

УДК 57.085

СТРУКТУРА ПЕРИТЕНОНОВ ПАРАВЕРТЕБРАЛЬНЫХ СУХОЖИЛИЙ, ОБРАБОТАННЫХ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

© 2023 г. А. А. Гайдаш¹, *, В. К. Крутько¹, А. И. Кулак¹, О. Н. Мусская¹,
К. В. Скороцкая², Ю. П. Токальчик³, В. А. Кульчицкий³

¹Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

²Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

³Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

*e-mail: algaidashspb@gmail.com

Поступила в редакцию 06.02.2023 г.

После доработки 13.02.2023 г.

Принята к публикации 14.02.2023 г.

Изучены оболочки (перитеноны) паравертебральных сухожилий хвостов крыс Вистар с применением сканирующей электронной микроскопии. Приведена феноменологическая классификация остеоидных структур перитенонов с выделением персистирующих и перманентных их разновидностей. К персистирующим отнесены сесамовидные островки, игольчатые и пластинчатые разрастания, рудименты остеонов. Персистирующие остеоидные структуры хорошо подготовлены к трансформациям, направленным на упрочнение внеклеточного матрикса при механических нагрузках. Перманентные остеоидные структуры — это микрогранулы и ограненные депозиты кальцийфосфатов, участвующие в структурно-механических процессах, гетеро- и гомогенной нуклеации. Гиалуроновая кислота разрыхляет матрикс сесамовидных островков, что увеличивает подвижность сесамовидных глобул, создает предпосылки миграции в зоны повышенной механической нагрузки и минерализации внеклеточного матрикса, включая фибриллярный коллаген. Гиалуроновая кислота склеивает гранулы и депозиты структурирующихся кальцийфосфатов, способствует их росту и фиксации в зонах повышенных рисков механических напряжений. Это принципиально важный адаптивный механизм упрочнения сухожильной ткани, действующий на опережение.

Ключевые слова: перитенон, фибриллярный коллаген, остеоидные структуры, гиалуроновая кислота, сканирующая электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0042132423040063, **EDN:** DGQCHA

ВВЕДЕНИЕ

Сухожильная ткань — это переходная структура, которая занимает специализированные анатомические пространства между мышцами и костным остовом. Сухожилия призваны реагировать прежде всего на механические нагрузки. Именно поэтому сухожильная ткань филогенетически структурируется достаточно рано: впервые появляется у низших хордовых в виде миосепт (Gemballa et al., 2003). При нарастании мощности деформирующих нагрузок сухожилия оптимизируют соотношение жесткости и прочности локальным упрочнением коллагеновых фибрилл и отвердеванием экстрафибрилярного матрикса, образуя временные или постоянно присутствующие, в той или иной мере подвижные очаги кальцификации, формирующиеся в том числе и в составе остеоидных структур (Summers, Koob, 2002). В этом смысле остеоидные структуры сухожилий считают итогом

адаптивных модификаций, расширяющих способность реагировать на сжимающие и растягивающие силы путем последовательного приобретения дополнительных степеней свободы одно-, двух- и трехмерных массивов коллагеновых волокон. Так в процессе эволюции в одноосных сухожилиях, собранных в пучки, появляются многоосные оболочечные надстройки, предназначенные для дифференцированного реагирования на механические нагрузки.

Механобиологический посыл очевиден — сформировать композит, чувствительный к механическому напряжению, армированный фибриллярным коллагеном, с возможностями к механорецепции и структурированию внеклеточного матрикса в хондроидном и остеоидном направлениях (Lanir, 1978). Подобные структуры в сухожильной ткани известны: изучены, в частности, гистогенез, состав и морфологические проявления функциональной динамики сесамовидных островков — наиболее объемных компонентов хондро-остеоидных струк-

тур сухожилий (Гайдаш и др., 2022). Что касается данных о других остеоидных структурах и, прежде всего, об их феноменологических и терминологических определениях, а также морфологической классификации, то таковые в изученной литературе не найдены.

Тем не менее, эти сведения интересны не только для эволюционной биологии, но и для биотехнологии, так как сухожильную ткань широко используют в качестве сырья при получении коллагенсодержащих материалов. Не в полной мере ясны механизмы проникновения остеоидных структур, состояние и поведение в коллагенсодержащих продуктах. Однако их присутствие может быть как целевым компонентом (в остеоиндуктивных скаффолдах), так и попутным, но не всегда желательным. Например, остеоидные структуры в коллагеновых гелях, предназначенных для ожоговых ран, могут спровоцировать неуместную минерализацию и оссификацию струпа, что повысит неопределенность исходов его формирования.

Важным технологическим приемом считают добавление в коллагенсодержащие продукты гиалуроновой кислоты (ГК), известной своими водоудерживающими и структурообразующими свойствами. В частности, ГК увеличивает объем/поверхностное отношение, улучшает кондуктивность, увеличивает вязкость и создает предпосылки для колонизации стволовыми клетками композитов, повышает устойчивость коллагеновых белков к коллагеназам (Suh, Lee, 2002). Введенная в сухожилие в условиях *in vivo* ГК уменьшает сопротивление скольжению внутри коллагеновых волокон, стимулирует синтез фибриллярного коллагена, восстанавливает непрерывность и численную плотность коллагеновых волокон, подавляет в макрофагах синтез цитокинов и пролиферативную активность теноцитов (Huang-Lee et al., 1994; Anandagoda et al., 2012). Несмотря на обширность и многообразие вышеприведенных и аналогичных им исследований, все же основная их часть касается взаимоотношений ГК с коллагеном как с разновидностью фибриллярного протеина.

Гораздо менее изучено действие ГК на целостную сухожильную ткань. Кроме того, во многом остается непонятым и характер влияния ГК на остеоидные структуры сухожилий.

Ранее показано (Гайдаш и др., 2022), что приоритетным местоположением остеоидных структур в пространстве сухожильной ткани служат поверхностные слои коллагеновых массивов, граничащие с надкостницей прилежащих костных образований. Это одно из обстоятельств, которое предопределило выбор объекта данного исследования, а именно перитеноны — оболочечные структуры сухожильных пучков.

Другим мотивом в выборе объекта стало предположение о насыщенности перитенонов струк-

турными предикторами остеогенеза. Выдвижение гипотезы основано на анатомической близости перитенонов к надкостнице с ее мощным регенераторным потенциалом, структурные функционалы которой в ходе филогенеза и онтогенеза могли мигрировать в пограничные слои сухожильных пучков.

Понимание функционально-морфологических особенностей структурных предикторов остеогенеза в ходе реагирования на фармакологические агенты имеет значение при проектировании остеоиндуктивных или, наоборот, остеолитических коллагенсодержащих материалов. В связи с этим цель работы состоит в определении морфологических особенностей перитенонов паравerteбральных сухожилий, обработанных ГК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены перитеноны паравerteбральных сухожилий, извлеченные из хвостов крыс линии Вистар. В эксперименте использовали половозрелых самцов с массой тела 250–300 г, выдержанных на сбалансированном рационе. Биопсию производили у крыс, наркотизированных этиловым эфиром. Протоколы эксперимента утверждены этическим комитетом Института физиологии НАН Беларуси и соответствовали Санитарным нормам 2.1.2.12-18-2006 (Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. 2012. № 8/25189).

Исечение образцов произведено следующим образом: сепаровка кожи, круговой надрез связок, перелом и разделение позвоночного столба в средней части хвоста, извлечение из проксимального сегмента сухожильных пучков, продольное вскрытие сухожильной оболочки и отсечение свободных листков перитенонов. Данная техника позволяет выделять перитеноны без примеси костных компонентов надкостницы. Эксперимент выполнен в формате краткосрочных трехмерных органных культур, признанных стандартом исследований при тестировании фармакологических агентов. Для этого пластинки перитенонов размерами 3 × 5 мм инкубировали при температуре 37°C в 0.9%-ном водном растворе NaCl с добавлением канамицина в дозе 0.001 г/мл. ГК вводили в составе препарата Гилартен (S.C. Rompharm Company S.R.L., Romania), содержащего 2.0% ГК (M_r ≈ 1–2 МДа) высокой степени очистки, без животных белков, стабилизированной 0.5%-ным раствором маннитола. Изучены следующие группы образцов: 1 — контроль; 2 — инкубация с ГК в течение 1 ч; 3 — инкубация с ГК до 2.5 сут.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы фиксировали на протяжении 3 сут в водном 3%-ном растворе глutarового альдегида, промывали в трех сменах дистиллированной воды, дегидратировали в водных растворах этанола восходящей концентрации и напыляли золотом

на установке K550X (Emitech, Great Britain). Морфологические исследования выполнены на сканирующем электронном микроскопе LEO 1420 (Carl Zeiss, Deutschland).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Контрольная группа

Перитенон — это капсула, вмещающая в себя продольные коллагеновые пучки (3–4 порядков), сшитые тонкими (1–2 порядков) волокнами поперечно-тангенциальной направленности. Анатомически выделяют два листка: наружный и внутренний.

