

МОРФОГЕНЕЗ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА КОЛЕННОГО СУСТАВА НА ФОНЕ ВНУТРИСУСТАВНОГО ВВЕДЕНИЯ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ ПЛАЗМЫ И/ИЛИ ПРЕПАРАТА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ОСТЕОАРТРОЗОМ

С.А. Демкин¹, Д.А. Маланин^{1,2}, Л.Н. Рогова¹, Г.Л. Снигур¹, Н.В. Григорьева¹, К.В. Байдова²

¹ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России
Пл. Павших Борцов, д. 1, г. Волгоград, 400131, Россия

² ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»
Ул. Рокоссовского, д.1Г, г. Волгоград, 400081, Россия

Реферат

Актуальность. Влияние обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы (ОТП) и препаратов гиалуроновой кислоты (ГК) на течение воспалительного процесса и пролиферации в тканях суставов на сегодняшний день изучено недостаточно.

Целью исследования являлась оценка морфологических изменений в структуре гиалинового хряща коленного сустава при экспериментальном остеоартрозе после внутрисуставного введения OTP и/или ГК.

Материалом для экспериментального исследования послужили 50 половозрелых крыс линии Wistar массой 250±2,2 г, распределенных на пять групп по 10 животных в каждой (2 опытные и 3 основные). На крысах второй опытной и трех основных групп моделировали экспериментальный гонартроз. Крысы первой основной группы получали внутрисуставное введение OTP, второй основной группы – ГК, третьей основной – OTP и ГК. Животным первой опытной группы (без артроза) в коленный сустав вводили 0,9% раствор NaCl.

Результаты. В первой опытной группе животных морфологических признаков дегенеративных и дистрофических изменений суставного хряща не наблюдалось. После моделирования остеоартроза произошли истончение суставного хряща до 121±20,4 мкм (p<0,05) и снижение объемной доли хондроцитов до 1,2±0,6% (p<0,05), отмечалась неравномерность окрашивания коллагеновых волокон с выраженным нарушением тинкториальных свойств матрикса хрящевой ткани. После введения OTP произошло увеличение толщины суставного хряща до 275±18,9 мкм (p<0,05) и объемной доли хондроцитов до 18,4±2,0% (p<0,05). Контур поверхности хряща становился более ровным с формированием бесклеточной зоны. Коллагеновые волокна приобретали равномерное распределение, сохранялись тинкториальные свойства хрящевого матрикса во всех зонах.

На фоне введения ГК было установлено увеличение толщины хрящевой пластинки до 264±21,3 мкм (p<0,05) и объемной доли хондроцитов до 11,6±1,2% (p<0,05). Поверхность хряща имела неровные контуры за счет многочисленных участков разволокнений и узур. Сохранялась неравномерность тинкториальных свойств хрящевого матрикса, толщины и направленности коллагеновых волокон.

После совместного последовательного применения OTP и ГК наблюдали увеличение толщины суставного хряща до 268±15,3 мкм (p<0,05) и объемной доли хондроцитов до 12,7±0,9% (p<0,05). На поверхности хряща прослеживали единичные участки разволокнений. Сохранялись тинкториальные свойства хрящевого матрикса, в базальной зоне определялась очаговая неравномерность окрашивания коллагеновых волокон.

Выводы. При моделировании остеоартроза в коленном суставе у половозрелых крыс линии Wistar возникают грубые структурные изменения суставного хряща, вплоть до его полного разрушения, сопровождающегося сосудистой пролиферацией и гранулематозным воспалением. Введение OTP, ГК, а также OTP в сочетании с ГК на фоне развившегося остеоартроза сопровождается снижением выраженности дегенеративно-дистрофических изменений, улучшением показателей тинкториальных свойств матрикса суставного хряща. Применение OTP отдельно или последовательное введение OTP и ГК оказывают более выраженное положительное влияние на репаративный процесс в хрящевой ткани по сравнению с внутрисуставным введением ГК.

Ключевые слова: остеоартроз, суставной хрящ, обогащенная тромбоцитами плазма, гиалуроновая кислота.

DOI: 10.21823/2311-2905-2016-22-4-76-87.

Демкин С.А., Маланин Д.А., Рогова Л.Н., Снигур Г.Л., Григорьева Н.В., Байдова К.В. Морфогенез гиалинового хряща коленного сустава на фоне внутрисуставного введения обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы и/или препарата гиалуроновой кислоты у крыс с экспериментальным остеоартрозом. *Травматология и ортопедия России*. 2016;22(4):76-87. DOI: 10.21823/2311-2905-2016-22-4-76-87.

Cite as: Demkin S.A., Malanin D.A., Rogova L.N., Snigur G.L., Grigorieva N.V., Baydova K.V. [Morphogenesis of Knee Hyaline Cartilage during Intraarticular Injection of Platelet-Rich Autologous Plasma and/or Hyaluronic Acid Preparation in Rats with Experimental Osteoarthritis]. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2016;22(4):76-87 (in Russ.) DOI: 10.21823/2311-2905-2016-22-4-76-87.

Демкин Сергей Анатольевич. Пл. Павших Борцов, д. 1, г. Волгоград, 400131, Россия / *Sergey A Demkin*. 1, pl. Pavshikh Bortsov, Volgograd, 40013, Russia; e-mail: smdem@mail.ru

Рукопись поступила/Received: 22.03.2016. Принята в печать/Accepted for publication: 17.10.2016.

Morphogenesis of Knee Hyaline Cartilage during Intraarticular Injection of Platelet-Rich Autologous Plasma and/or Hyaluronic Acid Preparation in Rats with Experimental Osteoarthritis

S.A. Demkin¹, D.A. Malanin^{1,2}, L.N. Rogova¹, G.L. Snigur¹, N.V. Grigorieva¹, K.V. Baydova²

¹ Volgograd State Medical University
Pl. Pavshikh Bortsov, 1, Volgograd, 400131, Russia

² Volgograd Medical Scientific Centre
1G, ul. Rokossovskogo, Volgograd, 400081, Russia

Abstract

According to current concepts, the influence of autologous platelet-rich plasma (PRP) and high molecular hyaluronates (HA) on the repair of hyaline cartilage during its inflammatory and degenerative changes has been insufficiently studied yet.

The objective of the work was to evaluate the morphological changes in the structure of hyaline cartilage in experimental osteoarthritis after intra-articular injection of PRP and/or HA.

Material and methods. The authors used 50 adult rats of Wistar line, weighing $250 \pm 2,2$ g., distributed into five groups of 10 animals (two control and three experimental groups).

