

УДК 615.276:616.72-018.36

ВЛИЯНИЕ ИНТРААРТИКУЛЯРНОГО ВВЕДЕНИЯ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА НА ЭЛЕМЕНТЫ СИНОВИАЛЬНОГО СУСТАВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© В. И. НИКОЛАЕВ, Д. А. ЗИНОВКИН, А. А. ТРЕТЬЯКОВ

УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: изучить морфологические и морфометрические изменения эпифиза кости крысы при внутрисуставном введении хондроитина сульфата (ХС).

Материал и методы. Объектом исследования явились коленные суставы 36 крыс линии Вистар. Инъекции ХС в дозе 0,05 мл производились однократно в неделю в один из коленных суставов (экспериментальный сустав), в противоположный сустав вводили изотонический раствор NaCl такого же объема (контрольный сустав). Животные выводились из эксперимента в количестве 12 особей на 7-е, 14-е и 21-е сутки, что соответствовало недельному сроку после одно-, двух- и трехкратных внутрисуставных инъекций ХС и 0,9 % NaCl. Выделенные коленные суставы помещали в декальцинирующую жидкость, после чего фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине. Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. При морфометрическом анализе оценивались толщина гиалинового суставного хряща, толщина хряща зоны роста эпифиза и клеточность субхондральной кости.

Результаты. Изучение толщины суставного хряща, зоны роста эпифизарного хряща и клеточного состава субхондральной кости показало статистически значимое динамическое увеличение этих показателей после 2-й и 3-й внутрисуставных инъекций ХС. При оценке толщины суставного хряща на 21-е сутки определились статистически значимые различия в экспериментальной и контрольной группах ($p < 0,0001$), толщина эпифизарного хряща к этому сроку статистически значимо увеличилась ($p < 0,0001$), клеточность костного мозга имела статистически значимые различия ($p = 0,002$).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о выраженном регенераторном действии ХС, введенного интраартикулярно, на суставной хрящ.

Ключевые слова: хондроитин сульфат, интраартикулярное введение, остеоартрит.

Вклад авторов: Николаев В.И.: концепция и дизайн исследования, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи для публикации. Зиновкин Д.А.: статистическая обработка данных, редактирование, обсуждение данных. Третьяков А.А.: получение экспериментальных данных, обзор публикаций по теме статьи.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования: исследование проведено без спонсорской поддержки.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Николаев В.И., Зиновкин Д.А., Третьяков А.А. Влияние интраартикулярного введения хондроитина сульфата на элементы синовиального сустава в эксперименте. *Проблемы Здоровья и Экологии*. 2020;65(3):84–89

EFFECT OF INTRA-ARTICULAR INJECTION OF CHONDROITIN SULFATE INTO SYNOVIAL JOINT ELEMENTS IN AN EXPERIMENT

© VLADIMIR I. NIKOLAEV, DMITRY A. ZINOVKIN, ALEXANDER A. TRETYAKOV

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

ABSTRACT

Objective: to study morphological and morphometric changes in the epiphysis bone in a rat during the intra-articular injection of chondroitin sulfate (CS).

Material and methods. The object of the study was the knee joints of 36 Wistar rats. CS injections at a dose of 0.05 ml were performed once a week into one of the knee joints (experimental joint), and isotonic NaCl solution at the same volume was injected into the opposite joint (control joint). The animals in the number of 12 units were withdrawn from the experiment on the 7th, 14th, and 21st days, which corresponded to one week after one-, two- and three-fold intra-articular injections of HC and 0.9 % NaCl.

The isolated knee joints were placed in a decalcifying liquid, then were fixed in 10% neutral buffered formalin. 4 micron histological sections were stained with hematoxylin and eosin. The morphometric analysis assessed the thickness of hyaline articular cartilage, the thickness of the epiphysis growth zone cartilage, and the cell content of the subchondral bone.

Results. The study of the thickness of the articular cartilage, the growth zone of epiphyseal cartilage and the cellular composition of the subchondral bone has showed a statistically significant dynamic increase in these indicators after the 2nd and 3rd intra-articular injections of CS. The assessment of the thickness of the articular cartilage on the 21st day found some statistically significant differences between the experimental and control groups ($p < 0.0001$), the thickness of the epiphyseal cartilage had increased significantly by that time ($p < 0.0001$), and the cell content of bone marrow showed statistically significant differences ($p = 0.002$).