Наружный — относительно равномерный тонкий листок, формирующий париетальную стенку капсулы перитенона, обращенную к кожному покрову (рис. 1а). Морфологически наружный листок составлен плотно упакованными пучками, организованными в параллельные блоки и ряды. По длинной оси пучки периодически расширяются и сужаются. Длина расширенного участка составляет 5.5 мкм, узкого — 3.0 мкм, доля расширенного участка относительно всей длины периода (в данном случае $D = 8.5$ мкм) варьирует в пределах 0.64 D. Поверхность в участках расширения гладкая, окатанная. На микрометровом уровне это придает текстуре пучков вид упорядоченной квазизернистости (рис. 1б). На субмикрометровом уровне в субфибриллах первого порядка толщиной 20–50 нм также выявлены периодичные расширения и сужения, обусловленные продольным сдвигом нитей тропоколлагена. Шаг периодов варьирует в пределах 64–67 нм, что характерно для доменной организации фибриллярного коллагена I типа. Совпадение численных значений структурных фракций не случайно и отражает доменную организацию фибриллярного коллагена I типа, проявляющуюся в фундаментальном соотношении 0.64 D на всех уровнях организации коллагеновых волокон. В участках ремоделирования выявлены истонченные, с укороченными компонентами доменов (главный участок — 1.7 мкм, узкий — 2.3 мкм), уплощенные микрофибриллы с невидимой D-периодичностью. Волокна при этом изгибаются: угол изгиба между фибриллами варьирует в пределах 14° – 85° (в среднем 41°), принимают извилистый вид и уходят вглубь, образуя зигзагообразные Z-структуры (рис. 1в). Морфометрические показатели свидетельствуют о том, что эти волокна лишены атрибутивных размерных соотношений, что означает их структурную незрелость. В связи с этим, отметим полиморфизм очагов скопления Z-структур, вблизи которых накапливаются матриксные везикулы и рассеяны коллагеновые фибриллы разной степени структурной зрелости. Вышеприведенные количественно-морфологические показатели могут быть использованы в качестве

диагностических критериев целостности на уровне сухожильных пучков — по критериям размерных долей структурных фракций коллагеновых пучков и упорядоченности квазизернистости, на уровне субфибрилл при оценке регенераторной активности — по критериям местоположения и размерных параметров Z-структур. Коллагеновые волокна 2–4 порядков образуют субслои, между которыми расположены фибриллярные узлы. На СЭМ фибриллярные узлы имеют вид переброшенных субфибрилл. Размер центра сопряжения (собственно узла) варьирует от 0.139 до 0.662 мкм (в среднем 0.324 ± 0.03), показатель r — число волокон, связанных с узлом, — варьирует от 3 до 5 (3.6 ± 0.02). Узлы расположены небольшими группами в изгибах коллагеновых пучков или образуют сети, охватывающие широкие пучковые массивы (рис. 1г). Некоторые узлы могут обжимать отдельные тяжи. Величины углов и длин обжимов различаются в разных слоях: чем глубже, тем меньше, что повышает отказоустойчивость конструкции. Главное предназначение фибриллярных узлов состоит в предотвращении избыточного рассеяния энергии, накопленной при растяжении/сжатии, а также при скручивании (Kastelic et al., 1978; Jansen et al., 2018).

Внутренний (дорзальный) листок имеет неравномерную толщину и обращен к позвоночному столбу, к надкостнице которого прикреплен посредством прерывистых поперечных микросвязок. Между внутренним листком и надкостницей позвонков сформировано щелевидное пространство, структурированное интерстициальными мембранами (рис. 1д). Морфологически интерстициальные мембраны — это перфорированные перегородки, образованные коллагеновыми волокнами первого порядка и расположенные в просветах интерстициальных щелей под острыми углами к их длинной оси. Толщина мембран не превышает 1.5–2.0 мкм, а диаметр пор, имеющих неправильную форму спавшихся отверстий, колеблется в пределах от 100 нм до 2–3 мкм. Интерстициальные пространства анастомозируют с каналами, расположенными между внутрикапсулярными пучками. В органных культурах перитенонов, выдержанных в физиологическом растворе в течение 2.5 сут, все поровые структуры резко расширены, соустья открыты, мембраны приподняты (рис. 1е). Это отражает регуляторный функционал сообщающихся интерстициальных пространств, структурирующих гидродинамические потоки в бессосудистом сухожилии.

Наружный и дорзальный листки имеют промежуточную без резких границ прослойку рыхлой волокнистой ткани, которая посредством сети тонких волокон и фибриллярных узлов связана с внутрикапсулярными сухожильными пучками. Плотность взаимоприлегания волокон в промежуточной прослойке неравномерная: участки расправления

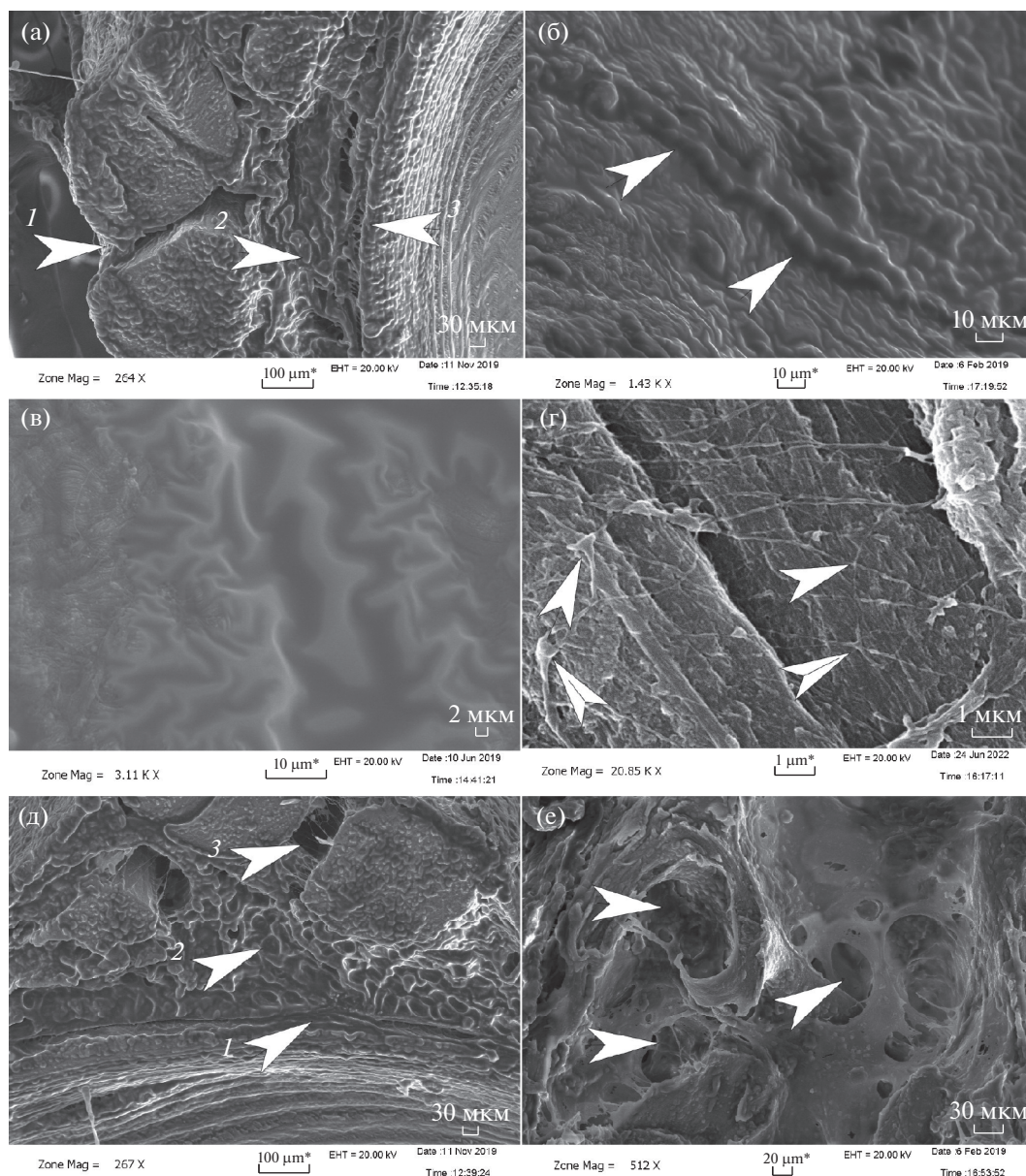


Рис. 1. СЭМ-изображения анатомических компонентов сухожилий контрольной группы: (а) стрелка 1 – наружный листок перитенона, стрелка 2 – внутренний листок, стрелка 3 – надкостница позвонка; (б) текстура поверхности коллагеновых пучков; (в) очаг ремоделирования коллагеновых фибрилл (Z-структуры); (г) сеть фибриллярных узлов; (д) структуры дорзального листка: стрелка 1 – интерстициальная щель между дорзальным листком перитенона и надкостницей позвонка, стрелка 2 – отросток эндотенона, стрелка 3 – интерстициальные каналы между пучками коллагеновых волокон; (е) расширенные интерстициальные каналы в перитеноне, инкубированном в биомиметической среде в течение 2.5 сут.

