

**С. А. Демкин, Д. А. Маланин, Л. Н. Рогова, Г. Л. Снигур,
Н. В. Григорьева, К. В. Байдова**

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра травматологии, ортопедии и ВПХ с курсом травматологии и ортопедии ФУВ;
ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ОСТЕОАРТРОЗА КОЛЕННОГО СУСТАВА У КРЫС НА ФОНЕ ВНУТРИСУСТАВНОГО ВВЕДЕНИЯ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ ПЛАЗМЫ

УДК 616.71-008.1:616.71-003.93

В эксперименте на 30 половозрелых крыс линии Wistar проведена оценка морфологических изменений в структуре гиалинового хряща коленного сустава при экспериментальном остеоартрозе после внутрисуставного введения ОТП. При моделировании остеоартроза в коленном суставе выявлено возникновение грубых структурных изменений суставного хряща, вплоть до его полного разрушения, сопровождающегося сосудистой пролиферацией и гранулематозным воспалением. Введение ОТП на фоне развившегося остеоартроза сопровождается снижением выраженности дегенеративно-дистрофических изменений, улучшением показателей тинкториальных свойств матрикса суставного хряща.

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

S. A. Demkin, D. A. Malanin, L. N. Rogova, G. L. Snigur, N. V. Grigorieva, K. V. Baidova

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE USE OF INTRAARTICULAR PLATELET-RICH AUTOPLASMA THERAPY IN RATS WITH KNEE OSTEOARTHRITIS

We evaluated the morphological changes in the knee hyaline cartilage in 30 Wistar mature rats with experimental knee osteoarthritis after intraarticular platelet-rich autoplasm therapy. Knee osteoarthritis has been shown to involve damage and destruction of the articular cartilage associated with vascular proliferation and granulomatous inflammation. The use of intraarticular platelet-rich autoplasm therapy resulted in a reduction of degenerative and dystrophic changes in the cartilage, an improvement of the tinctorial properties of the articular matrix.

Key words: osteoarthritis, articular cartilage, platelet-rich autoplasm.

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).

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 [5].

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 [5, 9].

Возможность управления биологическим потенциалом собственного организма

и использования его в лечебном процессе представляется весьма перспективным и уже находит подтверждение в ряде работ, посвященных обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП). 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 [2, 9]. Существующие экспериментальные исследования на этот счет остаются дискуссионными и пока не позволяют составить целостное представление о патоморфозе структурных изменений хрящевой ткани после применения ОТП на фоне остеоартроза [4, 7, 8].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить морфологические изменения в структуре гиалинового хряща коленного сустава при экспериментальном остеоартрозе после внутрисуставного введения ОТП.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для экспериментального исследования послужили 30 половозрелых крыс линии Wistar массой (250 ± 2,2) г.

При работе с лабораторными животными соблюдали требования, изложенные в правилах лабораторной практики (GLP), «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 3 группы по 10 животных в каждой (2 экспериментальные и 1 контрольная). Все манипуляции у животных 3 групп были выполнены под общим обезболиванием с использованием препарата «Рометар» по методике, описанной фирмой-производителем.

В двух экспериментальных группах моделировали остеоартроз путем внутрисуставного введения 10%-й суспензии стерильного талька [1].

Через 30 дней после моделирования остеоартроза животным экспериментальной группы № 2 проводили двухкратное внутрисуставное введение 0,2 мл ОТП с периодичностью 1 раз в 21 день [9].

Животным контрольной группы проводили однократное внутрисуставное введение 0,2 мл 0,9%-го раствора NaCl.

