

ПРИМЕНЕНИЕ МЕКСИДОЛА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ОБМЕНА КОЛЛАГЕНА И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ВНУТРИСУСТАВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ КОЛЕННОГО СУСТАВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М.И. ШУТОВА, С.А. КОЗЛОВ, А.Н. ЗАХВАТОВ

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Медицинский институт, 430005, Российская Федерация, Республика Мордовия, г. Саранск ул. Большевикская, д. 68

Аннотация. В эксперименте у 125 белых нелинейных крыс с травматическими повреждениями коленного сустава изучено влияние нестероидной противовоспалительной и внутрисуставной антиоксидантной терапии на некоторые показатели обмена коллагена в сыворотке крови и морфологические внутрисуставные изменения. С помощью гистологического и биохимического методов изучалось развитие воспалительных и деструктивно-дистрофических изменений в хрящевой ткани и синовиальной оболочке. Состояние обмена коллагена в плазме крови оценивали по содержанию свободного, пептидосвязанного и белковосвязанного оксипролина. Гистологическим методом изучали морфологию суставного хряща и синовиальной оболочки. Установлено, что при травматическом повреждении коленного сустава в эксперименте наблюдается нарушение метаболизма коллагена с преобладанием избыточного фибриллогенеза, что сопровождается увеличением содержания всех фракций оксипролина в плазме крови лабораторных животных, дезорганизацией и уплотнением коллагеновых волокон, появлением горизонтальных и вертикальных трещин, формированием фиброзного хряща. Использование в комплексном лечении внутрисуставного введения мексидола в дозе 5 мг/кг способствует значительному снижению распада коллагена и ограничению избыточного накопления коллагеновых волокон с последующим восстановлением внутренней среды сустава и уменьшением прогрессирования деструктивно-дистрофических процессов в хрящевой ткани.

Ключевые слова: оксипролин, травматическое повреждение коленного сустава, мексидол.

THE MEXIDOL APPLICATION FOR CORRECTION OF COLLAGEN METABOLISM AND MORPHOLOGICAL INTRAARTICULAR CHANGES AT TRAUMATIC KNEE INJURIES IN THE EXPERIMENT

M.I. SHUTOVA, S.A. KOZLOV, A.N. ZAHVATOV

N. P. Ogarev Mordovian State University, Medical Institute

Abstract. The effects of non-steroidal anti-inflammatory and intra articular antioxidant therapy in the experiment in 125 rats with traumatic knee injuries the on some indicators of collagen metabolism in blood serum and intra articular morphological changes are studied. By means of histological and biochemical methods the development of inflammatory and destructive and degenerative changes in the cartilage and synovium are carried out. State of collagen metabolism in blood plasma are assessed on the content of free, peptid-related and protein-related hydroxyproline. Histologically examined morphology of articular cartilage and synovium. Found that in the trauma of the knee observed experimentally metabolic disorder with a predominance of excess collagen fibrillogenesis, accompanied by an increase of the content of the hydroxyproline fractions in the blood plasma of laboratory animals, disorganization of collagen fibers and a seal, the appearance of horizontal and vertical cracks and the forming of fibrous cartilage. Use in treatment of intra articular introduction of the Mexidol at 5 mg/kg contributes to a significant reduction of collagen collapse and limit excessive accumulation of collagen fibers, followed by reduction of the internal environment of the joint and decrease the progression of destructive and degenerative processes in cartilaginous tissue.

Key words: oxyproline, traumatic knee articulation injury, the Mexidol.

Заболевания, сопровождающиеся изменениями хрящевой ткани, занимают существенное место среди патологии человека. Хрящевая ткань, как сложная композитная система, содержит хрящевые клетки, волокнистый каркас и основное вещество, представленное главным образом *протеогликанами* (ПГ), состоящими из *гликозаминогликанов* (ГАГ). В этой системе волокнистый каркас выполняет армирующую функцию, в то время как основное вещество является своеобразным наполнителем и выполняет интегрирующие и буферные функции [1, 6]. Кроме того, основное вещество ответственно за связывание и транспорт воды в ткани, а также участвует в формировании ее упруго-эластических свойств [4].

В настоящее время достоверно установлено, что в механизмах развития патологических процессов в суставах компоненты внеклеточного матрикса – протеогликаны, гликозаминогликаны, коллагеновые белки играют важнейшую роль, они участвуют в регуляции всех процессов морфогенеза – пролиферации, клеточ-

ной организации, миграции и морфогенетической гибели хондроцитов [1]. Биополимеры соединительной ткани являются мишенями для активных метаболитов кислорода, продуцируемых в основном полиморфноядерными лейкоцитами. Окисляясь свободными радикалами, коллаген, ГАГ и ПГ приобретают новые структурно-функциональные группы, такие как гидроксильные и карбонильные. Это в конечном итоге приводит к денатурации и деполимеризации указанных биополимеров. Биохимическими маркерами деградации коллагена являются свободный (СО) и *пептидносвязанный оксипролин* (ПСО), напротив, процессы биосинтеза коллагена характеризуются увеличением содержания в сыворотке крови *белковосвязанного оксипролина* (БСО) [3, 5]. Вышеуказанные биохимические показатели мы использовали для оценки развития деструктивно-дистрофических процессов в соединительнотканной структуре сустава при его травматическом повреждении в эксперименте и на фоне внутрисуставной антиоксидантной терапии.