чередуются с очагами уплотнения. Сети пронизывающих тонких волокон и фибриллярных узлов формируют структуру подвижного каркаса, широкие пустоты которого заполнены компонентами экстрафибрилярного матрикса (теноциты, матриксные везикулы, тканевой флюид и т.п.). Каркасная структура повышает прочность и устойчивость конструкции пограничной прослойки, но функционирование в режиме повышенных механических нагрузок увеличивает расход фибрил-

лярного протеина и стимулирует создание упрочняющих структур. Именно поэтому в промежуточных прослойках обоих листков перитенонов сосредоточены вышеописанные Z-структуры, количество которых закономерно возрастает по мере приближения очагов ремоделирования к надкостнице позвонков. Тренд на упрочнение поддерживает и оформление остеодных структур в сесамовидные островки, игольчатые, стебельковые и пла-

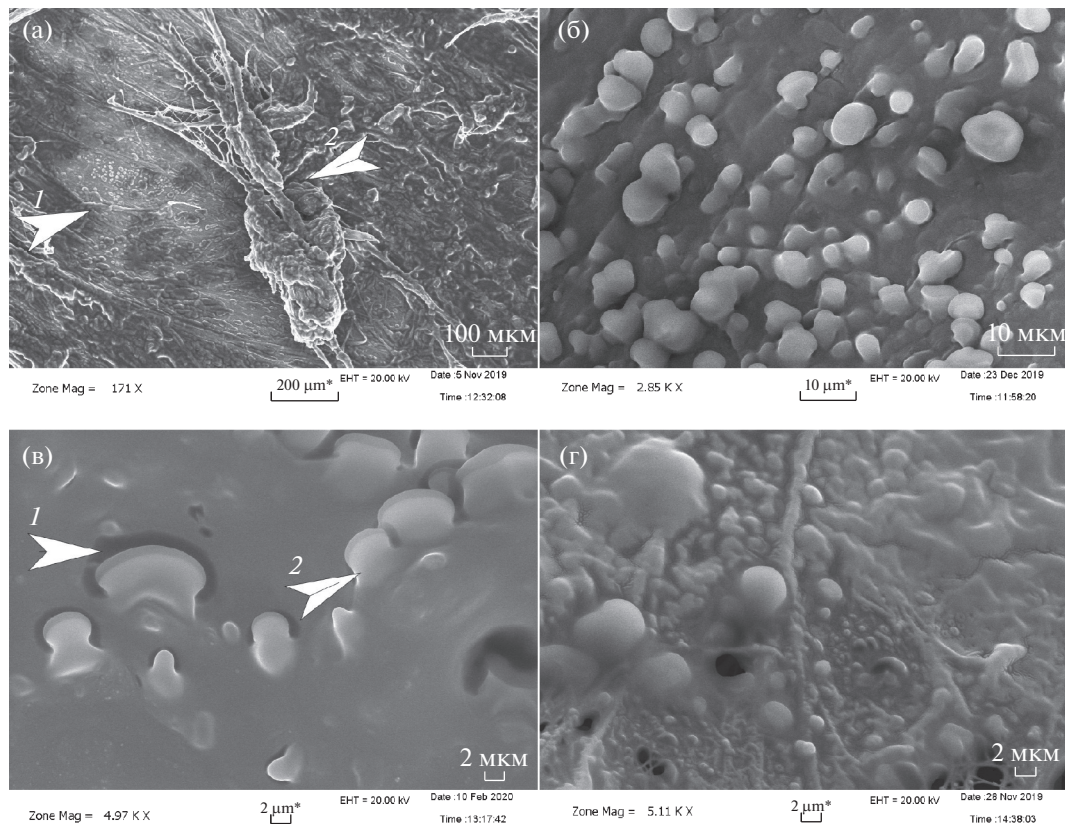


Рис. 2. СЭМ-изображения структур сесамовидного островка в перитеноне контрольной группы: (а) стрелка 1 — сесамовидный островок, стрелка 2 — отростчатый теноцит; (б) глобулы сесамовидного островка; (в) двухуровневая конструкция глобул сесамовидного островка, стрелка 1 — верхний уровень, стрелка 2 — нижний уровень; (г) текстура поверхности сесамовидного островка в области поры.

стинчатые разрастания, а также в остеоподобные образования.

Сесамовидные островки — это наиболее объемная разновидность остеонидных структур перитенонов. Структурно островки имеют вид очагов уплотнения внеклеточного матрикса. В центре или в непосредственной близости от сесамовидных островков расположены отростчатые теноциты (рис. 2а). Островки концентрируются преимущественно вблизи мягкой части энтез — костно-сухожильных переходов, распространяющихся в том числе и на дорзальные листки перитенонов. Предпочтительность данной локации не случайна: энтезы — это механосенситивные центры, регулирующие распределение механических напряжений (Benjamin et al., 2006). Важным компонентом островков являются сесамовидные глобулы — овальные частицы диаметром 2–11 мкм (5.7 ± 0.4) (рис. 2б). Глобулы имеют двухуровневую структуру. Верхний уровень высотой 0.47–2.11 мкм (0.97 ± 0.1) прикрывает нижний слой в виде рыхлого чепчика. Нижний уровень высотой 1.4–5.2 мкм (3.3 ± 0.3) — плотный, однородный, погружен в разрыхленный подлежащий слой внеклеточного матрикса (рис. 2в). Сесамовидные глобулы имеют

клеточное происхождение, так как морфологически (структура поверхности оболочки), а также функционально (глобулы накапливаются в зонах ремоделирования) сходны с матриксными везикулами теноцитов, участвующих в процессах первичной минерализации регенерирующей хрящевой и костной тканей (Amizuka et al., 2012, 2014). По химическому составу содержащего сесамовидные глобулы, по-видимому, близки к составу кальцийсфероидов — структур шаровидной формы, встречающихся в эпифизарной пластинке костно-хондральных соединений и участвующих в синтезе гидроксиапатита (Hasegawa et al., 2017). Основная часть сесамовидных глобул расположена в поверхностных слоях островков преимущественно вблизи пор и лакун (рис. 2г). На территории одного островка может находиться несколько десятков сесамовидных глобул, количество которых регулируется почкованием, сопровождающимся неравномерным распределением вещества.

Пластинчатые образования — это коллагеновые микрофибриллы, упакованные в пластинчатые структуры. Морфологически пластинчатые образования представляют собой тонкие, плотные в основаниях пластинки, располагающиеся в

