

Регенерация суставного хряща при экспериментальном остеоартрозе после инъекции комплексного полиакриламидно-гиалуронового геля

Аннотация

Оценена регенеративная способность суставного хряща после инъекции полиакриламидно-гиалуронового геля «Матрицин» в коленные суставы 9 кроликов с моделированным остеоартритом. Сделан вывод о снижении дистрофических и деструктивных изменений суставного хряща, ранее вызванных воздействием раствора папаина, и значительном увеличении регенеративной способности поврежденного гиалинового хряща.

Введение

Остеоартрит (деформирующий артроз – ОА) заболевание, имеющее большую социальную значимость из-за своего широкого распространения, а также прогрессирующего развития, которое без лечения приводит к снижению и утрате трудоспособности, в том числе у лиц молодого и среднего возраста [1].

Среди неоперативных методик лечения ОА в настоящее время, помимо прочих медикаментозных воздействий, широко применяется внутрисуставное введение полимера натриевой соли гиалуроновой кислоты (ГК). Обоснованием для его применения послужила теория вискоасплементации [1]–[6].

Ранее было сделано предположение, что восстановление вязкости синовиальной жидкости путем введения синтетических биологически инертных веществ позволяет сохранить ее механические и защитные свойства в случаях ОА [7]. Такими материалами, кроме ГК, могут являться вязкие полимеры на основе полиакриламида, в частности инертный и безопасный вископротез «Нолтрекс» [8]. В экспериментальных исследованиях была доказана идентичность вязкостных характеристик таких полимерных гелей и синовиальной жидкости здорового организма [9]. Была высказана идея, доказанная впоследствии экспериментально, что полиакриламидный гель создает в полости сустава комплексное соединение с естественной ГК, замедляя ее ферментативное разрушение [10]. Это привело к созданию устройства, которое предполагает объединение вязкостных свойств инертного полиакриламидного геля «Нолтрекс» и биологических эффектов ГК с целью усиления и пролонгации этих эффектов в суставе. Такой полиакриламидно-гиалуроновый гель «Матрицин» был разработан в 2013 году по идее двух первых авторов на основе вископротеза «Нолтрекс» [11].

Целью работы явилась оценка регенеративной способности суставного хряща после внутрисуставной инъекции «Матрицина» в суставы с экспериментальным ОА.

Методика исследования

Исследование проведено на 9 кроликах-самцах породы шиншилла с массой тела 3...4 кг. Все манипуляции производили в соответствии с требованиями Хельсинской декларации. После введения в наркоз (Золетил в дозе 15 мг/кг) каждому животному пунктировали левый и правый коленные суставы иглой 21G в углу, образованном наружным отделом суставной щели и собственной связкой надколенника. В полость обоих суставов каждому животному вводили 0,5 мл 4%-ного раствора фермента карипазима (папаина) производства ООО «Медфлорина» для моделирования дегенеративных изменений, соответствующих остеоартрозу человека.

Через неделю всем животным вводили в полость левого коленного сустава 0,5 мл геля «Матрицин» шприцем из упаковки. В правый, контрольный, сустав вводили только физраствор в таком же, как и гель, объеме. Выводили из опыта по три животных путем передозировки тиопентала натрия проводили через 3, 6 и 10 недель после первой инъекции. На протяжении опыта регистрировали общее состояние, поведение, массу тела, ректальную температуру.

Для гистологического исследования суставные хрящи вместе с костной тканью иссекали, декальцинировали и заливали в парафин. Срезы толщиной 4...5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Г-Э), пикрофуксином по Ван-Гизону и толуидиновым синим. Срезы изучали и фотографировали с помощью микроскопа «OLYMPUS BX51» (Япония) и видеокамеры «Спецтелетехника» (Россия).

Результаты исследования

Общий статус животных восстанавливался в течение суток после инъекции, потеря веса составляла в среднем $(124 \pm 16,2)$ г. Вес возвращался к исходному на 3...4-е сутки после второй инъекции, двигательная активность не страдала.