Conclusion. The obtained data testify to a pronounced regenerative effect of CS, injected intra-articularly into articular cartilage.

Key words: chondroitin sulfate, intra-articular injection, osteoarthritis.

Contribution of authors: Nikolaev V.I.: concept and design of the research, verification of critical content, approval of manuscript for publication. Zinovkin D.A.: statistical data processing, editing, data discussion. Tretyakov A.A.: obtaining experimental data, review of publications on the topic of the article.

Conflict of interests: authors declare no conflict of interest.

Funding: study conducted without sponsorship.

FOR CITATION:

Nikolaev V.I., Zinovkin D.A., Tretyakov A.A. Effect of intraarticular injection of chondroitin sulfate into synovial joint elements in an experiment. *Problems of Health and Ecology = Problemy Zdorov'ya i Ekologii* 2020;65(3):84–89. (In Russ.)

Введение

Хондроитина сульфат (ХС) — биополимер из группы гликозаминогликанов, по составу он является высокомолекулярным гетерополисахаридом. Составляющими частями молекулы ХС являются гиалуриновая кислота и сульфатированный галактозамин. Сульфатные группы последнего присоединяются к С6- и С4- атомам. ХС входит в состав экстрацеллюлярного матрикса гиалинового хряща, что и обеспечивает уникальные биомеханические свойства хрящевой ткани, и при этом относится к группе веществ, модифицирующих хрящевую ткань. Особенности молекулярного строения ХС легли в основу применения его при остеоартрите (ОА), так как он не только синтезируется организмом, но и при введении в него проникает в структуру хрящевой ткани, стимулирует ее синтез и ингибирует деструкцию. Природным источником для получения хондропротекторов с действующим началом в виде ХС является хрящевая ткань крупного рогатого скота и морских рыб [1, 2].

Остеоартрит — хроническое полиэтиологическое, прогрессирующее и самое частое заболевание суставов. Его распространенность в мире составляет 10–12 %. В Европейском союзе насчитывается более 100 млн. пациентов с ОА крупных суставов. В Республике Беларусь ежегодно регистрируется более 30 тысяч заболеваний ОА, в последние десятилетия первичная заболеваемость колеблется в пределах 489,0–510,1 на 100 тысяч населения, а среднегодовые темпы прироста — 4,1 % [3].

На протяжении последних 15–20 лет (несмотря на пересмотры) в протоколах МЗ РБ лечения пациентов с ОА и действующих рекомендациях EULAR (2018), ESCEO (2019) фармакологическое лечение включает использование хондропротекторов. К препаратам первой линии предлагается хондроитина сульфат и/или глюкозамин. Лекарственные средства, содержащие ХС, в основном представлены в таблетированных

формах для постоянного приема длительными курсами. Инъекционные формы ХС (алфлутоп, артрадол, румалонг, хондролон, мукосат) предназначены для внутримышечного применения [4]. Согласно инструкции по применению внутримышечных препаратов, максимальная их концентрация в плазме крови определяется через 3–4 часа, а в синовиальной жидкости — через 4–5 часов, при этом биодоступность составляет 13 %, что связано с резорбтивным механизмом действия.

Создание новых технологий локальной терапии ОА является актуальной проблемой современной артрологии. РУП «Белмедпрепараты» выпускает лекарственное средство «Мукосат» только для внутримышечных инъекций.

Таким образом, существует необходимость повышения эффективности применения ХС путем использования способа внутрисуставного введения данных лекарственных средств.

Цель исследования

Изучить морфологические и морфометрические изменения эпифиза кости крысы при внутрисуставном введении хондроитина сульфата (ХС).

Материалы и методы

В исследование были включены 36 крыс линии Вистар обоего пола в возрасте 9 недель, весом $274,0 \pm 16,4$ г. Крысы содержались по 2–3 в клетках, расположенных в чистых проветриваемых помещениях, с контролируемой температурой и влажностью и 12-часовым день-ночь циклом. Пища и вода для лабораторных животных были *ad libitum*.