An experimental gonarthrosis was simulated on four groups of animals. Animals of the first experimental group received intra-articular injection of PRP, the second group – HA, the third – both PRP and HA.

Results. No morphological signs of degenerative and inflammatory changes in the first control group were identified. Following osteoarthritis simulation the articular cartilage thinned to $121 \pm 20,4$ microns ($p < 0,05$) and the volume fraction of chondrocyte decreased to $1,2 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$). The authors observed an uneven coloration of collagen fibers with severe tinctorial properties disorder of the articular cartilage matrix.

After the PRP introduction the authors observed thickening of the articular cartilage up to $275 \pm 18,9$ micron ($p < 0,05$) and the volume fraction of chondrocytes up to $18,4 \pm 2,0\%$ ($p < 0,05$). The contour of the cartilage surface became smoother with the formation of a cell-free zone. Collagen fibers demonstrated a uniform distribution, tinctorial properties of cartilage matrix in all areas were preserved, no signs of inflammation were noted.

After HA introduction the authors observed thickening of the cartilage plate up to $264 \pm 21,3$ microns ($p < 0,05$) and the volume fraction of chondrocytes up to $11,6 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$). The surface of the cartilage featured uneven contours due to multiple areas of pulping. Uneven tinctorial properties of cartilage matrix, thickness and orientation of collagen fibres were retained. No signs of inflammation were observed.

After the combined consecutive application of PRP and HA cartilage thickness increased up to $268 \pm 15,3$ microns ($p < 0,05$) and the volume fraction of chondrocytes increased up to $12,7 \pm 0,9\%$ ($p < 0,05$). Individual portions of pulping on the cartilage surface were observed. Tinctorial properties of the cartilage matrix were preserved; the focal uneven staining of collagen fibers in the basal zone was observed. No signs of inflammation were noted.

Conclusion. During osteoarthritis simulation in knee joints of experimental Wistar line rats the authors observed severe structural changes in articular hyaline cartilage including complete destruction accompanied by vascular proliferation and granulomatous inflammation. Intraarticular injections of PRP, HA as well as PRP in combination with HA during the simulation of osteoarthritis were accompanied by a decrease in the severity of degenerative and dystrophic processes and improval of tinctorial properties of articular cartilage matrix. Sole application of PRP or consecutive application of PRP followed by HA were observed as having the more significant reparative effect on articular cartilage as compared to HA.

Keywords: osteoarthritis, high molecular hyaluronate, autologous platelet-rich plasma, articular cartilage, inflammation.

DOI: 10.21823/2311-2905-2016-22-4-76-87.

Competing interests: the authors declare that they have no competing interests.

Funding: the authors have no support or funding to report.

Введение

Деформирующий остеоартроз – гетерогенная группа заболеваний суставов различной этиологии, но с идентичными биологическими, морфологическими и клиническими признаками и исходом, связанным с потерей гиалинового хряща и сопутствующим поражением других анатомических структур и тканей сустава (субхондральная кость, синовиальная оболочка, связки, капсула сустава, околосуставные сухожилия и мышцы) [16].

Гиалиновый хрящ содержит относительно небольшое количество клеток, окруженных большим количеством межклеточного матрикса. Хондроциты участвуют в регуляции синтеза и деградации компонентов хрящевого матрикса, причем в норме эти процессы находятся в равновесии [8]. Под воздействием множества факторов баланс процессов деградации и репарации нарушается, что впоследствии обуславливает развитие остеоартроза, проявляющегося дегенеративно-дистрофическими изменениями

в структуре гиалинового хряща и субхондральной кости, воспалением в окружающих мягких тканях, нарушением физико-химических свойств синовиальной жидкости [8, 11, 14].

Среди немногих успешно реализуемых современных подходов к лечению остеоартроза следует отметить внутрисуставное введение препаратов гиалуроновой кислоты (ГК), способствующих уменьшению дистрофических изменений в хрящевой ткани, проявлений воспалительного процесса в суставе и нормализации его синовиальной среды [11, 15]. Экзогенная гиалуроновая кислота способствует образованию собственной гиалуроновой кислоты, воздействует на рецепторы CD44 и стимулирует синтез протеогликанов хондроцитами. Экспериментально было показано, что блокирование в нормальном хряще рецепторов CD44 приводит к невосполнимой потере протеогликанов суставным хрящом [13, 14]. Предполагается, что среднемолекулярные формы гиалуронатов в большей степени стимулируют продукцию собственной гиалуроновой кислоты [19]. Однако в ряде последних исследований существенных различий в хондропротективном действии ГК в зависимости от ее молекулярной массы выявлено не было [11].

В настоящее время установлено, что экзогенная гиалуроновая кислота уменьшает проницаемость кровеносных сосудов мягких тканей сустава, снижает экссудацию, препятствует миграции лейкоцитов из синовиальной оболочки, оказывает подавляющее действие на синтез некоторых медиаторов воспаления и ферментов: интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), фосфолипазы-2, ряда металлопротеиназ (ММР) и др., тем самым блокируя механизмы развития воспаления в суставе [5, 11, 15, 18].

Возможность управления биологическим потенциалом собственного организма и использования его в лечебном процессе представляется весьма перспективной и уже нашла применение в ряде работ, посвященных обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП) [3, 4, 8]. Содержание в ОТП большого количества факторов роста, которые могут одновременно или постепенно выделяться в окружающие ткани, предполагает возможность воздействия на течение воспалительного процесса в суставе и ремоделирование гиалинового хряща [3, 8]. Так, высокий уровень бета-тромбоглобулина, тромбоцитарного фактора-4 в ОТП стимулирует воспалительный ответ, активируя миграцию нейтрофилов [20]. В то же время ОТП может разрешать воспаление, восстанавливая эндотелиальный барьер путем высвобождения гепатоцитарного фактора роста (HCV), фактора роста эндотелия со-

судов (VEGF) и трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) [18, 19]. В экспериментальной модели было убедительно показано, что HGF снижает уровень провоспалительного IL-6 и повышает содержание противовоспалительного IL-10 [6, 14]. Высвобождение биологически активных веществ из гранул тромбоцитов, с одной стороны, подавляет активность ММР, а с другой стимулирует пролиферацию, что обуславливает хондропротективное действие ОТП [19]. Из литературных источников известно также, что ОТП *in vitro* стимулирует выработку хондроцитами коллагена II типа [7].

Результаты выполненных экспериментальных исследований, оценивающих влияние обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы на течение остеоартрита коленного сустава, остаются дискуссионными и пока не позволяют составить целостное представление о патоморфозе структурных изменений хрящевой ткани после применения ОТП на фоне остеоартроза [1, 4, 7, 9, 12, 20].