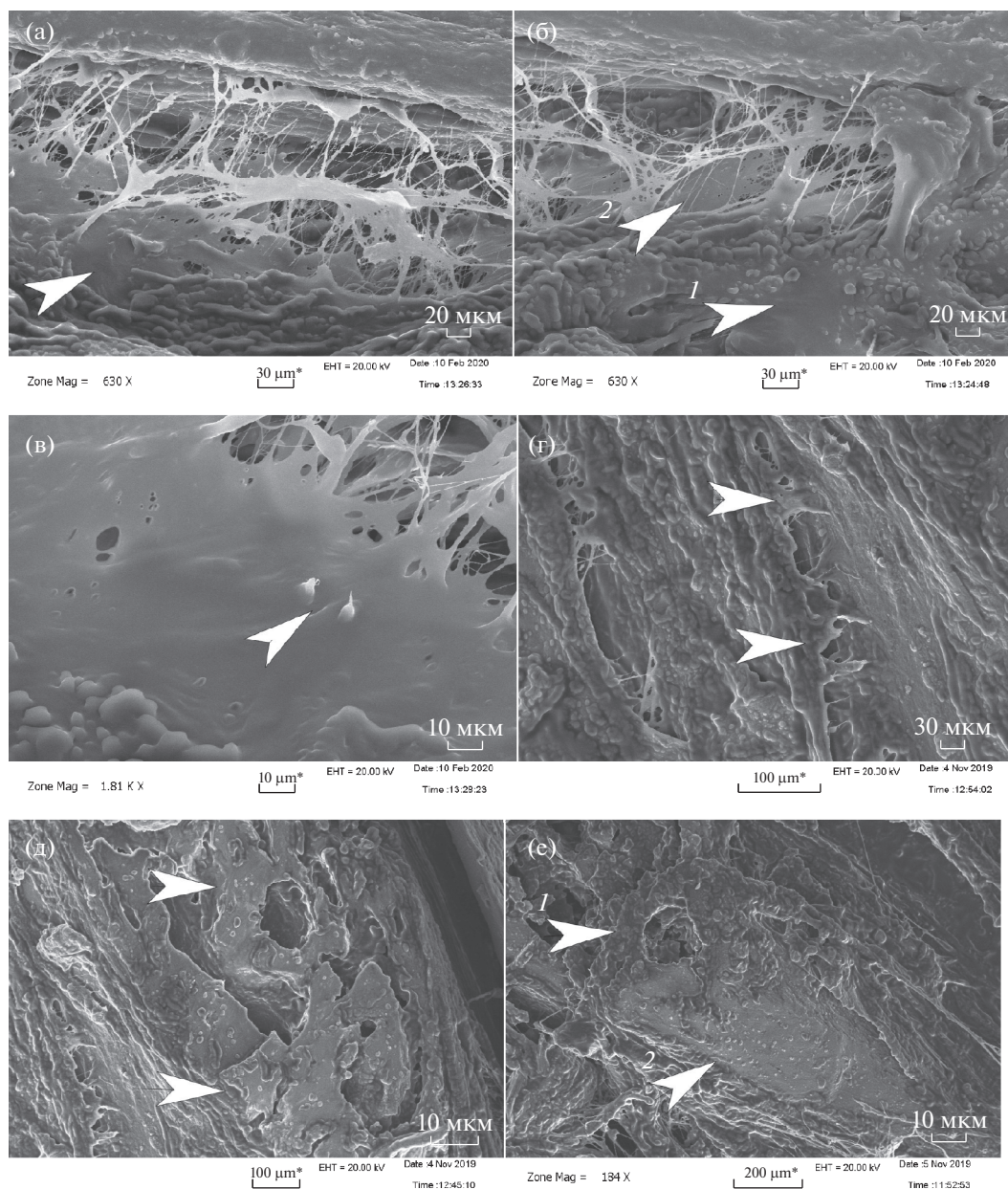


Рис. 3. СЭМ-изображения пластинчатых, игольчатых и остеоноподобных структур перитенонов контрольной группы: (а) пластинчатые структуры; (б) многослойные пластинчатые структуры в межфибрилярном пространстве вблизи сесамовидного островка: стрелка 1 – сесамовидный островок, стрелка 2 – плотная пластинчатая структура; (в) клювовидные игольчатые разрастания; (г) стебельковые разрастания; (д) остеоноподобные структуры; (е) остеоноподобное разрастание, ассоциированное с сесамовидным островком (стрелки 1 и 2).

расширенных межфибрилярных пространствах (рис. 3а), ориентированных в основном вблизи сесамовидных островков (рис. 3б). Это обстоятельство позволяет признать данные образования структурными предикторами сесамовидных островков.

Игольчатые разрастания – это остроконечные выросты матрикса, напоминающие клювики, располагающиеся на поверхностях сесамовидных островков (рис. 3в) и коллагеновых фибрилл.

Стебельковые разрастания – это более крупные, ветвящиеся формы, часть которых имеет гаверсоподобные отверстия. Стебельковые разрастания преимущественно локализованы в глубоких слоях дорзальных листков перитенонов (рис. 3г).

Остеоноподобные структуры – это бесклеточные, слоистые (3–5 плотно склеенных слоев), отвердевшие образования, форма которых схожа с гистологической формой зрелых остеонов с характерным гаверсоподобным отверстием в цен-

тре, но без кровеносных сосудов и нервных стволов (рис. 3д). Некоторые остеоноподобные образования непосредственно контактируют с сесамовидными островками и с минерализованными коллагеновыми волокнами костно-сухожильных переходов (рис. 3е). В этих участках остеоноподобные структуры формируют разветвленные комплексы, схожие со спонгиозной костью.

Влияние гиалуроновой кислоты на фибриллярный компонент перитенонов

Коллагеновые фибриллы через час от начала обработки ГК покрываются тонкой гладкой пленкой, что свидетельствует о равномерном растекании тканевой жидкости по поверхности коллагеновых волокон (рис. 4а). Это значит, что ключевым морфогенетическим фактором, по крайней мере в ранние сроки действия агента, является последовательное снижение поверхностного натяжения, возможно, обусловленное адсорбцией ГК на белковые матрицы с образованием полярных покрытий типа пленок Ленгмюра (Nonogaki et al., 2000). В ходе растекания тканевой жидкости по поверхности D-периодичность (рис. 4б) и зигзагообразные структуры (рис. 4в) дезорганизуются, что создает предпосылки для затормаживания процессов ремоделирования коллагеновых волокон. При действии ГК в течение 18 ч тканевая жидкость становится более подвижной, и ее проникающая способность увеличивается. Об этом свидетельствуют данные СЭМ: доменная структура коллагеновых фибрилл разупорядочивается, значительная часть волокон сжимается, межфибрилярное пространство увеличивается, отдельные пучки рвутся, покрываются толстой пленкой (рис. 4г). Коллагеновый каркас разрыхляется, плотность упаковки волокон уменьшается. Этому может способствовать трансформация ГК в полугибкий полимер с разорванной и одновременно воссоздаваемой структурой водородных связей (Knill et al., 2002). Внеклеточный матрикс пронизывается тонкими (толщиной до 1.5 нм) волокнами без характерной для фибриллярного коллагена D-периодичности (рис. 4д). Возможно, это нити полимеризованной ГК, которая формирует разветвленные нитчатые перетяжки, фрагментирующие интерстициальное пространство. ГК уплотняет стенки расширенных интерстициальных каналов, к их поверхностям адгезируют сферические частицы ГК (рис. 4е). Рост пористости экстрафибрилярного матрикса, открытие пор интерстициальных мембран и уплотнение их стенок снижает пластичность в регулировании направленности и скорости тканевых гидродинамических потоков и разупорядочивает их.

При увеличении продолжительности действия ГК до 2.5 сут проникающая способность интерстициального флюида возрастает. На СЭМ это верифицируют в виде проникновения тканевой жидкости в более глубокие слои коллагеновых пучков.

Практически речь идет об углублении сэндвич-эффекта, свидетельствующем о прогрессирующем понижении вязкости тканевой жидкости. Прогнозируемая причина этого состоит в длительной экспозиции при температуре 37°C, при которой удельная вязкость водных растворов ГК уменьшается примерно на 25% за счет сокращения гидродинамического радиуса, облегчения вращения связей между остатками сахара и, соответственно, увеличения гибкости первичных цепей ГК, а также динамического образования и разрыва водородных связей, снижения модуля упругости и укорочения полимерных цепей ГК (Hardingham et al., 2002; Hoefling et al., 2002). Влияние pH на вязкость ГК не столь однозначно: нейтральные водные растворы ГК затвердевают. При возрастании щелочного тренда до pH 8 (инкубация образцов осуществлена при pH 7.0–7.5) ГК подвергается существенным структурным преобразованиям: депротонируются карбоксильные группы, увеличивается скорость вращения глюкозидных остатков и рвутся водородные связи (Caspersen et al., 2014; Cowman et al., 2015; Gatej et al., 2015). В результате границы межфазовых интерфейсов разделяются и появляются предпосылки для усадки объема растворов ГК. На СЭМ регистрируют очаговые отслоения пленок, покрывающих коллагеновые фибриллы.

Отметим, что выбранная для эксперимента концентрация ГК (1 мг/мл), по-видимому, достаточно высокая, так как по данным СЭМ неколлагеновые нити запутываются, сворачиваются, скручиваются, сцепляются с коллагеновыми волокнами. Это свойственно концентрированным растворам ГК (Scott et al., 1991; Knepper et al., 1995). Вышеприведенные особенности свидетельствуют об интенсивных агрегационных и адгезионных взаимодействиях между волоконными компонентами интерстиция и переходными формами ГК.

Влияние гиалуроновой кислоты на тканевой флюид перитенонов

Во внеклеточном матриксе преимущественно в пограничной прослойке обоих листков перитенонов, обработанных ГК, присутствуют полиморфные частицы: разрозненные или агрегированные в ассоциаты диаметром 0.77–2.11 мкм (в среднем 1.51 ± 0.1). Более крупные — частицы диаметром до 2.5 мкм преимущественно эллипсоидной формы с одним ядром, окруженным рыхлым гало (рис. 5а). Диаметр ядер варьирует в пределах 0.17–1.41 мкм (0.8 ± 0.1). Ядра в основном плотные, неоднородные, образованы слившимися мелкими гранулами. Некоторые ядра имеют мелкозернистую, сетчато-волоконистую структуру. Гало представляет собой бесструктурную субстанцию в виде оболочки толщиной 0.12–0.65 мкм (0.32 ± 0.1), более выраженную у эллипсоидных частиц. Край гало — разрыхленные с множественными тонкими выростами каймы. Наличие частиц, содержащих гало, свидетельствует о том, что в ранние