При проведении эксперимента инъекция ХС в дозе 0,05 мл производилась однократно в неделю в один из коленных суставов (экспериментальный сустав), на противоположном производилось введение изотонического раствора такого же объема

(контрольный сустав). Животных выводили из эксперимента группами по 12 особей путем ингаляции эфирным наркозом на 7-е, 14-е и 21-е сутки. Манипуляции над животными проводили с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

В дальнейшем сразу после гибели животного сустав выдвигали и помещали его в декальцинирующую жидкость Histodecal (Sigma, Италия) на 48–72 часа. После этого сустав разрезали в сагиттальном направлении, все кусочки тканей фиксировали в 10 % нейтральном забуференном по Лилли формалине в течение 24–48 часов. Гистологическая проводка проводилась в гистопроцессоре STP-120 (Thermo Scientific, Германия).

Из парафиновых блоков на микротоме Thermo Scientific Microm HM 450 (Thermo Scientific, Германия) готовили серии срезов толщиной 4 мкм. После депарафинирования следовало окрашивание гематоксилином и эозином по стандартной методике.

При морфометрическом анализе суставов оценивались: толщина гиалинового суставного хряща, толщина хряща зоны роста эпифиза и клеточность костного мозга губчатого вещества эпифиза кости. Для оценки толщины суставного гиалинового хряща и эпифизарного хряща зоны роста проводились 10-кратные измерения данных параметров в 3 неперекрывающихся полях зрения, после чего высчитывали среднее значения для каждого животного. Костный мозг оценивался как клеточный либо нормальный. Под клеточным понимали костный мозг с преобладанием количества клеток эритроцитарного, гранулоцитарного и эритроидного ряда над количеством жировых клеток стромы в поле зрения более 70 %. Нормоклеточным являлся костный мозг, имевший физиологически нормальное (менее 70 %) для возраста животного соотношение клеток миелоидного и лимфоидного ряда к строме.

Морфометрический анализ проводился с использованием микроскопа HumaScore Premium LED (Human Diagnostics, Германия). Для проведения измерений применялся пакет программ ImageJ (NIH, США).

При проведении анализа Шапиро-Уилка не было выявлено нормального распределения, в связи с чем все значения показателей в нашем исследовании были представлены медианой, 25-м и 75-м процентилем. Для оценки толщины суставного и эпифизарного хряща использовался критерий Манна-Уитни. Оценка клеточно-

сти костного мозга проводилась с использованием двустороннего критерия Фишера. Для внутригрупповых сравнений параметров использовался метод ANOVA с поправкой Гейсера-Гринхауза. Статистически значимыми были различия при $p < 0,05$. Все расчеты и графическое выражение показателей проводились с использованием пакета программ «GraphPad Prism», v 7 (GP, США).

Результаты и обсуждение

При микроскопическом исследовании суставов на 7-е сутки исследования в экспериментальном и контрольном суставе суставной хрящ имел нормальное гистологическое строение, зона роста эпифиза не имела изменений толщины хряща, между костных балок губчатого вещества кости определялся нормоклеточный костный мозг.

Медиана толщины суставного хряща в экспериментальном суставе составляла 195,9 (190,3; 198,4) мкм, в контрольном — 192,9 (189,8; 195,4) мкм. При сравнении групп статистически значимые различия в толщине суставного хряща не определялись ($p = 0,486$) (рисунок 1А). Медиана толщины эпифизарного хряща в экспериментальном суставе составляла 163,8 (155,6; 168,4) мкм, в контрольном — 164,2 (156,4; 165,8) мкм. Статистически значимые различия толщины эпифизарного хряща ($p = 0,889$) при сравнении групп не определялись (рисунок 1Б).

Увеличение клеточности костного мозга в эпифизе кости определялось в 1 случае в каждой группе. При анализе клеточности костного мозга в группах не определялись статистически значимые различия ($p = 0,99$).