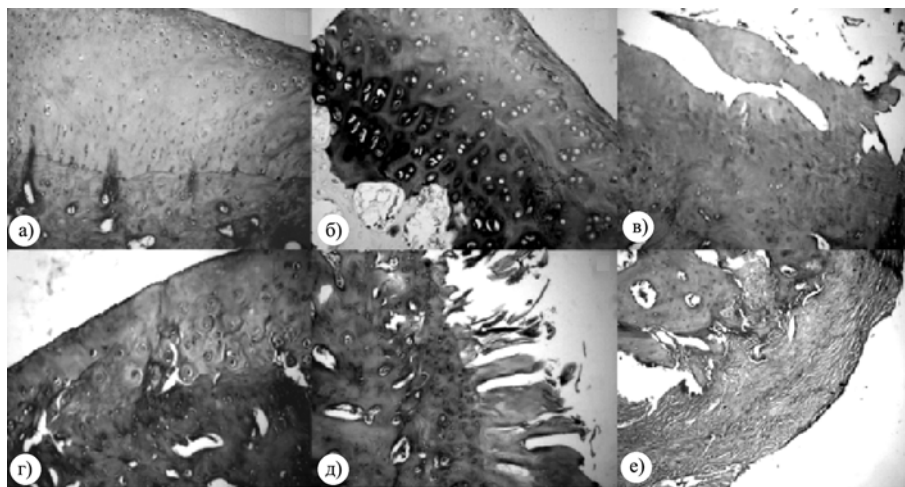


Рис. 1. Гематоксилин и эозин, x100 (а); толуидиновый синий, x400 (б); гематоксилин и эозин, x200 (в); пикрофуксин по Ван-Гизону, x200 (г); гематоксилин и эозин, x200 (д); гематоксилин и эозин, x 100 (е)

При морфологическом изучении уже через три недели в контрольных суставах (введение папаина без последующего введения матриксина) были обнаружены умеренно выраженные изменения суставного хряща. Они заключались в дистрофических изменениях хондроцитов поверхностного и промежуточного слоев хряща, а именно в кариопикнозе и кариолизе, вакуолизации цитоплазмы. Блестящая пластинка была сохранена (рис. 1а). Во внеклеточном матриксе хрящевой ткани при окраске толуидиновым синим обнаруживалось много пустых лакун, снижение и неравномерность распределения метахромазии, что говорит о частичном вымывании кислых гликозаминогликанов (ГАГ), входящих в состав протеогликанов (агреганов) матрикса хряща (рис. 1б).

Через шесть недель в контрольных суставах процессы дегенерации хряща нарастали. У большинства животных обнаруживались очаги деструкции поверхности хряща, отсутствие блестящей пластинки, образование ворсинчатой поверхности, небольшие щели в матриксе, участки некроза (рис. 1в). Дистрофические изменения хондроцитов нарастали и распространялись на более глубокие слои. Все эти изменения клеток и матрикса являлись мозаичными, т. е. очаги изменений большей или меньшей интенсивности и участки малоизмененной ткани неравномерно выявлялись на площади суставного хряща. Структура субхондральной кости не была изменена, но костный мозг в части случаев был активизирован: в нем было повышено содержание нейтрофилов, лимфоцитов, эритроцитов, а также микроциркуляторных сосудов. В синовиальной оболочке отмечались умеренные проявления синовита. Признаки регенерации хряща на этом сроке в суставе не были обнаружены (рис. 1г).

Через десять недель после начала эксперимента у одного из трех животных дегенерация суставного хряща по гистологическим данным мало отличалась от шестинедельного срока. У двух других животных усиливался некроз хрящевой ткани, появилась грубая ворсинчатость наружного и среднего слоев хряща, истончение хрящевой пластинки (рис. 1д). К десятой неделе появились участки частичной деструкции трабекул субхондральной кости, фиброза костномозговых пространств, замещение разрушенного хряща фиброзной тканью (рис. 1е).