Целью исследования являлась оценка морфологических изменений в структуре гиалинового хряща коленного сустава при экспериментальном остеоартрозе после внутрисуставного введения ОТП и/или ГК.

Материал и методы

Материалом для экспериментального исследования послужили 50 половозрелых крыс линии Wistar массой $250 \pm 2,2$ г.

При работе с лабораторными животными соблюдали требования, изложенные в правилах лабораторной практики (GLP, ГОСТ 31884-2012), «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), приказе МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики», Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977.

Лабораторные животные были распределены на 5 групп по 10 животных в каждой (2 опытные и 3 основные) (табл. 1). Все манипуляции были выполнены под общим обезболиванием с использованием препарата «Рометар» по методике, описанной фирмой-производителем.

Во второй опытной и трех основных группах моделировали остеоартроз путем внутрисуставного введения 0,2 мл 10% суспензии стерильного талька [2].

Через 30 дней после моделирования остеоартроза животным первой основной группы проводили двухкратное внутрисуставное введение 0,2 мл ОТП с периодичностью 1 раз

в 21 день [8]. Животным второй основной группы трехкратно внутрисуставно вводили 0,2 мл ГК (1,6% гиалуроната натрия со средней молекулярной массой 3600 кДа) с периодичностью 1 раз в 7 дней [19]. Животным третьей основной группы последовательно вводили ОТП и ГК: вначале внутрисуставно 0,2 мл ОТП, а через 7, 14 дней – 0,2 мл ГК (патент РФ № 2572447 от 09.12.2015).

Животным первой опытной группы проводили однократное внутрисуставное введение 0,2 мл 0,9% раствора NaCl.

Все внутрисуставные инъекции осуществляли из стандартного передневнутреннего доступа в левый коленный сустав. Приготовление ОТП начинали с забора 1,2 мл цельной крови из бедренной вены в шприц с предварительно набранными 0,4 мл 5% раствора цитрата натрия, выполнив к ней стандартный доступ (рис. 1а). Полученную кровь сливали в герметично закрывающуюся стерильную стеклянную полупрозрачную емкость, помещали ее в центрифугу RotoFix 32 (Hettich, Германия) с соответствующим противовесом.

Таблица 1/ Table 1

**Характеристика экспериментальных групп животных
Experimental animal groups properties**

Группа/Group	Вводимый препарат/Intraarticular injection			
	0,9% раствор NaCl/0,9% solution NaCl	10% суспензия стерильного талька/10% sterile talc suspension	ГК/HA	ОТП/PRP
Опытная группа № 1 Control group No. 1	0,2 мл однократно/ 0,2 ml single injection	–	–	–
Опытная группа № 2 Control group No. 2	–	0,2 мл однократно 0,2 ml single injection	–	–
Основная группа № 1 Experimental group No. 1	–	0,2 мл однократно 0,2 ml single injection	–	0,2 мл 1 раз в неделю, трехкратно, спустя 30 дней после введения талька/0,2 ml, once per week, three times, 30 days after talc suspension injection
Основная группа № 2 Experimental group No. 2	–	0,2 мл однократно 0,2 ml single injection	0,2 мл 1 раз в 21 день, двукратно, спустя 30 дней после введения талька 0,2 ml once in 21 days, two times, 30 days after talc suspension injection	–
Основная группа № 3 Experimental group No. 3	–	0,2 мл однократно 0,2 ml single injection	Спустя 30 дней после введения талька – 0,2 мл ОТП, через 7, 14 дней – 0,2 мл ГК/30 days after talc suspension injection – 0,2 ml PRP, after 7 days, 14 days – 0,2 ml HA	



Рис. 1. Приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы/

Fig. 1. PRP preparation:

а – забор крови из бедренной вены крысы/ blood sampling from femoral vein of animal;

б – разделение цельной крови на фракции после первого центрифугирования/ whole blood separation after first centrifugation;

в – разделение плазмы крови после второго центрифугирования (на дне выпавшие в осадок тромбоциты)/plasma separation after second centrifugation;

г – готовая к применению ОТП в количестве 0,2 мл/ready PRP, volume 0.2 ml

Первое центрифугирование проводили в течение 5 минут со скоростью 1500 об/мин, затем забирали 0,8 мл надосадочной жидкости и помещали в другую аналогичную стерильную емкость (рис. 1б).

После второго центрифугирования со скоростью 1000 об/мин в течение 5 минут удаляли 0,6 мл надосадочной жидкости и растворяли выпавшие в осадок форменные элементы в оставшейся плазме (рис. 1в). ОТП извлекали с помощью шприца и добавляли к ней 0,1 мл 10% раствора хлорида кальция с целью активации тромбоцитов. Содержание тромбоцитов составило $800 \pm 40 \times 10^9/\text{л}$ (рис. 1г).

Через месяц после проведения последней внутрисуставной инъекции препаратов животных выводили из эксперимента путем введения летальной дозы Рометара, вычленили левую бедренную кость для последующего морфологического исследования.

Хрящевую ткань с субхондральной костью фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) в течение 24 часов. Проводили бескислотную декальцинацию в растворе этилендиаминтетраацетата натрия стандартной концентрации. После полного удаления из костной ткани минерального

компонента выполняли стандартную гистологическую проводку по спиртам возрастающих концентраций и препараты заключали в парафин, после чего изготовляли срезы толщиной 6–8 микрон, окрашивали гематоксилин-эозином и по Маллори.

Фотопротоколирование микроскопических изменений производили с использованием комплекса, включающего микроскоп Axio Scope (Carl Zeiss, Германия) и цифровую фотокамеру Power Shot (Canon, Япония). Морфометрический анализ осуществляли с помощью компьютерной программы «Видео ТестМорфо-4» (Microsoft, США). Для оценки морфологических показателей определяли толщину суставного хряща (L, мкм) и объемную долю хондроцитов по отношению к матриксу (ОД, %).

Результаты экспериментов обрабатывали методами базисного статистического анализа с использованием программ «Видео ТестМорфо-4» (Microsoft, США) и Statistica 6.0 (Stat Soft Inc., США). Анализ параметров при нормальном распределении значений проводили с помощью критерия Стьюдента, анализ непараметрических количественных признаков – с помощью критерия Манна – Уитни. Для срав-

нения качественных признаков использовали критерии χ^2 и Фишера. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки не превышала $p < 0,05$.