Все внутрисуставные инъекции осуществляли из стандартного передневнутреннего доступа в левый коленный сустав (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика экспериментальных групп животных

Порода животных		Линия Wistar		
Возраст животных		Половозрелые		
Масса животных		250 ± 2,2 г		
Вводимый препарат	0,9%-й раствор NaCl	10%-я суспензия стерильного талька	ОТП	ГК
Группы				
Контрольная	0,2 мл однократно	–	–	–
Экспериментальная № 1	–	0,5 мл однократно	–	–
Экспериментальная № 2	–	0,5 мл однократно	0,2 мл 1 раз в неделю, трехкратно, спустя 30 дней после введения талька	–
Все препараты вводили в левый коленный сустав				

Через 1 месяц после проведения внутрисуставных инъекций 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%-м растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) в течение 24 часов (Newell K. J., et al., 2001). Проводили бескислотную декальцинацию в растворе этилендиаминтетраацетате 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 изготавливали срезы толщиной 6–8 микрон, окрашивали гематоксилином и эозином по Маллори (Киясов А. П., 2001; Коржевский Д. Э., 2005).

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» (Россия). 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 Тест-Морфо-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 сравнения качественных признаков использовали критерии χ^2 и Фишера. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки не превышала $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что в контрольной группе животных 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. 1 а). Иммунохимическая реакция по Маллори выявляла равномерное расположение коллагеновых волокон, отсутствие очагов оссификации (рис. 2 а).

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 поверхности 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. 1 б).

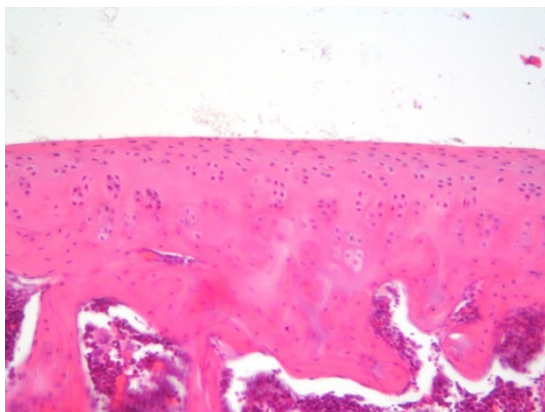
При гистохимическом исследовании в суставном хряще отмечали неравномерность окрашивания коллагеновых волокон с выраженным нарушением тинкториальных свойств матрикса хрящевой ткани. В участках склероза волокна коллагена были окрашены наиболее интенсивно (рис. 2 б).

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 ($18,4 \pm 2,0$) % ($p < 0,05$).

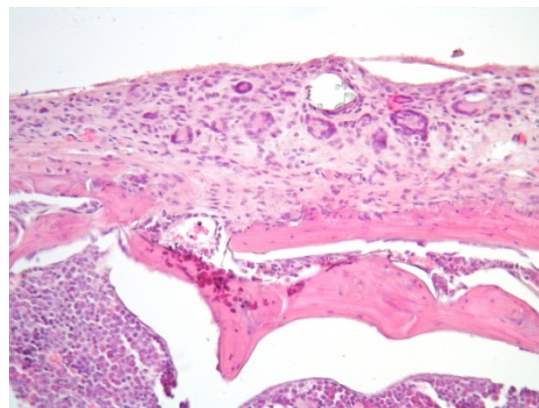
Различали три отграниченные друг от друга зоны с типичными для остеоартроза дегенеративными изменениями, но выраженными в меньшей степени. В поверхностной зоне контуры суставной поверхности выглядели ровными.

Несмотря на наличие «пустых» лакун и хондроцитов с признаками распада и образованием апоптозных телец, определяли увеличение количества как отдельно расположенных хондроцитов, так и их изогенных групп во всех зонах (рис. 1 в).

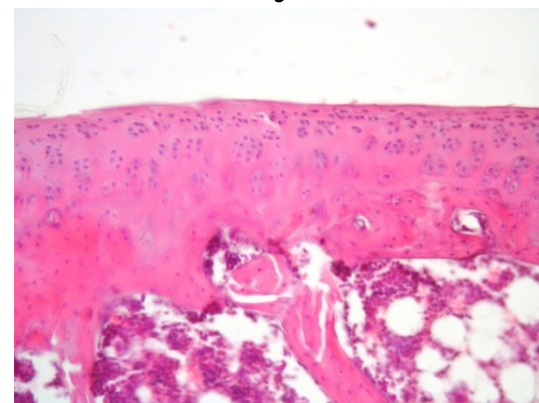
В промежуточной зоне происходила очаговая оссификация межклеточного вещества, что было особенно заметно при окраске по Маллори. Равномерность распределения коллагеновых волокон и тинкториальные свойства хрящевой матрикса сохранялись во всех зонах (рис. 2 в).