При микроскопическом исследовании суставов на 14-е сутки исследования в экспериментальном суставе определялось незначительное утолщение суставного хряща, очаги гиперплазии эпифизарного хряща зоны роста. Отмечались участки увеличения клеточности костного мозга у 7 животных. В контрольном суставе суставной хрящ имел нормальное гистологическое строение, зона роста эпифиза была нормальной толщины хряща, определялись единичные пролиферирующие хондроциты, между костных балок губчатого вещества кости определялся нормоклеточный костный мозг.

Медиана толщины суставного хряща в экспериментальном суставе составляла 190,1 (186,7; 198,4) мкм, в контрольном — 188,9 (180,6; 192,8) мкм. При сравнении групп статистически значимые различия не определялись ($p = 0,213$) (рисунок 1В). Медиана толщины эпифизарного хряща в

экспериментальном суставе составляла 163,0 (156,5; 167,9) мкм, в контрольном — 162,3 (153,5; 163,2) мкм. Статистически значимые различия ($p = 0,589$) при сравнении групп не определялись (рисунок 1Г). Клеточный костный мозг в эпифизе кости определялся в 7 случаях в экспериментальных суставах и в 1 случае — в контрольных суставах. При анализе клеточности костного мозга в группах определялись статистически значимые различия ($p = 0,027$).

При микроскопическом исследовании суставов на 21-е сутки в экспериментальных суставах определялось значительное утолщение суставного хряща (рисунок 2А),

отмечалось утолщение эпифизарного хряща зоны роста за счет хрящевой метаплазии костных балок губчатого вещества (рисунок 2В). Наблюдались участки увеличенной клеточности костного мозга у большинства животных (рисунок 2Д). В контрольном суставе суставной хрящ имел нормальное гистологическое строение (рисунок 2Б), зона роста эпифиза не имела изменений костных балок (рисунок 2Г), определялись единичные пролиферирующие хондроциты, между костных балок губчатого вещества кости определялся нормоклеточный костный мозг у большинства животных (рисунок 2Е).