Результаты

Проведенное исследование показало, что в опытной группе животных № 1 (без артроза) суставной гиалиновый хрящ имел толщину $330 \pm 17,3$ мкм и характерное гистологическое строение. Поверхностные хондроциты характеризовались уплощенной формой и располагались поодиночке в хрящевом матриксе. Хондроциты переходной и базальной зон имели округлую форму и располагались в составе изогенных групп рядами, ориентированными перпендикулярно к суставной поверхности. Объемная доля хондроцитов составляла $13,7 \pm 1,1\%$ (табл. 2). Морфологические признаки дегенеративно-дистрофических процессов не визуализировались (рис. 2а). Гистохимическая реакция по Маллори выявляла равномерное расположение коллагеновых волокон, отсутствие очагов оссификации (рис. 3а).

После моделирования остеоартроза происходило уменьшение толщины суставного хряща до $121 \pm 20,4$ мкм ($p < 0,05$) и снижение объемной доли хондроцитов до $1,2 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$). Во всех зонах были отмечены множественные «пустые лакуны» и хондроциты с кариопикнозом, обширные участки деструкции суставной поверх-

ности с разрастанием соединительной ткани, в толще которой определялось гранулематозное воспаление с выраженной гистиомакрофагальной инфильтрацией и гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел, полнокровием кровеносных сосудов и неравномерным отеком межклеточного вещества (рис. 2б).

При гистохимическом исследовании в суставном хряще отмечали неравномерность окрашивания коллагеновых волокон с выраженным нарушением тинкториальных свойств матрикса хрящевой ткани. В участках склероза волокна коллагена были окрашены наиболее интенсивно (рис. 3б).

После введения ОТП на фоне экспериментального остеоартроза морфометрически было установлено увеличение толщины суставного хряща до $275 \pm 18,9$ мкм ($p < 0,05$) и объемной доли хондроцитов до $18,4 \pm 2,0\%$ ($p < 0,05$) (табл. 2). Как и после введения ГК, различали три отграниченные друг от друга зоны с типичными для остеоартроза дегенеративными изменениями, но выраженными в меньшей степени. В поверхностной зоне контуры суставной поверхности выглядели ровными. Несмотря на наличие «пустых» лакун и хондроцитов с признаками распада и образованием апоптотных телец, определяли увеличение количества как отдельно расположенных хондроцитов, так и их изогенных групп во всех зонах (рис. 2в). В промежуточной зоне происходила очаговая

Таблица 2/ Table 2

Морфометрические параметры суставного гиалинового хряща у животных экспериментальных групп Morphometric properties of articular hyaline cartilage in animals of experimental groups

Экспериментальная группа Experimental groups	Параметры суставного гиалинового хряща Properties of articular hyaline cartilage	
	Толщина, мкм/Thickness, micron	Объемная доля хондроцитов, % Volume fraction of chondrocytes, %
Опытная группа №1 Control group No. 1	$330 \pm 17,3$	$13,7 \pm 1,1$
Опытная группа № 2 Control group No. 2	$121 \pm 20,4^*$	$1,2 \pm 0,6^*$
Основная группа № 1 Experimental group No. 1	$275 \pm 18,9^{**}$	$18,4 \pm 2,0^{**}$
Основная группа № 2 Experimental group No. 2	$264 \pm 21,3^{**}$	$11,6 \pm 1,2^{**}$
Основная группа № 3 Experimental group No. 3	$268 \pm 15,3^{**}$	$12,7 \pm 0,9^{**}$

* – достоверные изменения по отношению к опытной группе № 1 ($p < 0,05$)/reliable variations against control group № 1 ($p < 0,05$); ** – достоверные изменения по отношению к опытной группе № 2 ($p < 0,05$)/reliable variations against control group № 2 ($p < 0,05$).

оссификация межклеточного вещества, что было особенно заметно при окраске по Маллори. Равномерность распределения коллагеновых волокон и тинкториальные свойства хрящевого матрикса сохранялись во всех зонах (рис. 3в).

После введения ГК на фоне экспериментального остеоартроза констатировали увеличение толщины хрящевой пластинки до $264 \pm 21,3$ мкм ($p < 0,05$) и объемной доли хондроцитов до $11,6 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$) (табл. 2).