а



б



в

Рис. 1. Различная степень выраженности дегенеративно-дистрофических изменений суставного гиалинового хряща у крыс экспериментальных групп. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$:

а – контрольная группа;

б – экспериментальная группа № 1;

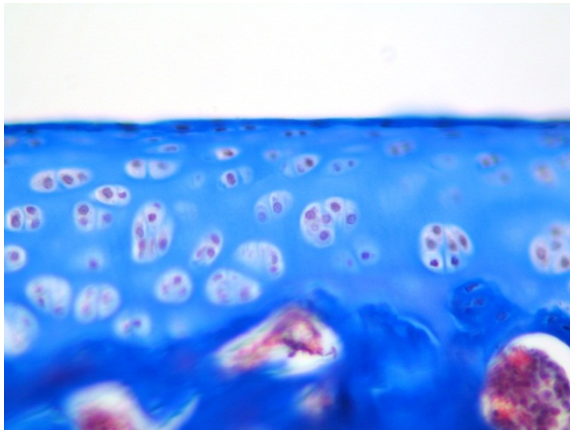
в – экспериментальная группа № 2

**Морфометрические параметры суставного гиалинового хряща
у животных экспериментальных групп**

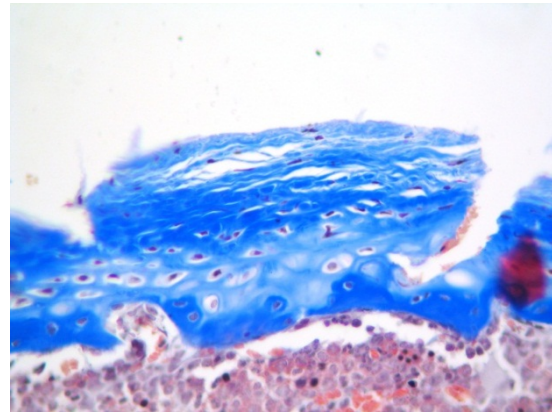
Экспериментальные группы	Толщина, мкм	Объемная доля хондроцитов, %
Контрольная	330 ± 17,3	13,7 ± 1,1
Экспериментальная № 1	121 ± 20,4*	1,2 ± 0,6*
Экспериментальная № 2	275 ± 18,9**	18,4 ± 2,0**

* Достоверные изменения по отношению контрольной группы ($p < 0,05$);

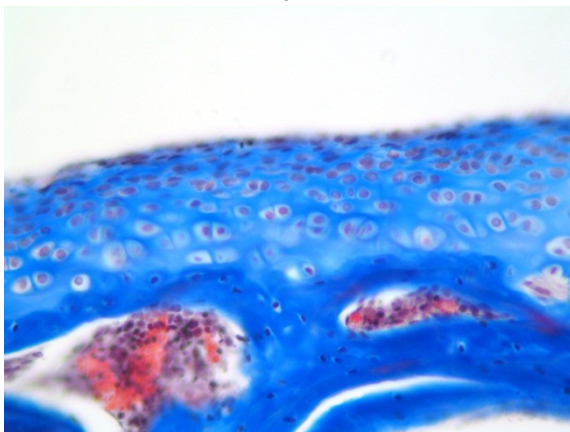
** достоверные изменения по отношению к группе с остеоартрозом ($p < 0,05$).



а



б



в

Рис. 2. Изменения тинкториальных свойств матрикса хрящевой ткани у крыс экспериментальных групп. Окраска по Маллори. Увеличение $\times 400$:

а – контрольная группа;

б – экспериментальная группа № 1;

в – экспериментальная группа № 2

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 [5].

На сегодняшний день в клинической практике предпринимаются разносторонние попытки воздействия на течение воспалительного процесса в суставе и дегенеративно-дистрофических изменений 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.