Кроме вышеописанных изменений в хрящевой ткани контрольных суставов через три и шесть недель были выявлены слабо выраженные признаки регенеративных процессов (они обнаруживаются и при остеоартрозе у человека). Такие признаки проявляются в виде очагов пролиферации хондроцитов и появления крупных изогенных групп (клонов) хондроцитов на фоне дистрофических и некротических изменений (рис. 2а). Отдельные дефекты гиалинового хряща замещаются фиброзной соединительной тканью (рис. 1е) или фиброзным хрящом, что является признаком регенерации путем субституции. Фиброзный хрящ отличается от гиалинового хряща волокнистым матриксом и вытянутыми хондроцитами с лакунами и без них (рис. 2б). Такой хрящ нехарактерен для суставов. Поверхность хрящевой пластинки с разрушенной блестящей пластинкой в этих случаях остается неровной или покрывается тонким слоем фиброзной соединительной ткани. Все эти реге-

неративные проявления имеются только в трети контрольных суставов, занимая небольшое место на площади хрящевой пластинки. Через десять недель, по сравнению с шестью неделями, регенеративные проявления не усиливались.

В опытной группе, в которой животным последовательно вводили в правый сустав папаин и матриксин, выраженность регенерации хрящевой ткани зависела от срока опыта. Через три недели были слабее выражены дистрофические и некротические изменения хондроцитов и деструктивные изменения матрикса: реже встречались изменения ядер и цитоплазмы клеток, пустые лакуны, деструкция и некроз блестящей пластинки и матрикса, всегда отсутствовала ворсинчатость поверхности, было выше содержание протеогликанов в матриксе хряща. На этом сроке заметных признаков регенерации хрящевой ткани еще не выявлялось.

Через шесть и десять недель признаки дегенерации еще больше ослабевали, однако оставались участки дистрофии хондроцитов, частичной деструкции блестящей пластинки (рис. 3а). При этом регенерация хряща значительно усиливалась как по площади, так и по степени дифференцировки хрящевой ткани. Только в двух суставах из шести регенерация происходила с замещением поверхностного слоя хряща фиброзной соединительной тканью, однако с пролиферацией хондроцитов гиалинового хряща в глубоких слоях (рис. 3б) или ростом фиброзного хряща с метахромазией ткани взамен всех слоев гиалинового хряща (рис. 3в). В остальных опытных суставах отмечались крупные очаги регенерации гиалинового хряща с характерными для него округлыми хондроцитами с окружающими их лакунами и гомогенным матриксом (рис. 3г, д). Такой хрящ отличался от интактного гиалинового хряща только увеличенным количеством и плотным расположением хондроцитов. Эти очаги содержали большое количество ГАГ. Во всех опытных суставах встречались участки многочисленных и очень крупных изогенных групп хондроцитов (рис. 3е).

Обсуждение

Экспериментальная модель с введением в сустав раствора фермента папаина (препарат «Карипазин») характеризуется постепенным развитием в контрольных (без лечения) суставах дегенерации суставного хряща, которая проявляется дистрофическими и некротическими изменениями хондроцитов, деструкцией внеклеточного матрикса, дезорганизацией суставной поверхности с формированием ее ворсинчатости. Такие изменения хряща в основном соответствуют остеоартрозу человека. Регенеративные изменения выражены слабо и проявляются в очагах замещения специфического гиалинового хряща фиброзной соединительной тканью и фиброзным хрящом, которые не соответствуют механическим и метаболическим функциям суставного хряща, что ведет к вторичным изменениям.