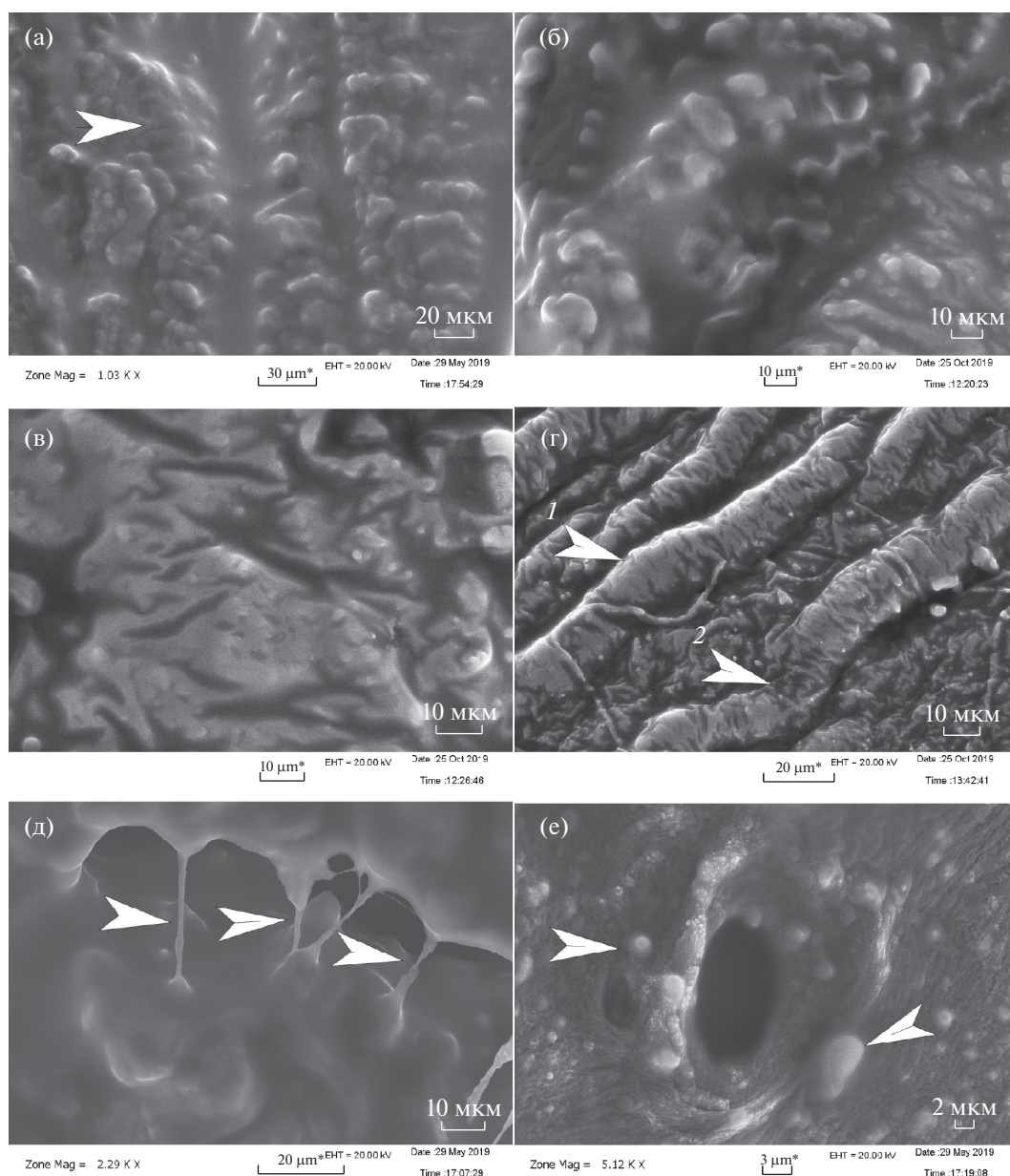


Рис. 4. СЭМ-изображения коллагеновых волокон и интерстициальных каналов в перитонеах, обработанных ГК в течение 1.0 ч, 2.0 сут и 2.5 сут: (а) тонкая пленка ГК, покрывающая коллагеновые волокна (1.0 ч); (б) дезорганизация доменной структуры в коллагеновых волокнах (1.0 ч); (в) дезорганизация Z-структур в очаге ремоделирования коллагеновых волокон (1.0 ч); (г) стрелка 1 – экранирование домена коллагенового волокна толстой пленкой ГК (2.5 сут), стрелка 2 – дефект в коллагеновой фибрилле (2.0 сут); (д) поперечные тонкие волокна в интерстиции (2.0 сут); (е) расширение интерстициального канала и адгезия глобул ГК к стенке каналов (1.0 ч).

сроки интервенции ГК подвержена трехмерной конформации преимущественно за счет гидратации. Механизм гидратации ГК известен – это образование водородных связей молекул воды с карбоксильным остатком глюконовой кислоты и формирование tandemных водных мостиков (Donati et al., 2001). ГК ведет себя как застывшая случайная катушка, окруженная слоистой гидратной оболочкой с неоднородной молекулярной динамикой: чем дальше от поверхности ГК, тем более

подвижны молекулы воды (Almond et al., 2006; Prusova et al., 2010). Структура гидратной оболочки в определенной мере подобна СЭМ-структуре вышеописанного гало – здесь также: чем дальше от ядер частицы, тем более лабильная фестончатая структура гало, кайма которой постепенно сливается с текстурой интерстициального флюида. Гало увеличивает подвижность частиц ГК: нано- и микроглобулы проникают в узкие межфибрилярные пространства, провоцируя очаговые разрушения (возможно,

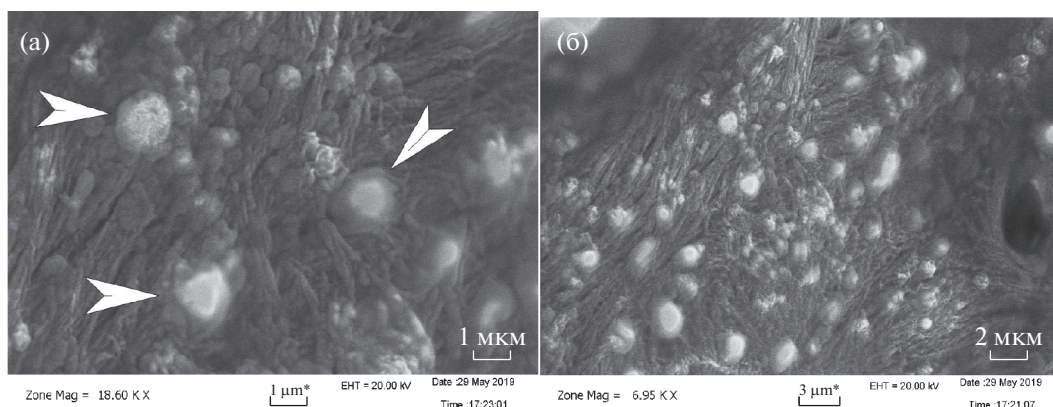


Рис. 5. СЭМ-изображения глобул ГК в перитенонах, обработанных ГК в течение 1.0 ч: (а) структура эллипсоидных глобул с периферическим гало; (б) инфильтрация глобул ГК в межфибрилярные пространства.

по механизму расклинивающего эффекта) тонких (1–2 порядков) субфибрилл (рис. 5б).

Влияние гиалуроновой кислоты на остеоидные структуры

Сесамоидные островки. Под воздействием ГК глобулы увеличиваются в размерах (8.8 ± 0.7 мкм) и почкуются (рис. 6а). Механизмы гипертрофии глобул неизвестны. По-видимому, ГК стимулирует метаболизм, сопровождающийся наращиванием массы глобул. На это указывает присутствие в большей части глобул внутренних точек роста, контурирующих на наружной поверхности глобулярной мембраны в виде набухающих почек. Вокруг глобул появляются зоны разрыхления и лизиса матрикса. Подобные литические разрыхления присутствуют и вне островкового матрикса и нередко в местах сосредоточения фибриллярных узлов, инфильтрированных сферическими частицами диаметром $0.17\text{--}0.73$ мкм (0.37 ± 0.04). Частицы окружены гало, что придает им сходство с глобулами ГК (рис. 6б). В связи с разрыхлением утрачивается связь и усиливается подвижность глобул: они мигрируют в периферические участки островков и вторгаются в прилежащий экстрафибрилярный матрикс (рис. 6в), далее расселяются и вступают в адгезионные взаимоотношения с коллагеновыми волокнами (рис. 6г). Механизм деструкции оболочек глобул и матрикса сесамоидных островков не ясен. Морфологически лизис островкового матрикса имеет довольно типичную картину: на ранних стадиях — это эрозия поверхностного слоя (рис. 6д), позже возникают пустоты, содержащие детрит из частиц нерастворившихся коллагеновых фибрилл и остатков матрикса. При этом края пустот как бы изъедены, что характерно для ферментативного лизиса (рис. 6е). Одной из причин лизиса может быть активация щелочных фосфатаз, обусловленная механической нестабильностью глобул, испытывающих деформации

растяжения/сжатия внутриглобулярных потоков тканевой жидкости. Щелочная фосфатаза, как известно, посредством механочувствительных ионных каналов реагирует на механические напряжения, в том числе и вызванные пульсацией интерстициальной жидкости (Kraft et al., 2010; Wu et al., 2021). Не менее важна и другая причина активации разрушения матрикса сесамоидных островков, а именно способность ГК подавлять высвобождение протеогликанов из внутриклеточных сред (Shimazu et al., 1993). Однако протеогликаны, облигатно входящие в состав островкового матрикса, упрочняют его путем склеивания коллагеновых фибрилл. Учитывая это, логично ожидать, что локальный дефицит полисахаридов усугубит деструкцию островкового матрикса.