Высокий уровень бета-тромбоглобулина, тромбоцитарного фактора 4 в ОТП стимулирует воспалительный ответ, активируя миграцию нейтрофилов. В тоже время ОТП может разрешать воспаление, восстанавливая эндотелиальный барьер путем высвобождения гепатоцитарного фактора роста, VEGF и TGF- β [6, 10]. Высвобождение биологически активных веществ из гранул тромбоцитов, с одной стороны,

подавляет активность металлопротеиназ, а с другой – стимулирует пролиферацию, что обуславливает хондропротективное действие ОТП. Из литературных источников известно также, что ОТП *in vitro* стимулирует выработку хондроцитами коллагена II типа, снижает уровень апоптоза хондроцитов [7].

Полученные результаты не вступают в противоречие с теоретическими данным о влиянии ГК как ингибитора экссудации, образования провоспалительных медиаторов и как составляющей метаболизма матрикса. Применение ОТП, обладающей двояким 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При моделировании остеоартроза в коленном суставе у половозрелых крыс линии Wistar возникают грубые структурные изменения в суставном хряще, вплоть до его полного разрушения, сопровождающегося сосудистой пролиферацией и гранулематозным воспалением.

Введение ОТП на фоне развившегося остеоартроза сопровождается снижением выраженности дегенеративно-дистрофических изменений, улучшением показателей тинкториальных свойств матрикса суставного хряща.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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. – С. 31–35.

2. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в лечении пациентов с гонартрозом III стадии / Д. А. Маланин, В. В. Новочадов, С. А. Демкин и др. // Травматология и ортопедия России. – 2014. – № 3. – С. 52–59.

3. Andia I., Sanchez M., Maffulli N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies // Expert Opin. Biol. Ther. – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 7–22.

4. Guner S., Buyukbebeci O. Analyzing the effects of platelet gel on knee osteoarthritis in the rat model. Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2013. – Vol. 19. – P. 494–498.

5. Hedbom E., Hauselmann H. J. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59. – P. 45–53.

6. 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 / C. T. Wang, Y. T. Lin, B. L. Chiang, et al. // Osteoarthr. Cartil. – 2006. – Vol. 12. – P. 1237–1247.

7. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells / A. Drengk, A. Zapf, E. K. Sturmer, et al. // Cells Tissues Organs. – 2009. – Vol. 189, № 5. – P. 317–326.

8. 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. – Vol. 6, № 4. – P. 458–465.

9. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration / G. Filardo, E. Kon, A. Roffi, et al. // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. – 2015. – Vol. 23. – P. 2459–2474.

10. 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. – Vol. 29. – P. 1185–1192.

А. И. Перепелкин, В. Б. Мандриков¹, А. И. Краюшкин, Е. С. Атрощенко

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра анатомии человека, кафедра физической культуры и здоровья¹

К ВОПРОСУ О ФОРМИРОВАНИИ ПРОДОЛЬНОГО СВОДА СТОПЫ У ДЕТЕЙ

УДК 617.586-007.58:611.986:378.4

Работа посвящена исследованию продольного свода стопы у детей с использованием оригинального программно-аппаратного комплекса. Всего под наблюдением находилось 1 561 человек, из которых 199 детей первого детства, 394 – второго детства, 252 человека подросткового возраста, а также 716 лиц юношеского возраста. В каждой возрастной группе у девочек и мальчиков изучался тип телосложения. В результате исследования было выявлено, что в период первого детства гендерные различия продольного свода стопы не выявляются, в то же время обнаруживаются соматотипические различия. Изменения индексов и коэффициента К свидетельствуют об увеличении продольного свода стопы в возрасте с 4 до 7 лет. В период второго детства выявляются гендерные и усиливаются соматотипические значимые различия продольного свода стопы по сравнению с периодом первого детства. В подростковом периоде у мальчиков наблюдается более высокие показатели коэффициента К, свидетельствующие о более низком расположении продольного свода стопы по сравнению с девочками. Юношеский период характеризуется онтогенетическим завершением формирования продольного свода стопы, наиболее выраженными соматотипическими и гендерными его различиями.

Ключевые слова: продольный свод стопы, формирование стопы, плантография, дети.