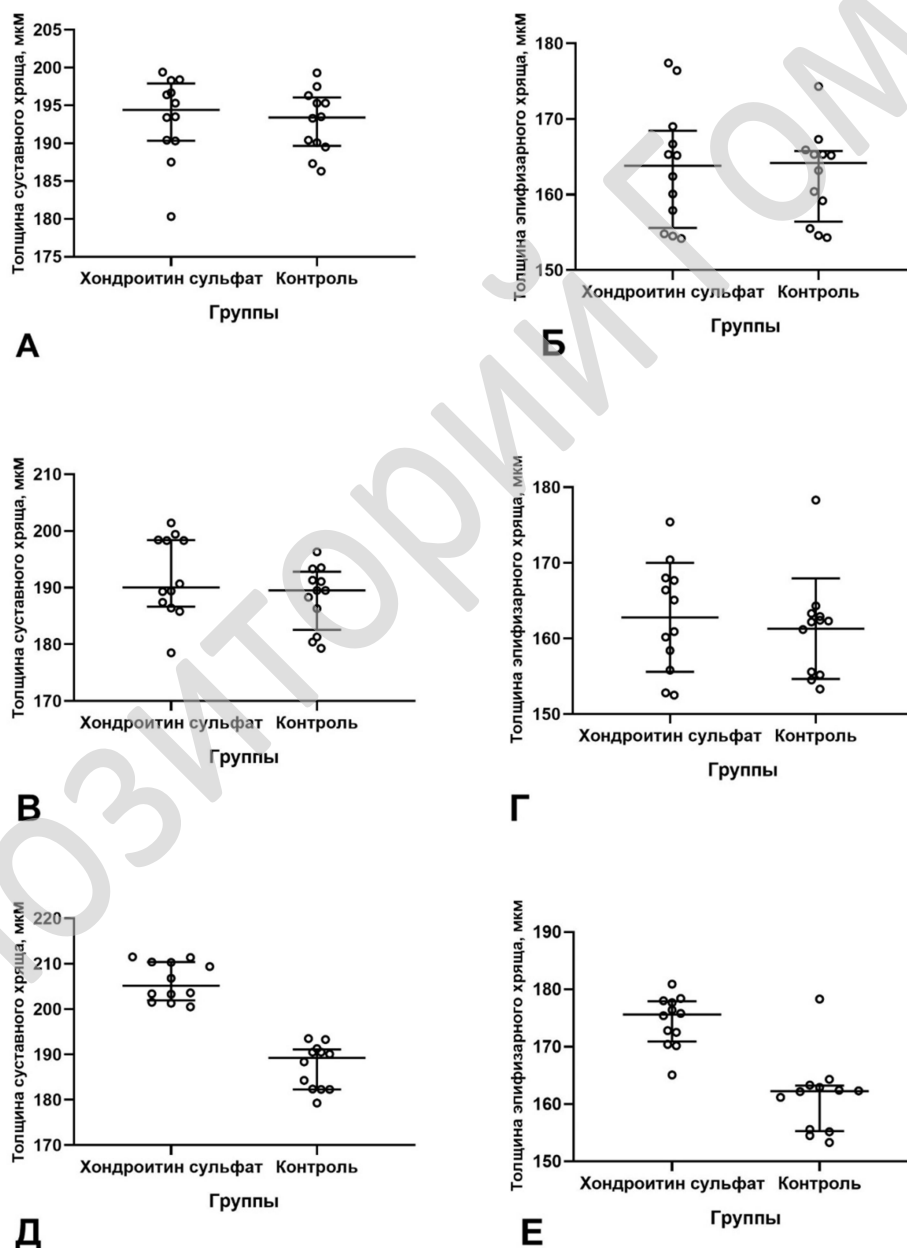


Рисунок 1 — Статистическая характеристика групп: **А** — толщина суставного хряща на 7-е сутки; **Б** — толщина эпифизарного хряща на 7-е сутки; **В** — толщина суставного хряща на 14-е сутки; **Г** — толщина эпифизарного хряща на 14-е сутки; **Д** — толщина суставного хряща на 21-е сутки; **Е** — толщина эпифизарного хряща на 21-е сутки

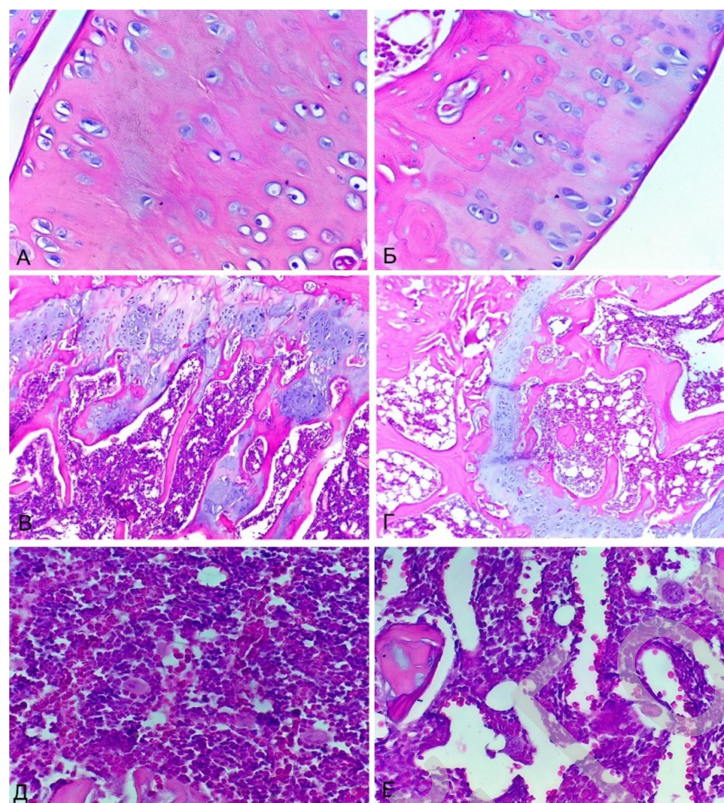


Рисунок 2 — Морфологические изменения эпифиза кости на 21-е сутки: А — суставной хрящ экспериментального сустава (увеличение $\times 400$); Б — суставной хрящ контрольного сустава (увеличение $\times 400$); В — хрящевая метаплазия костных балок в непосредственной близости от эпифизарного хряща экспериментального сустава (увеличение $\times 100$); Г — эпифизарный хрящ контрольного сустава (увеличение $\times 100$); Д — клеточный костный мозг губчатого вещества кости экспериментального сустава (увеличение $\times 400$); Е — нормальный костный мозг губчатого вещества кости контрольного сустава (увеличение $\times 400$). Окраска: гематоксилин-эозин