Особенно важны результаты изучения опытных суставов, в которые через неделю после фермента был введен гель «Матриксин». Замещая синовиальную жидкость, гель оказывает протекторное воздействие, останавливая дальнейшее развитие дегенерации хряща. В результате резко усиливаются регенеративные процессы. Особое внимание следует обратить на то,

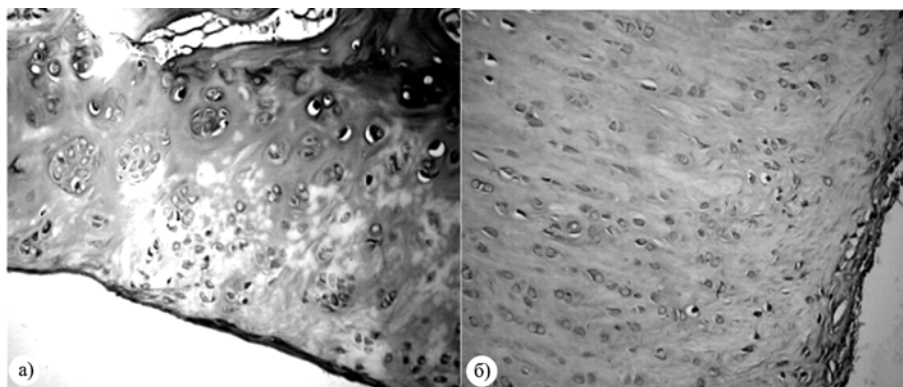


Рис. 2. Гематоксилин и эозин, x200 (а); гематоксилин и эозин, x200 (б)

что помимо заместительной регенерации повреждений фиброзной соединительной тканью или фиброзным хрящом реализуется полная регенерация, так как происходит рост гиалинового хряща, свойственного суставам. Только такой хрящ может обеспечивать механическую функцию сустава и не вести к дальнейшему «изнашиванию» и разрушению хряща, как при заместительной регенерации.

Такая активная и адекватная регенерация связана с воздействием геля «Матрицин», который улучшает механические условия движения сустава и этим оптимизирует диффузию питательных веществ и метаболизм хряща. Хондропротекторное действие во многом связано с тем, что комплексный гель имеет вязкость, близкую к синовиальной жидкости, и медленно эвакуируется из полости сустава. Таким образом, препарат «Матрицин» можно считать перспективным для стимуляции регенерации суставного хряща и предотвращения его дальнейшего разрушения

Заключение

Изучение развития регенеративных и дегенеративных процессов в суставах кроликов с экспериментальным остеоартритом при внутрисуставной инъекции комплексного полиакриламидно-гиалуронового геля «Матрицин» показывает, что гель предотвращает развитие дегенеративных изменений суставного хряща, а также способствует сохранению и удлинению сроков его регенеративной способности. Естественные регенеративные процессы в суставах с экспериментальным артрозом при отсутствии введения препарата «Матрицин» выражены незначительно, при этом преобладают дегенеративно-деструктивные изменения.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение 14.578.21.0221, RFMEFI57816X0221).

Список литературы:

1. Клинические рекомендации. Ревматология / Ред. Е.Л. Насонов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. С. 99-111.
2. Towheed T.E., Maxwell L., Judd M.G., Catton M., Hochberg M.C., Wells G. Acetaminophen for osteoarthritis / Cochrane Database Syst Rev. 2003. CD004257.
3. Hochberg M.C., Clegg D.O. Potential effects of chondroitin sulfate on joint swelling: A GAIT report // Osteoarthritis Cartilage. 2008. Vol. 16. Suppl. 3. S. 22-24.
4. Gerasimenko A. Yu., Zhurbina N.N., Kurilova U.E., Ichkitidze L.P., Selishchev S.V., Suetina I.A., Mezentsева M.A., Russu L.I., Zar V.V., Podgaetskii V.M. Knee Joint Ligament Implants with Composite Nanocoatings // Biomedical Engineering. 2016. Vol. 50 (3). PP. 206-209.
5. Brandt K.D., Mazzuca S.A., Katz B.P. Effects of doxycycline on progression of osteoarthritis: Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial // Arthritis Rheum. 2005. Vol. 52. PP. 2015-2025.

