.1111/sms.13435>.
13. Osteoarthritis: Implementation of Current Diagnostic and Therapeutic Algorithms / G. Meza-Reyes [et al.] // Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social. – 2017. – Vol. 55, № 1. – P. 67–75.
14. T-Cells Interact with B Cells, Dendritic Cells, and Fibroblast-Like Synoviocytes as Hub-Like Key Cells in Rheumatoid Arthritis / X. Hu [et al.] // International Immunopharmacology. – 2019. – Vol. 70. – P. 428–434. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.008>.

**REFERENCES**

1. Gaivoronskii I.V., Nichiporuk G.I., Gaivoronskii A.I. *Anatomia i fiziologiya cheloveka* [Human Anatomy and Physiology]. Moscow, Academia Publ., 2011. 495 p.
2. Krylov P.A., Baydova K.V., Emelyanov N.V., et al. Morfologiya sustavnogo khryashcha pri eksperimental'nom osteoartroze pri korrektsii sostava sinovial'noy zhidkosti surfaktant-assotsiirovannymi belkami [Articular Cartilage Morphology in Experimental Osteoarthritis With and Without Modification of Synovial Fluid by Surfactant-Associated Proteins]. *Zhurnal klinicheskoy i eksperimental'noy morfologii* [Journal of Clinical and Experimental Morphology], 2017, vol. 23, no. 3, pp. 50-55.
3. Carballo C., Nakagawa Y., Sekiya I., et al. Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in Sports Medicine*, 2017, vol. 36, no. 3, pp. 413-425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.001>.
4. Musumeci G., Castrogiovanni P., Maria Trovato F., et al. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16, no. 9, pp. 20560-20575. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms160920560>.
5. Huimin Z., Yihui H., Wang C., et al. CircGcN1L1 Promotes Synoviocyte Proliferation and Chondrocyte Apoptosis by Targeting miR-330-3p and TNF- $\beta$  in TMJ Osteoarthritis. *Cell Death & Disease*, 2020, vol. 11, no. 4, p. 284. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2447-7>.

6. Meckes J., Caramés B., Olmer M., et al. Compromised Autophagy Precedes Meniscus Degeneration and Cartilage Damage in Mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017, vol. 25, no. 11, pp. 1880-1889. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.joca.2017.07.023>.
7. D'Arcy M. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*, 2019, vol. 43, no. 6, pp. 482-492. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
8. Bustamante M.F., Garcia–Carbonell R., Whisenant K.D., et al. Fibroblast–Like Synovocyte Metabolism in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2017, vol. 19, no. 110. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1303-3>.
9. Geyer M., Schönfeld C. Novel Insights into the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reviews*, 2018, vol. 12, no. 2, pp. 98-107. DOI: <https://doi.org/10.2174/1573397113666170807122312>.
10. Shen J., Abu–Amer Y., O'Keefe R., et al. Inflammation and Epigenetic Regulation in Osteoarthritis. *Connective Tissue Research*, 2017, vol. 58, no. 1, pp. 49-63. DOI: <https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1208655>.
11. Vicenti G., Bizzoca D., Carrozzo M., et al. Multi–Omics Analysis of Synovial Fluid: A Promising Approach in the Study of Osteoarthritis. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2018, vol. 32, no. 6, pp. 9-13.
12. Mazor M., Best T., Cesaro A., et al. Osteoarthritis Biomarker Responses and Cartilage Adaptation to Exercise: A Review of Animal and Human Models. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 2019, vol. 29, no. 8, pp. 1072-1082. DOI: <https://doi.org/10.1111/sms.13435>.
13. Meza–Reyes G., Aldrete–Velasco J., Espinosa–Morales R., et al. Osteoarthrosis: Implementation of Current Diagnostic and Therapeutic Algorithms. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 2017, vol. 55, no. 1, pp. 67-75.
14. Hu X., Wu Y., Zhang J., et al. T–Cells Interact with B–Cells, Dendritic Cells, and Fibroblast–Like Synoviocytes as Hub–Like Key Cells in Rheumatoid Arthritis. *International Immunopharmacology*, 2019, vol. 70, pp. 428-434. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.008>.

### Information About the Authors

**Tatyana S. Lyzo**, Student, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Volgograd State University, Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation, [fkbcf-fkbcf@inbox.ru](mailto:fkbcf-fkbcf@inbox.ru)

**Anastasia A. Korchagina**, Student, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Volgograd State University, Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation, [nastya.korchagina09@gmail.com](mailto:nastya.korchagina09@gmail.com)

**Pavel A. Krylov**, Candidate of Sciences (Biology), Associate Professor, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Volgograd State University, Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation, [krylov.pavel@volsu.ru](mailto:krylov.pavel@volsu.ru)

### Информация об авторах

**Татьяна Сергеевна Лызо**, студент кафедры биоинженерии и биоинформатики, Волгоградский государственный университет, просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация, [fkbcf-fkbcf@inbox.ru](mailto:fkbcf-fkbcf@inbox.ru)

**Анастасия Александровна Корчагина**, студент кафедры биоинженерии и биоинформатики, Волгоградский государственный университет, просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация, [nastya.korchagina09@gmail.com](mailto:nastya.korchagina09@gmail.com)

**Павел Андреевич Крылов**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биоинженерии и биоинформатики, Волгоградский государственный университет, просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация, [krylov.pavel@volsu.ru](mailto:krylov.pavel@volsu.ru)