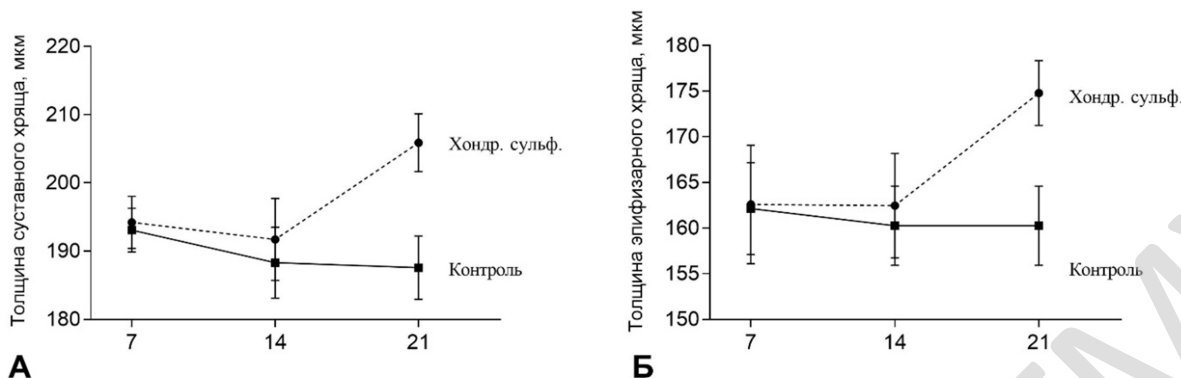
Медиана толщины суставного хряща в экспериментальном суставе составляла 205,2 (202,0; 210,4) мкм, в контрольном — 189,3 (182,3; 191,1) мкм. При сравнении групп определялись статистически значимые различия ($p < 0,0001$) (рисунок 1Д). Медиана толщины эпифизарного хряща в экспериментальном суставе составляла 175,6 (170,9; 177,9) мкм, в контрольном — 162,5 (155,3; 163,7) мкм. При сравнении групп статистически значимые различия не определялись ($p < 0,0001$) (рисунок 1Е). Клеточный костный мозг в эпифизе кости определялся в 9 случаях в экспериментальных суставах и в 1 случае — в контрольных суставах. При анализе клеточности костного мозга в группах определялись статистически значимые различия ($p = 0,002$).

При проведении внутригрупповых сравнений отмечались статистически значимые различия ($p < 0,0001$) в толщине суставного хряща на 21-е сутки в экспериментальных суставах, в контрольных — статистически значимых различий не было выявлено ($p = 0,534$) (рисунок 3А). В экспериментальном суставе также отмечались статистически

значимые различия ($p < 0,0001$) в толщине эпифизарного хряща к 21-м суткам эксперимента, в контрольном — статистически значимые различия не определялись (рисунок 3Б). Клеточность костного мозга имела статистически значимые различия при внутригрупповом сравнении в экспериментальной группе суставов между 7-ми и 14-ми сутками ($p < 0,001$) и между 7-ми и 21-ми сутками ($p < 0,001$), в контрольной группе суставов к этому сроку статистически значимые различия не определялись ($p = 0,99$).

Заключение

Анализ полученных результатов нашего исследования не выявил морфологических признаков деструктивного действия ХС на суставной хрящ. Кроме того, определялось регенераторное действие хондроитина сульфата на суставной хрящ, при котором было отмечено усиление клеточности костного мозга с последующим усилением пролиферации и утолщением эпифизарного хряща зоны роста и суставного хряща.