Игольчатые и стебельковые разрастания. Под воздействием ГК наблюдается уменьшение высоты клювовидных игольчатых разрастаний до 2.1 ± 0.1 мкм (в контроле 3.5 ± 0.1 мкм) и явное сужение их основания до 1.6 ± 0.1 мкм (в контроле 2.2 ± 0.1 мкм). При этом основная часть этой формы игольчатых разрастаний встречается на территории сесамоидных островков (рис. 7а). На остальном протяжении фибриллярного матрикса игольчатые разрастания клювовидной формы находятся под толстым слоем ГК, что делает их малозаметными. Стебельковые формы (рис. 7б) игольчатых разрастаний проявляют аналогичный тренд: укорачиваются до 36.3 мкм (в контроле 49.3 ± 2.4 мкм) и истончаются до 10.1 ± 0.5 (в контроле 38.4 ± 2.6 мкм). Причиной субтрофических изменений игольчатых разрастаний может быть водоотнимающий эффект ГК. Это коррелирует с СЭМ-признаками поперечного сжатия (скручивание, изгибы) и сухого перелома в виде растрескивания оснований значительной части игольчатых разрастаний.

Пластинчатые структуры. При воздействии ГК усиливается компактизация коллагеновых во-

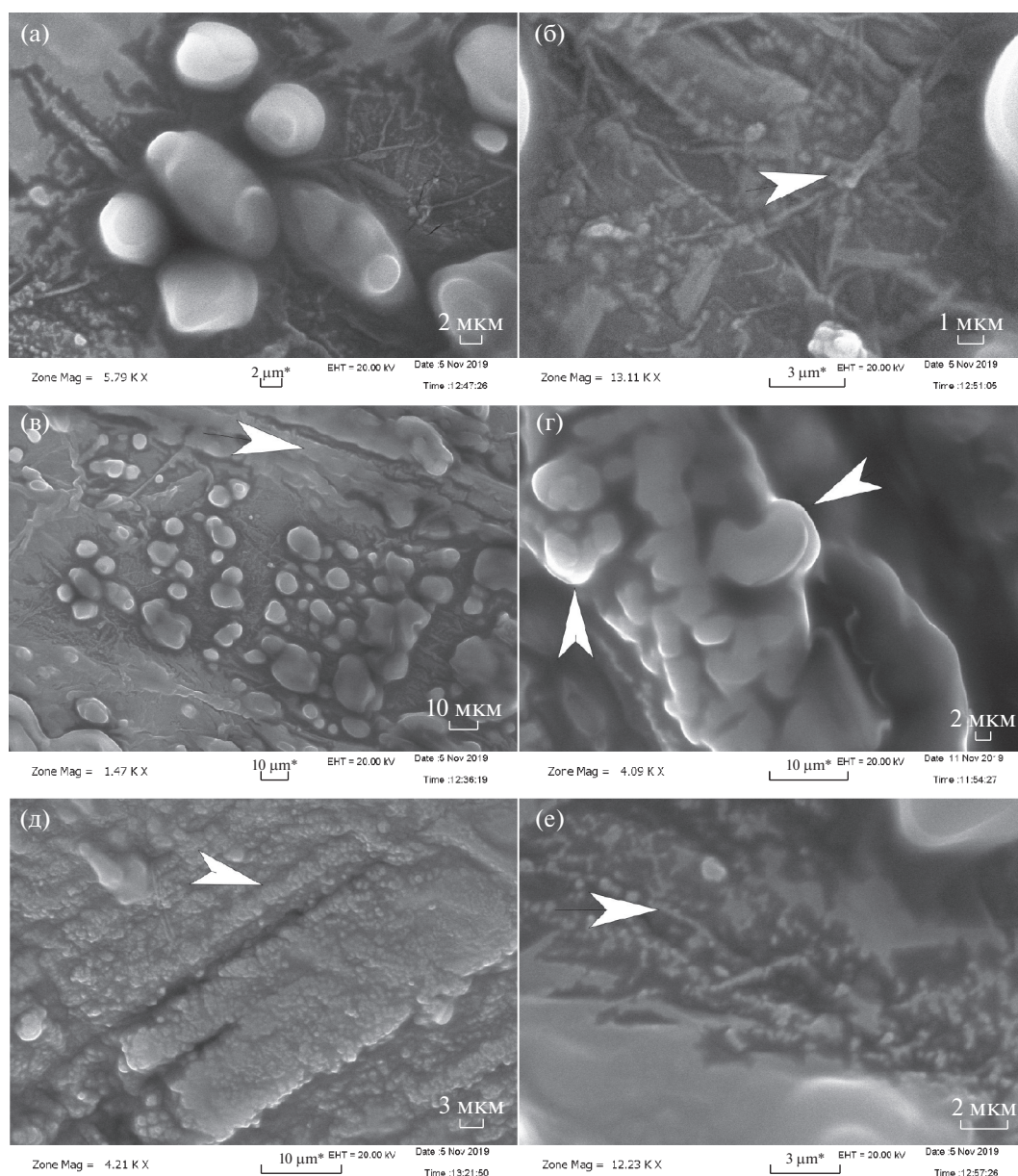


Рис. 6. СЭМ-изображения сесамойдных структур в перитенонах, обработанных ГК в течение 2.5 сут: (а) крупные, почкующиеся сесамойдные глобулы; (б) фибриллярный узел в зоне лизиса матрикса сесамойдного островка; (в) миграция сесамойдных глобул в экстрафибриллярный матрикс; (г) адгезия сесамойдных глобул к коллагеновым волокнам; (д) поверхностное эрозирование матрикса сесамойдного островка; (е) участок ферментативного лизиса матрикса сесамойдного островка.

локон, что проявляется при действии агента более 24 ч. Процессы компактизации затрагивают структуры, находящиеся вблизи, прежде всего, сесамойдных островков. Коллагеновые волокна, окаймляющие островки, покрыты толстой гиалуроновой пленкой с признаками усадки в виде сжатия и очагового отслаивания (рис. 7в). Текстура островкового матрикса разрыхляется, обнажаются ветвящиеся фибриллы с характерной для фибриллярного коллагена периодичностью, и открываются поры (рис. 7г). Волокна в периостров-

ковых регионах утолщаются и компактизируются, переплетения уплотняются (рис. 7д). Межфибриллярные пространства расширены, пронизаны склеенными коллагеновыми субфибриллами, местами формирующими тонкую, прозрачную пленку, более характерную для зарождающихся сесамойдных островков (рис. 7е). Механизмы компактизации коллагеновых волокон при длительном действии ГК, вероятно, обусловлены кислотной деградацией ГК, уменьшением ее молекулярной массы и числа структурных субъединиц (Mikel-