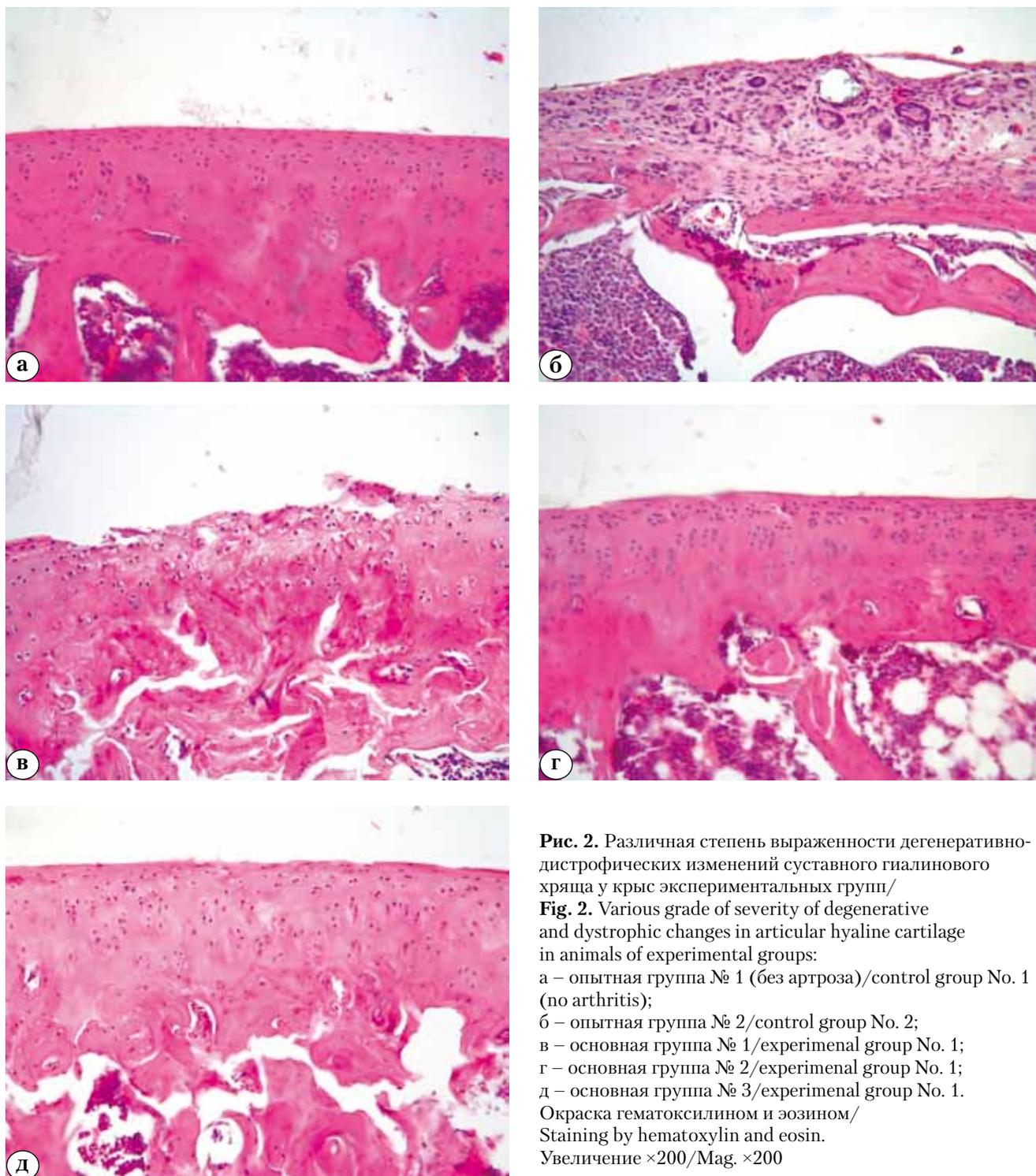


Рис. 2. Различная степень выраженности дегенеративно-дистрофических изменений суставного гиалинового хряща у крыс экспериментальных групп/

Fig. 2. Various grade of severity of degenerative and dystrophic changes in articular hyaline cartilage in animals of experimental groups:

а – опытная группа № 1 (без артроза)/control group No. 1 (no arthritis);

б – опытная группа № 2/control group No. 2;

в – основная группа № 1/experimental group No. 1;

г – основная группа № 2/experimental group No. 1;

д – основная группа № 3/experimental group No. 1.

Окраска гематоксилином и эозином/
Staining by hematoxylin and eosin.

Увеличение $\times 200$ /Mag. $\times 200$

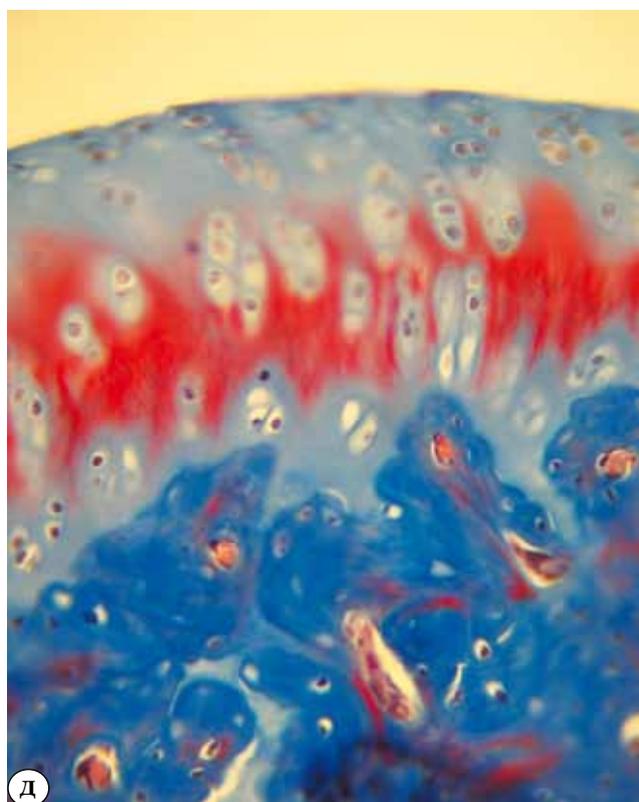
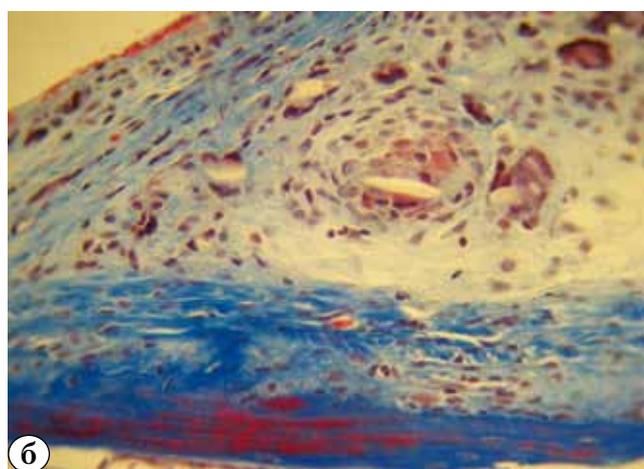
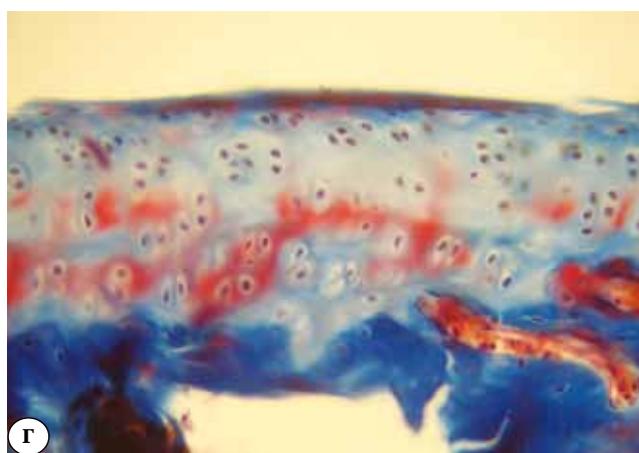
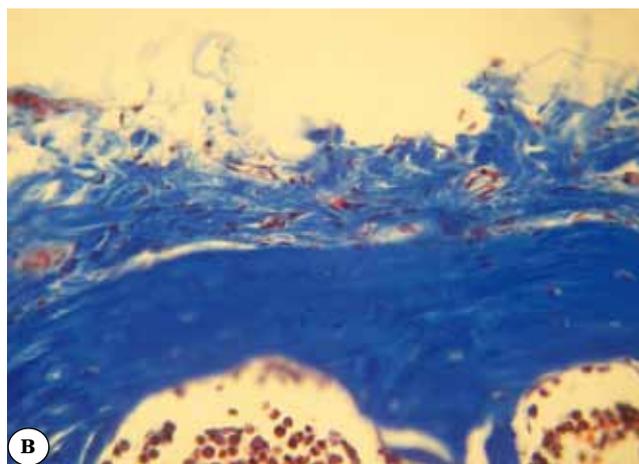
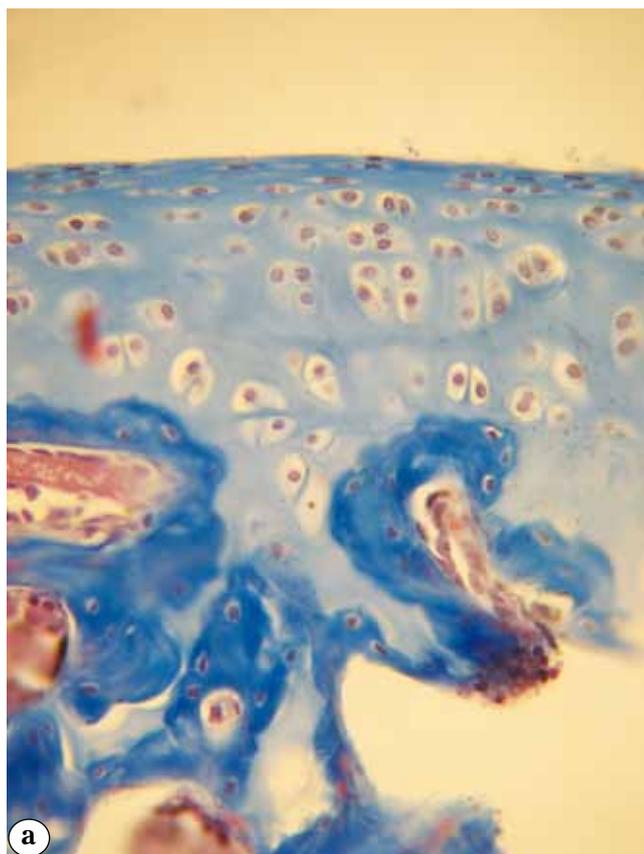