6. Balazs E.A., Denlinger J.L. Viscosupplementation: A new concept in the treatment of osteoarthritis // J. Rheumatol. 1993. Vol. 39. PP. 3-9.
7. Шехтер А.Б., Зар В.В., Волошин В.П., Лопатин В.В. Тканевая и клеточная реакция синовиальной среды на внутрисуставное введение полимерного вископротеза «Нолтрекс» в условиях эксперимента // Альманах клинической медицины. 2013. № 28. С. 20-24.
8. Зар В.В., Волошин В.П., Мартынов М.Д. Функциональная оценка результатов внутрисуставного введения полиакриламидного геля «Нолтрекс» при лечении пациентов с гонартрозом // Альманах клинической медицины. 2012. № 27. С. 18-24.
9. Лопатин В.В., Белоненко В.Н., Зар В.В., Аскадский А.А. Сравнительное исследование механического поведения суставной жидкости человека и полиакриламидных гидрогелей в зависимости от давления // Пласт. массы. 2004. № 7. С. 24-29.
10. Лопатин В.В. и др. Набухание полиакриламидных гелей медицинского назначения // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2005. № 7. С. 1187-1195.
11. Власов В.И., Кузнецова Е.А., Лопатин В.И., Дарьевич Е.Н. Материал медицинского назначения «Матрексин» на основе полиакриламидного геля и способ его получения (варианты) / Патент РФ 2545806: № 2013157847/15; 10.04.15. Бюл. № 10. С. 1-17.

Вадим Владимирович Зар,
канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник,
отделение травматологии и ортопедии,
ГБУЗ Московской области «Московский
областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
Анатолий Борисович Шехтер,
д-р мед. наук, профессор, руководитель,
лаборатория экспериментальной патологии,
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Институт регенеративной медицины,
г. Москва,
Евгений Николаевич Суханов,
врач травматолог-ортопед,
ГБУЗ Московской области «Московский
областной госпиталь для ветеранов войн»,
дер. Жилино, Московская область,
Михаил Вадимович Зар,
студент,
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
г. Москва,
e-mail: vzar@list.ru

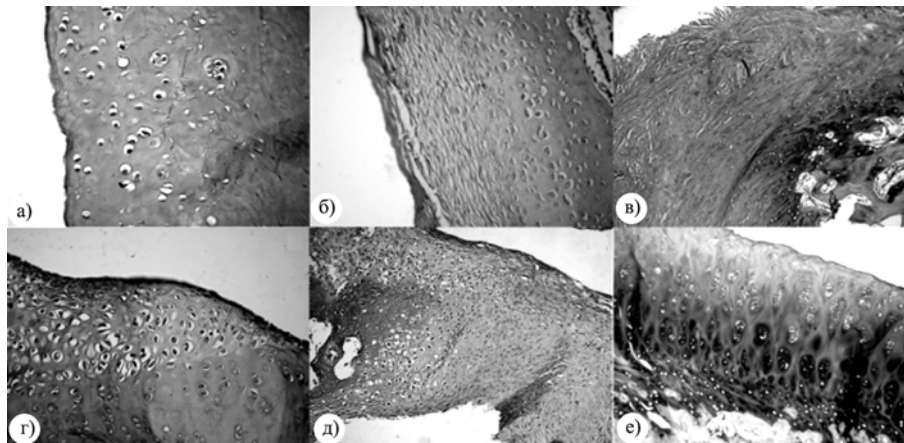


Рис. 3. Окраска, увеличение: а) толуидиновый синий, х100; б) гематоксилин и эозин, х400; в) толуидиновый синий, х100; г) гематоксилин и эозин, х400; д) гематоксилин и эозин, х100; е) толуидиновый синий, х 200 (объяснение – в тексте)