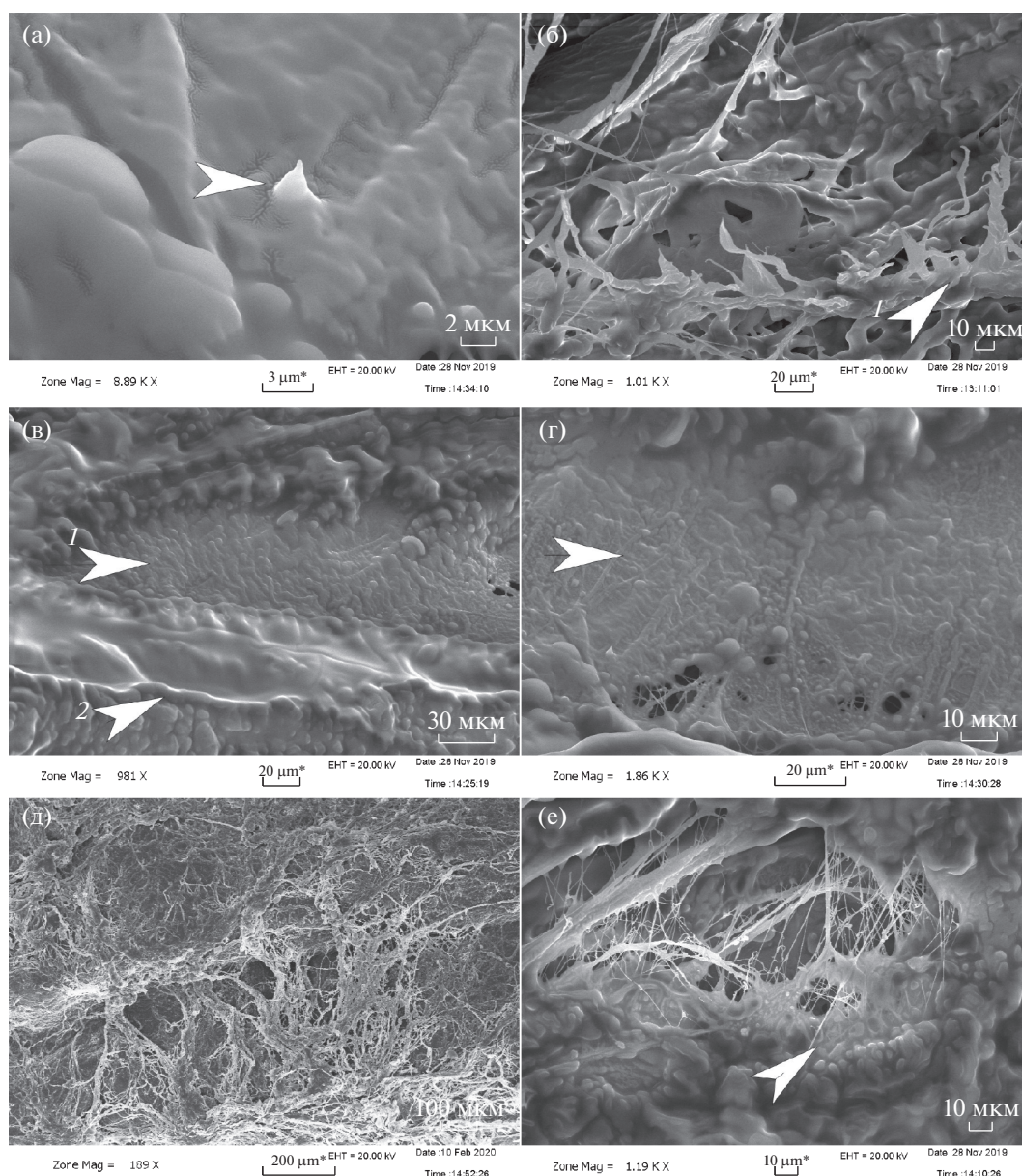


Рис. 7. СЭМ-изображения пластинчатых, игольчатых и остеоподобных структур в перитенонах, обработанных ГК в течение 2.5 сут: (а) клювовидные игольчатые разрастания; (б) стебельковые разрастания; (в) сесамовидный островок и фибриллярный collagen: стрелка 1 – сесамовидный островок, покрытый ГК, стрелка 2 – collagenовое волокно, покрытое толстой пленкой ГК; (г) текстура матрикса сесамовидного островка; (д) компактизация collagenовых волокон в каркасе перитенона; (е) компактизация collagenовых волокон в зарождающемся сесамовидном островке.

saar, Scott, 1994; Frayssinet et al., 2018). Компактизация collagenовых фибрилл — это ключевой механизм ламеллярной трансформации фибриллярного каркаса перитенонов, который на молекулярном уровне, возможно, контролирует структурно-массовые переходы между третичными структурами (бета-листами) ГК и двойными спиралями полипептидных цепей фибриллярного collagena (Mikelsaar, Scott, 1994).

Остеоподобные образования. Наружный слой остеонів покрывается пленкой ГК, на которой рас-

положены сесамовидные глобулы. Данный эффект, возможно механический, так как значительная часть сесамовидных островков является анатомической частью остеоподобных образований.

Влияние гиалуроновой кислоты на морфологические проявления структурирования кальцийфосфатов

По данным СЭМ, структурирующиеся кальций-фосфаты присутствуют в двух морфологических формах: микрогранулах и ограненных депозитах.

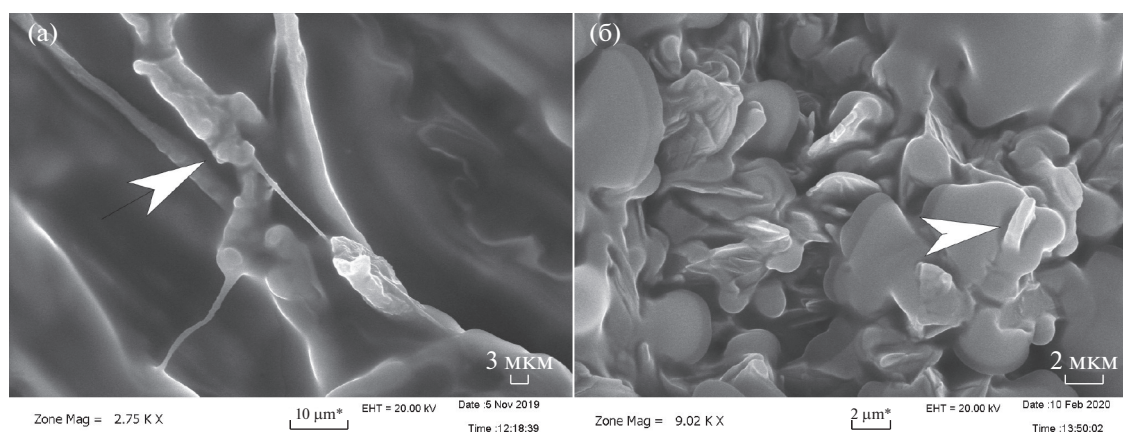


Рис. 8. СЭМ-изображения структурированных кальцийфосфатов в перитенонах, обработанных ГК в течение 2.5 сут: (а) гранулы кальцийфосфатов на поверхностях коллагеновых волокон; (б) депозиты на поверхности сесамовидных глобул.

Микрогранулы размером 10–15 нм расположены внутри или на поверхности коллагеновых фибрилл. Присутствие микрогранул считают проявлением гетерогенной нуклеации кальцийфосфатов, осуществляемой на матрицах коллагеновых волокон (Landis, Silver, 2009). Объективно это визуализируется отложениями микрогранул на поверхностях субфибрилл преимущественно пластинчатых предикторов сесамовидных островков. На ранних стадиях частицы структурирующихся кальцийфосфатов осаждаются в просветах интердигтирующих каналов коллагеновых микрофибрилл (Nudelman et al., 2010). В образцах 1-й группы (по условиям эксперимента в ситуации относительного физиологического покоя) гранулы демонстрируют застывшее состояние: гранулы симметричны, короткие оси преимущественно перпендикулярны длинным осям коллагеновых фибрилл, упорядочены по размерам и форме, стремящейся к сфероидам. В состоянии, возмущенном действием ГК (образцы 3-й группы с продолжительностью действия ГК до 2.5 сут), микрогранулы проявляют признаки роста: увеличиваются преимущественно по коротким осям, центры частиц асимметрично смещены, не строго перпендикулярны длинным осям коллагеновых субфибрилл, микрогранулы разноразмерны, пространственно разупорядочены. По мере роста структурный полиморфизм микрогранул нарастает, они склеиваются и их агрегаты захватывают внешние поверхности фибрилл. Микрогранулы кристаллизуются (о чем свидетельствует появление граней) и адгезируют к поверхностям коллагеновых фибрилл, преимущественно в участках их бифуркации (рис. 8а).

Депозиты — это ограниченные частицы микрогранул, которые в процессе роста прободают сесамовидные глобулы и фиксируются на наружной поверхности глобулярных мембран. В образцах 1-й группы депозиты остроконечны, имеют ши-

рокое основание. В образцах 3-й группы супраглобулярные депозиты увеличиваются преимущественно по длинным осям и приобретают форму хорошо ограниченных параллелепипедов (рис. 8б). Если исходить из того, что сесамовидные глобулы являются предшественниками матричных везикул, содержащих химические прекурсоры гидроксиапатита, можно с уверенностью полагать, что массовое прорастание глобул депозитами свидетельствует об усилении процессов структурирования кальцийфосфатов по механизму гомогенной нуклеации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Остеоидные структуры перитенонов подразделяют на персистирующие и перманентные. Персистирующие остеоидные структуры — сесамовидные островки и их пластинчатые предикторы, игольчатые разрастания, рудименты остеонов. Фундаментальное свойство персистирующих остеоидных структур — высокая чувствительность к остеоиндуктивным стимулам и структурно-функциональная готовность к трансформациям, направленным на упрочнение внеклеточного матрикса перитенонов. Объем персистирующих остеоидных структур определяется интенсивностью механических нагрузок: при повышении нагрузок — может увеличиться, при снижении — уменьшиться. Перманентные остеоидные структуры — это микрогранулы и ограниченные депозиты кальцийфосфатов. Атрибутивное предназначение перманентных остеоидных структур — участие в структурно-метаболических процессах гетеро- и гомогенной нуклеации кальцийфосфатов, структурирующихся в гидроксиапатит.

При взаимодействии с фибриллярным коллагеном ГК усиливает агрегацию и компактизацию коллагеновых фибрилл, ускоряет образо-

вание пластинчатых предикторов сесамовидных островков, экранирует поверхность волокон и разделяет границы межфазовых интерфейсов. Глобулы ГК проникают в межфибрилярные пространства, расслаивают коллагеновые пучки и разрушают субфибриллы.