Рис. 3. Изменения тинкториальных свойств матрикса хрящевой ткани у крыс экспериментальных групп/
Fig. 3. Tinctorial properties changes in articular matrix in animals of experimental groups:
 а – опытная группа № 1 (без артроза)/control group No. 1 (no arthrosis);
 б – опытная группа № 2/control group No. 2;
 в – основная группа № 1/experimental group No. 1;
 г – основная группа № 2/experimental group No. 2;
 д – основная группа № 3/experimental group No. 3
 Окраска по Маллори/ Mallory staining.
 Увеличение ×400/Mag. ×400

Были определены три нечетко отграниченные друг от друга зоны. В поверхностной зоне отмечены участки истончения и разрушения суставной поверхности, дезорганизации коллагеновых волокон основного вещества хряща. Обращало на себя внимание разрастание соединительной ткани, умеренно инфильтрированной лимфоцитами, макрофагами, единичными гигантскими многоядерными клетками типа клеток инородных тел в переходной и базальной зонах (рис. 2г). При окраске по Маллори становилась более заметной неравномерность тинкториальных свойств хрящевого матрикса, толщины коллагеновых волокон и отсутствие их единой направленности (рис. 3г).

После последовательного введения ОТП и ГК на фоне экспериментального остеоартроза констатировали увеличение толщины хряща до $268 \pm 15,3$ мкм ($p < 0,05$) и объемной доли хондроцитов до $12,7 \pm 0,9\%$ ($p < 0,05$) (табл. 2). В поверхностной зоне препаратов обращали на себя внимание участки разрушения суставной поверхности, во всех зонах – признаки дезорганизации и разволокнения коллагеновых волокон хрящевой ткани. Межбалочные пространства субхондральной кости были заполнены богатой сосудами волокнистой соединительной тканью. На поверхности костных балок, окруженных соединительной тканью, и в межбалочных пространствах определяли отложения остеоида – новообразованной, но еще не минерализованной костной ткани. В промежуточной зоне происходила очаговая оссификация межклеточного вещества (рис. 2д). Тинкториальные свойства хрящевого матрикса полностью сохранялись, лишь базальная зона отличалась очаговой неравномерностью окрашивания коллагеновых волокон (рис. 3д).

Обсуждение

Возникновение и прогрессирование гонартроза обусловлено структурными изменениями в суставном хряще и других тканях коленного сустава. В нормальном суставном хряще процессы деструкции и репарации тканей происходят достаточно медленно, строго контролируются, находятся в равновесии и являются основой физиологического ремоделирования [10].

Межклеточный матрикс суставного хряща содержит большое количество протеогликанов, состоящих из глюкозамингликанов, связанных с гиалуроновой кислотой. На фоне воспалительных и дегенеративно-дистрофических процессов в суставе происходит качественное и количественное изменение клеточного и межклеточного матрикса хряща. Содержание гиалуроновой кислоты в синовиальной жидкости

уменьшается. Проллиферативная активность хондроцитов снижается, количество клеток уменьшается, выработка протеогликанов практически останавливается, что влечет за собой потерю воды. Агрекан, содержащийся в хрящевой матрице в большом количестве, обеспечивает эластичность и сжимаемость гиалинового хряща. Его потеря провоцирует образование множественных эрозий на суставной поверхности [10].

Гиалуроновая кислота играет значимую роль в метаболизме гиалинового хряща, с одной стороны, являясь компонентом синовиальной жидкости и покрывая суставную поверхность, с другой стороны, входит в состав структуры гиалинового хряща наряду с коллагеновыми волокнами и сульфатированными протеогликанами, чем, возможно, обеспечивает защиту хряща, снижая потери глюкозамингликанов.

Данные гистохимической окраски препаратов в нашем исследовании косвенно указывают на уменьшение уровня гликопротеинов и гиалуроновой кислоты в структуре гиалинового хряща коленного сустава у животных с экспериментальным остеоартрозом. Анализ полученных морфологических признаков экспериментального гонартроза отражает иммунопатологический и воспалительный процессы, развивающиеся в тканях сустава параллельно с дегенеративно-дистрофическими изменениями гиалинового хряща, что подтверждает адекватность используемой нами экспериментальной модели.

Данные морфологического исследования препаратов, полученных у животных с экспериментальным остеоартрозом на фоне применения ГК, показывают некоторое снижение воспалительной и иммунопатологической реакций в коленном суставе с одновременным усилением репаративного процесса в гиалиновом хряще.