**Рисунок 3 — Статистическая характеристика групп при внутригрупповом сравнении:
А — толщина суставного хряща; Б — толщина эпифизарного хряща**

ЛИТЕРАТУРА

- Новиков ВЮ, Долгопятова НВ, Коновалова ИН, Кучина ЮА. Полиэлектrolитный комплекс хитозана и хондроитина сульфата: формирование, физико-химические свойства. *Известия ВУЗов. Химия и Химическая Технология*. 2017;60: 60-5.
- Комарова ЕЛ, Чернова СВ, Касумова КВ, Табачная МС, Овсянникова ЛВ, Эллер КИ. Хондроитина сульфат натрия – примеси и проблемы стандартизации (обзор литературы). *Российский Биотерапевтический Журнал*. 2019;18(1):25-36.
- Белецкий АВ, Ломать АН, Борисов АВ, Мухля АМ, Ралко ЕА. Заболеваемость артрозами, потребность в эндопротезировании крупных суставов и состояние проблемы в Республике Беларусь. *ARS Medica*. 2012;4 (59):11-9.
- Чичасова НВ. Обновленные международные рекомендации 2016 г. по ведению больных остеоартрозом: фокус на хондроитин сульфат, глюкозамин и их комбинацию (препарат Терафлекс®). *Consilium Medicum*. 2017;19(9):69-76.

REFERENCES

- Novikov VU, Dolgopyatova NV, Konovalova IN, Kychina UA. Polyelectrolitnyy kompleks chitozana i chondroitina sylyfata: formirovanie, fiziko-chimicheskie svoystva. *Izvestiia VYZov. Khimiya i Chimicheskie Tekhnologii*. 2017;16.2:60-5. (in Russ.)
- Komarova EL, Chernova SV, Kasymova KV, Tabachnaya MS, Ovsyannikova LV, Eller KI. Chondroitina sylfat natriya – primesi i problem standartizacii (obzor literatury). *Rossiyskiy Bioterapevticheskii Zhurnal*. 2019;18 (1): 25-36. (in Russ.)
- Beletssky AV, Lomat LN, Borisov AV, Mychlya AM, Ralko EA. Zabolevaemost artrozami, potrebnost v endoprotezirovanii krypnuch systavov i sostoyanie problem v Respublike Belarys. *ARS Medica*. 2012;4 (59):11-9.(in Russ.)
- Chichasova NV. Obosnovanie megdunarodnykh rekomendacii 2016 po vedeniy bolnuch osteoartrozom: focys na chondroitin sulfat, glucozamin i ich kombinaciyu (preparat Teraflecs). *Consilium Medicum*. 2017;19(9):69-76. (in Russ.)

Поступила 18.05.2020
Received 18.05.2020

Принята в печать 24.09.2020
Accepted 24.09.2020

Сведения об авторах:

Николаев Владимир Иванович — к.м.н., доцент кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ, с курсом анестезиологии и реаниматологии УО «Гомельский государственный медицинский университет»; e-mail: Nikolaev.ggmu@tut.by; <https://orcid.org/0000-0001-9886-7216>

Зиновкин Дмитрий Александрович — ассистент кафедры патологической анатомии УО «Гомельский государственный медицинский университет»; <https://orcid.org/0000-0002-3808-8832>

Третьяков Александр Анатольевич — старший преподаватель кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ, с курсом анестезиологии и реаниматологии УО «Гомельский государственный медицинский университет»; <https://orcid.org/0000-0002-5732-6947>

Автор, ответственный за переписку:

Николаев Владимир Иванович — e-mail: Nikolaev.ggmu@tut.by

Information about authors:

Vladimir I. Nikolaev — Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department of Traumatology, Orthopedics and Military Field Surgery with the course of Anesthesiology and Resuscitation of the EI «Gomel State Medical University»; e-mail: Nikolaev.ggmu@tut.by; <https://orcid.org/0000-0001-9886-7216>

Dmitry A. Zinovkin — Assistant lecturer at the Department of Pathologic Anatomy of the EI «Gomel State Medical University»; <https://orcid.org/0000-0002-3808-8832>

Alexander A. Tretyakov — Senior lecturer at the Department of Traumatology, Orthopedics and Military Field Surgery with the course of Anesthesiology and Resuscitation of the EI «Gomel State Medical University»; <https://orcid.org/0000-0002-5732-6947>

Corresponding author:

Vladimir I. Nikolaev — e-mail: Nikolaev.ggmu@tut.by