Гиалуроновая кислота способствует разрыхлению матрикса сесамовидных островков, что увеличивает их подвижность и создает предпосылки для миграции сесамовидных глобул в зоны повышенной механической нагрузки с последующей минерализацией внеклеточного матрикса, включая фибриллярный коллаген. ГК склеивает микрогранулы и депозиты кальцийфосфатов, структурирующиеся в гидроксиапатит, способствует их росту и фиксации в зонах повышенных рисков механических напряжений. Это принципиально важные адаптивные механизмы упрочнения сухожильной ткани, действующие на опережение. Выявленные свойства ГК в отношении остеоидных структур перитенонов расширяют возможности применения данного агента в биотехнологических разработках с использованием сухожильной ткани.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований “Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганоматериалы” по заданию 2.1.04.7 на 2021–2025 гг.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием людей авторы не проводили. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации о биоэтике и правах человека (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гайдаш А.А., Крутько В.К., Блинова М.И. и др. Структура и физико-химические свойства паравертебральных сухожилий // Цитология. 2022. Т. 64. № 3. С. 249–261.
- Almond A., Deangelis P.L., Blundell C.D. Hyaluronan: the local solution conformation determined by NMR and computer modeling is close to a contracted left-handed 4-fold helix // J. Mol. Biol. 2006. V. 358 (5). P. 1256–1269.
- Amizuka N., Hasegawa T., Oda K. et al. Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification // Front. Biosci. 2012. V. 4 (6). P. 2085–2100.
- Amizuka N., Hasegawa T., Yamamoto T., Oda K. Microscopic aspects on biomineralization in bone // Clin. Calcium. 2014. V. 24 (2). P. 203–214.
- Anandagoda N., Ezra D.G., Cheema U. et al. Hyaluronan hydration generates three-dimensional meso-scale structure in engineered collagen tissues // J. R. Soc. Interface. 2012. V. 9 (75). P. 2680–2687.
- Benjamin M., Toumi H., Ralphs J.R. et al. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites (‘entheses’) in relation to exercise and/or mechanical load // J. Anat. 2006. V. 208. P. 471–490.
- Caspersen M.B., Roubroeks J.P., Qun L. et al. Thermal degradation and stability of sodium hyaluronate in solid state // Carbohydr. Polym. 2014. V. 107. P. 25–30.
- Cowman M.K., Schmidt T.A., Raghavan P., Stecco A. Viscoelastic properties of hyaluronan in physiological conditions // F1000Res. 2015. V. 4. P. 622–634.
- Donati A., Magnani A., Bonechi C. et al. Solution structure of hyaluronic acid oligomers by experimental and theoretical NMR, and molecular dynamics simulation // Biopolymers. 2001. V. 59 (6). P. 434–445.
- Frayssinet A., Petta D., Eglin D. et al. Development of collagen/hyaluronic acid-tyramine (COLL/THA) composite hydrogels with tunable gelling kinetic and THA content for the treatment of nucleus pulposus // Orthopaedic Proc. 2018. V. 100-B (14). P. 96.
- Gatej I., Popa M., Rinaudo M. Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution // Biomacromolecules. 2015. V. 6 (1). P. 61–67.
- Gemballa S., Ebmeyer L., Hagen K. et al. Evolutionary transformations of myoseptal tendons in gnathostomes // Proc. Biol. Sci. 2003. V. 270. P. 1229–1235.
- Hardingham T., Heng B.C., Gribbon P. Analysis of the concentrated solution properties of hyaluronan by confocal-frap show no evidence of chain-chain association // Hyaluronan / Proc. Int. Meet. (September 2000, North East Wales Institute). Cambridge: Woodhead Publ. Ltd., 2002. V. 1. P. 123–136.
- Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E. et al. Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization // Jpn. Dent. Sci. Rev. 2017. V. 53. P. 34–45.
- Hoefling J.M., Cowman M.K., Matsuoka S., Balazs E.A. Temperature effect on the dynamic rheological characteristics of hyaluronan, hylan A and synvisc // Hyaluronan / Proc. Int. Meet. (September 2000, North East Wales Institute). Cambridge: Woodhead Publ. Ltd., 2002. V. 1. P. 103–108.
- Huang-Lee L.L., Wu J.H., Nimni M.E. Effects of hyaluronan on collagen fibrillar matrix contraction by fibroblasts // J. Biomed. Mater. Res. 1994. V. 28 (1). P. 123–132.
- Jansen K.A., Licup A.J., Sharma A. et al. The role of network architecture in collagen mechanics // Biophys. J. 2018. V. 114. P. 2665–2678.
- Kastelic J., Galeski A., Baer E. The multicomposite structure of tendon // Connect. Tiss. Res. 1978. V. 6. P. 11–23.

- Knepper P.A., Covici S., Fadel J.R. et al.* Surface-tension properties of hyaluronic acid // *J. Glaucoma*. 1995. V. 4 (3). P. 194–199.
- Knill C.J., Kennedy J.F., Latif Y., Ellwood D.* Effect of metal ions on the rheological flow profiles of hyaluronate solutions // *Hyaluronan / Proc. Int. Meet. (September 2000, North East Wales Institute)*. Cambridge: Woodhead Publ. Ltd., 2002. V. 1. P. 175–180.
- Kraft D., Bindsvlev D., Melsen B. et al.* Mechano-sensitivity of dental pulp stem cells is related to their osteogenic maturity European // *Eur. J. Oral Sci.* 2010. V. 118 (1). P. 29–38.
- Landis W.J., Silver F.H.* Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues: identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen // *Cells Tiss. Organs*. 2009. V. 189. P. 20–24.
- Lanir Y.* Structure-strength relations in mammalian tendon // *Biophys. J.* 1978. V. 24. P. 541–554.
- Mikelsaar R.H., Scott J.E.* Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11 (2). P. 65–71.
- Nonogaki T., Xu S., Kugimiya S.M. et al.* Two dimensional auto-organized nanostructure formation of hyaluronate on bovine serum albumin monolayer and its surface tension // *Langmuir*. 2000. V. 16 (9). P. 4272–4278.
- Nudelman F., Pieterse K., George A. et al.* The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors // *Nat. Mater.* 2010. V. 9. P. 1004–1009.
- Prusova A., Šmejkalová D., Chytil M. et al.* An alternative DSC approach to study hydration of hyaluronan // *Carbohydr. Polymers*. 2010. V. 82 (2). P. 498–503.
- Scott J.E., Cummings C., Brass A., Chen Y.* Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer // *Biochem. J.* 1991. V. 274. P. 699–705.
- Shimazu A., Jikko A., Iwamoto M. et al.* Effects of hyaluronic acid on the release of proteoglycan from the cell matrix in rabbit chondrocyte cultures in the presence and absence of cytokines // *Arthritis Rheum.* 1993. V. 36 (2). P. 247–253.
- Suh H., Lee J.E.* Behavior of fibroblasts on a porous hyaluronic acid incorporated collagen matrix // *Yonsei Med. J.* 2002. V. 43 (2). P. 193–202.
- Summers A.P., Koob T.J.* The evolution of tendon – morphology and material properties // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2002. V. 133. P. 1159–1170.
- Wu T., Yin F., Wang N. et al.* Involvement of mechanosensitive ion channels in the effects of mechanical stretch induces osteogenic differentiation in mouse bone marrow mesenchymal stem cells // *J. Cell. Physiol.* 2021. V. 236 (1). P. 284–293.

Structure of the Peritenons of the Paravertebral Tendons Treated by Hyaluronic Acid

**A. A. Gaidash^a, *, V. K. Krut'ko^a, A. I. Kulak^a, O. N. Musskaya^a,
K. V. Skrotskaya^b, Yu. P. Tokalchik^c, and V. A. Kulchitsky^c**

^a*Institute of General and Inorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

^b*Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, Belarus*

^c*Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

*e-mail: algaidashspb@gmail.com

The tendon sheaths (peritenones) of the paravertebral tendons of the tails of Wistar rats were studied using scanning electron microscopy. A phenomenological classification of the osteoid structures of the peritenons is given, with the identification of their persistent and permanent varieties. Sesamoid islets, needle-like and lamellar growths, rudiments of osteons are classified as persistent. Persistent osteoid structures are well prepared for transformations aimed at strengthening the intracellular matrix under mechanical stress. Permanent osteoid structures are microgranules and faceted deposits of calcium phosphates involved in structural and mechanical processes, hetero- and homogeneous nucleation. Hyaluronate loosens the matrix of sesamoid islets, which increases the mobility of sesamoid globules and creates the prerequisites for their directed migration to areas of increased mechanical stress and foci of possible mineralization of extracellular substance, including fibrillar collagen. Hyaluronate sticks together granules and deposits of structured calcium phosphates, contribute to their growth and fixation in areas of increased risk of mechanical stress. This is a fundamentally important adaptive mechanism for strengthening the tendon tissue, acting in advance.

Keywords: peritenon, fibrillar collagen, osteoid structures, hyaluronic acid, scanning electron microscopy