Роль тромбоцитов в патогенезе остеоартроза, по всей видимости, более многогранна, чем мы сегодня это представляем. Тромбоциты содержат большое количество быстро высвобождаемых веществ, которые участвуют в первой фазе воспаления, влияя на течение воспалительного процесса в суставе, модулируя его длительность и активность. Кровяные пластинки активируют процессы миграции и активации лейкоцитов, а также репарацию в тканях, что определяет перспективу широкого применения содержащих их лекарственных форм в клинической практике.

Проведенное нами исследование показало значительное уменьшение выраженности деструктивных изменений в гиалиновом хряще и одновременное усиление репаративного процесса с восстановлением формы суставной поверхности и пролиферацией хондроцитов

у крыс с экспериментальным остеоартрозом после применения ОТП, а также последовательно введения ОТП и ГК.

Полученные результаты не вступают в противоречие с теоретическими данными о влиянии ГК как ингибитора экссудации, образования провоспалительных медиаторов и как составляющей метаболизма матрикса. Применение ОТП, обладающей двойным действием как на про-, так и на противовоспалительные цитокины, и значительно увеличивающей концентрацию различных факторов роста, в кратчайший срок повышает пролиферативную активность грануляционной ткани и приводит к активации поврежденной ткани хряща, таким образом разрешая воспалительный процесс.

Нельзя также исключить, что ГК при более продолжительном использовании способна стимулировать репаративные процессы в суставном хряще.

Выводы

При моделировании остеоартроза в коленном суставе у половозрелых крыс линии Wistar возникают грубые структурные изменения суставного хряща, вплоть до его полного разрушения, сопровождающегося сосудистой пролиферацией и гранулематозным воспалением. Введение ОТП, ГК, а также ОТП в сочетании с ГК на фоне развившегося остеоартроза сопровождается снижением выраженности дегенеративно-дистрофических изменений, улучшением показателей тинкториальных свойств матрикса суставного хряща. Применение ОТП отдельно или последовательное введение ОТП и ГК в большей степени оказывают положительное влияние на репаративный процесс в хрящевой ткани по сравнению с внутрисуставным введением ГК.

Конфликт интересов: не заявлен.

Источник финансирования: исследование проведено без спонсорской поддержки.

Литература

1. Башкина А.С., Широкова Л.Ю., Князева Т.С., Паруля О.М., Абросимова Е.Б., Носков С.М. Применение обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы в купировании болевого синдрома большого вертела. *Травматология и ортопедия России*. 2011;2(60):57-61.
2. Котельников Г.П., Ларцев Ю.В., Махова А.Н. Сравнительная оценка структурных изменений тканей сустава при различных моделях экспериментального артроза. *Казанский медицинский журнал*. 2006;(1):31-35.
3. Маланин Д.А., Новочадов В.В., Демкин С.А., Демещенко М.В., Данилов Д.И. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в лечении пациентов с гонартрозом III стадии. *Травматология и ортопедия России*. 2014;3(73):52-59.
4. Широкова Л.Ю., Носков С.М., Бахтиярова Т.И., Снигирева А.В., Носкова Т.С. Локальная терапия гонартроза аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмой. *Современные технологии в медицине*. 2012;1:97-100.
5. Andia I., Sanchez M., Maffulli N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(1):7-22. DOI: 10.1517/14712598.2012.632765.
6. Coudriet G.M., He J., Trucco M. Hepatocyte growth factor modulates interleukin-6 production in bone marrow derived macrophages: implications for inflammatory mediated diseases. *PLoS One*. 2010;5 (11):http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015384.
7. Drengk A., Zapf A., Sturmer E.K., Sturmer K.M., Frosch K.H. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(5):317-326. DOI: 10.1159/000151290.
8. Filardo G., Kon E., Roffi A., Di Matteo B., Merli M.L., Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(9):2459-2474. DOI: 10.1007/s00167-013-2743-1.
9. Guner S., Buyukbeci O. Analyzing the effects of platelet gel on knee osteoarthritis in the rat model. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2013;19(5):494-498. DOI: 10.1177/1076029612452117.
10. Hedbom E., Hauselmann H.J. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(1):45-53.
11. Karlsson J., Sjogren L.S., Lohmander L.S. Comparison of two hyaluronan drugs and placebo in patients with knee osteoarthritis. A controlled, randomized, double-blind, parallel-design multicentre study. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;(11):1240-1248.
12. Kuettner K.E., Goldberg V.M. Osteoarthritic Disorders. Rosemont, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons; 1995. 507 p.
13. Kwon D.R., Park G.Y., Lee S.U. The effects of intra-articular platelet-rich plasma injection according to the severity of collagenase induced knee osteoarthritis in a rabbit model. *Ann Rehabil Med*. 2012;36(4):458-465. DOI: 10.5535/arm.2012.36.4.458.
14. Malfait A.M., Little C.B., McDougall J.J. A commentary on modelling osteoarthritis pain in small animals. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(9):1316-1326. DOI: 10.1016/j.joca.2013.06.003.
15. Moreland L.W. Review Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther*. 2003;2(5):54-67.
16. Oliveira M.Z., Albano M.B., Namba M.M., Cunha L.A.M., Gonçalves R.R.L., Trindade E.S., Andrade L.F., Vidigal L. Effect of hyaluronic acids as chondroprotective in experimental model of osteoarthrosis. *Rev Bras Ortop*. 2014;49(1):62-68. DOI: 10.1016/j.rboe.2014.01.007.
17. Sezgin M., Demirel A.C., Karaca C. Does hyaluronan affect inflammatory cytokines in knee osteoarthritis? *Rheumatol Int*. 2005;(25):264-269. DOI: 10.1007/s00296-003-0428-7.
18. Walshe T.E., Dole V.S., Maharaj A.S.R. Inhibition of VEGF or TGF-beta signaling activates endothelium and

- increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(8):1185-1192.
DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.186742.
19. Wang C.T., Lin Y.T., Chiang B.L., Lin Y.H., Hou S.M. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(12):1237-1247.
DOI: 10.1016/j.joca.2006.05.009.
 20. Yang S.Y., Ahn S.T., Rhie J.W., Lee K.Y., Choi J.H., Lee B.J., Oh G.T. Platelet supernatant promotes proliferation of auricular chondrocytes and formation of chondrocyte mass. *Ann Plast Surg.* 2000;44(4):405-411.
- References**
1. Bashkina A.S., Shirokova L.Yu., Knyazeva T.S., Parulya O.M., Abrosimova E.B., Noskov S.M. [Application of platelet-rich plasma in reduction of greater trochanter pain syndrome]. *Traumatalogiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2011;2(60):57-61 (in Russ.).
 2. Kotelnikov G.P., Lartsev Yu.V., Makhova A.N. [Comparative evaluation of structural changes in the tissues of the joint under different experimental models of arthrosis] *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* [Kazan Medical Journal]. 2006; (1): 31-35 (in Russ.).
 3. Malanin D.A., Novochadov V.V., Doudkin S.A., Demeschenko M.V., Danilov D.I. [Platelet-rich autologous plasma in the treatment of patients with stage III gonarthrosis]. *Traumatalogiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2014; 3 (73): 52-59 (in Russ.).
 4. Shirokova L.Yu., Noskov S.M., Bakhtiarova T.I., Snigiryova A.V., Noskova T.S. [Local therapy of gonarthrosis using autologous platelet-enriched plasma]. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine* [Modern Technology in Medicine]. 2012; 1: 97-100 (in Russ.).
 5. Andia I, Sanchez M, Maffulli N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(1):7-22. DOI: 10.1517/14712598.2012.632765.
 6. Coudriet GM, He J, Trucco M. Hepatocyte growth factor modulates interleukin-6 production in bone marrow derived macrophages: implications for inflammatory mediated diseases. *PLoS One.* 2010;5 (11):http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015384.
 7. Drengk A, Zapf A, Sturmer EK, Sturmer KM, Frosch KH. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2009;189(5):317-326. DOI: 10.1159/000151290.
 8. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli ML, Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23(9):2459-2474.
DOI: 10.1007/s00167-013-2743-1.
 9. Guner S, Buyukbebeci O. Analyzing the effects of platelet gel on knee osteoarthritis in the rat model. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2013;19(5):494-498.
DOI: 10.1177/1076029612452117.
 10. Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(1):45-53.
 11. Karlsson J, Sjögren LS, Lohmander LS. Comparison of two hyaluronan drugs and placebo in patients with knee osteoarthritis. A controlled, randomized, double-blind, parallel-design multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2002;(11):1240-1248.
 12. Kuettner KE, Goldberg VM. Osteoarthritic Disorders. Rosemont, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons; 1995. 507 p.
 13. Kwon DR, Park GY, Lee SU. The effects of intra-articular platelet-rich plasma injection according to the severity of collagenase induced knee osteoarthritis in a rabbit model. *Ann Rehabil Med.* 2012;36(4):458-465.
DOI: 10.5535/arm.2012.36.4.458.
 14. Malfait AM, Little CB, McDougall JJ. A commentary on modelling osteoarthritis pain in small animals. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(9):1316-1326.
DOI: 10.1016/j.joca.2013.06.003.
 15. Moreland LW. Review Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther.* 2003;2(5):54-67.
 16. Oliveira MZ, Albano MB, Namba MM, Cunha LAM, Gonçalves RRL, Trindade ES, Andrade LF, Vidigal L. Effect of hyaluronic acids as chondroprotective in experimental model of osteoarthrosis. *Rev Bras Ortop.* 2014;49(1):62-68. DOI: 10.1016/j.rboe.2014.01.007.
 17. Sezgin M., Demirel A.C., Karaca C. Does hyaluronan affect inflammatory cytokines in knee osteoarthritis? *Rheumatol Int.* 2005;(25):264-269.
DOI: 10.1007/s00296-003-0428-7.
 18. Walshe T.E., Dole V.S., Maharaj A.S.R. Inhibition of VEGF or TGF-beta signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(8):1185-1192.
DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.186742.
 19. Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(12):1237-1247.
DOI: 10.1016/j.joca.2006.05.009.
 20. Yang SY, Ahn ST, Rhie JW, Lee KY, Choi JH, Lee BJ, Oh GT. Platelet supernatant promotes proliferation of auricular chondrocytes and formation of chondrocyte mass. *Ann Plast Surg.* 2000;44(4):405-411.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Демкин Сергей Анатольевич – аспирант кафедры травматологии, ортопедии, ВПХ с курсом травматологии и ортопедии ФУВ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

Маланин Дмитрий Александрович – д-р мед. наук, профессор заведующий кафедрой травматологии, ортопедии

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Sergey A. Demkin – graduate student, Department of Traumatology, Orthopedics and Field Surgery, Volgograd State Medical University; Head of Laboratory of Experimental and Clinical Orthopedics, Volgograd Medical Scientific Centre

Dmitry A. Malanin – Dr. Sci. (Med.) Professor, the Head of the Department of Traumatology, Orthopedics and

и ВПХ с курсом травматологии и ортопедии ФУВ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России; заведующий лабораторией экспериментальной и клинической ортопедии ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

Field Surgery, Volgograd State Medical University; Head of Laboratory of Experimental and Clinical Orthopedics for Volgograd Medical Scientific Centre

Рогова Людмила Николаевна – д-р мед. наук, профессор заведующая кафедрой патологической физиологии ФУВ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

Lyudmila N. Rogova – Dr. Sci. (Med.) Professor, the Head of Physiopathology Department, Volgograd State Medical University

Григорьева Наталья Владимировна – д-р мед. наук, профессор кафедры патологической анатомии ФУВ ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

Natalia V. Grigorieva – Dr. Sci. (Med.), Professor at Pathologic Anatomy Department, Volgograd State Medical University

Байдова Ксения Валерьевна – лаборант ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

Ksenia V. Baidova – laboratory assistant, Volgograd Medical Scientific Centre

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

Конференция молодых ученых Северо-Западного федерального округа

Дата проведения: 14 апреля 2017 года

Место проведения: Санкт-Петербург, ул. Академика Байкова, 8

Организатор конференции:

ФГБУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России (Санкт-Петербург)

Предварительная программа:

- Возможности консервативных методов лечения заболеваний крупных суставов
- Современные технологии остеосинтеза
- Эндопротезирование крупных суставов
- Лечение больных с травмами и заболеваниями позвоночника
- Эндоскопическая хирургия крупных суставов
- Хирургия кисти
- Микрохирургические технологии в травматологии и ортопедии
- Проблема остеопороза в травматологии и ортопедии
- Гнойная остеология
- Организация травматолого-ортопедической помощи населению
- Вопросы реабилитации пациентов травматолого-ортопедического профиля

Заявки на участие принимаются до 1 февраля 2017 года

По вопросам научной программы обращаться к Ученому секретарю РНИИТО им. Р.Р. Вредена Денисову Алексею Олеговичу

+7(965) 0733881, e-mail: med-03@yandex.ru

Сервис-партнер:

Маничев Андрей Леонидович

+7 (812) 3863831, info@altaastra.com