Цель исследования – изучить влияние внутрисуставного введения мексидола на метаболизм коллагена и морфологические внутрисуставные изменения при травматических повреждениях коленного сустава в эксперименте.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проведены на 125 белых нелинейных крысах обоего пола массой 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария МГУ им. Н.П. Огарева. Животные были разделены на 5 серий. I серию составили интактные животные (15 крыс). Во II – контрольной серии, составленной из 30 крыс, в III, IV и V опытных сериях (по 25, 27 и 28 крыс) моделировали повреждение коленного сустава механическим путем. Во II контрольной серии проводилось внутрисуставное введение 0,2 мл физиологического раствора через день. Животным III серии, начиная со дня моделирования травмы, проводился курс лечения нимесулидом через зонд в среднетерапевтической дозе 2 мг/кг ежедневно в течение 10 дней. В IV серии выполнялось внутрисуставное введение антиоксиданта мексидола в дозе 5 мг/кг в 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия через день. Курс лечения составлял 5 инъекций. На животных V серии изучалось комбинированное влияние нимесулида в дозе 2 мг/кг и внутрисуставного введения мексидола в дозе 5 мг/кг по указанной выше схеме введения. Повреждение коленных суставов моделировали механическим способом в модификации Г.М. Дубровина и соавторов [2]. Под ингаляционным наркозом в асептических условиях рассекали кожу, фасцию и капсулу сустава. В полость сустава вводили иглу Дюфо, обточенную под углом 90° и ориентированную на хрящ внутреннего мыщелка бедренной кости. Ввинчивающими движениями перфорировали суставной хрящ до упора в субхондральную кость, затем иглу удаляли. Получение фрагмента суставного хряща контролировали мандреном. Швы на рану накладывали через все слои.

Исследования проводили на 3 и 28 сутки лечения. В динамике опыта животных забивали путем декапитации после предварительного внутрибрюшинного введения раствора тиопентала натрия в дозе 100 мг/кг. Экспериментальные исследования проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755), одобрены Локальным этическим комитетом медицинского института ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева».

Состояние обмена коллагена в плазме крови оценивали по содержанию свободного, пептидносвязанного и белковосвязанного оксипролина по методу П.Н. Шараева (1990) с использованием парадиметиламинобенальдегида [5]. Количество СО, ПСО и БСО выражали в микромолях на 1 литр плазмы крови (мкмоль/л). Гистологическим методом изучали морфологию суставного хряща и синовиальной оболочки. Материал фиксировали в 10% растворе формалина, после декальцинации заливали в парафин. Серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты исследования были подвергнуты вариационно-статистическому анализу по критерию достоверности t-Стьюдента с использованием программы Microsoft Excel. При проверке достоверности в наших исследованиях определялась вероятность истинности нулевой гипотезы. Критический уровень значимости при этом принимали равным 0,05. Для характеристики выборки использовали M – выборочное среднее и m – ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение. При исследовании обмена коллагена выявлено нарушение его метаболического оборота. Отмечалось значительное увеличение содержания СО и ПСО в плазме крови соответственно в 2,2 и 2 раза ($p < 0,001$, $t^2 = 17,1$) по сравнению с интактными животными. Достоверных изменений содержания БСО не выявлено. К 28-ым суткам происходило незначительное снижение содержания в крови лабораторных животных II серии СО на 9,6% ($p_1 < 0,05$, $t^2 = 9,8$) по отношению к показателю 3-их суток. Уровень ПСО и БСО к 28-ым суткам увеличился в 2,7 ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 16,4$) и 2,4 раза ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 15,2$) соответственно по сравнению с аналогичными показателями на 3-и сутки. Подобное изменение метаболитов коллагена свидетельствует о фибриллогенезе, интенсивность которого не коррелирует со степенью деградации коллагена (табл. 1).

На фоне нестероидной противовоспалительной терапии нимесулидом на 3 сутки определялась тенденция к снижению свободного оксипролина на 6% ($p_1 > 0,05$, $t^2 = 1,75$) и нарастанию содержания белковосвязанной фракции оксипролина на 1,7% ($p_1 > 0,05$, $t^2 = 1,86$) относительно показателей контрольной серии на 3 сутки. Пептидносвязанный оксипролин превышал показатель контрольной серии на 23% ($p_1 < 0,05$, $t^2 = 9,4$). На 28-ые сутки применения нимесулида уровень СО относительно данных контрольной серии в те же сроки уменьшился на 19,5% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 12,7$). Введение нестероидного противовоспалительного средства позволило ограничить рост ПСО относительно данных контрольной серии на 47,8% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 18,6$). На 28 су-

тки терапии нимесулидом значение БСО повысилось до $91,75 \pm 0,68$ мкмоль/л, что на 35,2% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 16,7$) меньше уровня контрольной серии в эти же сроки.

Таким образом, пероральное введение нимесулида на 3 сутки позволило несколько ограничить рост свободного оксипролина в плазме крови, на 28-ые сутки способствовало большему снижению СО на фоне увеличения содержания БСО. Подобные изменения фракций оксипролина свидетельствовали об уменьшении степени деструкции, однако показатели СО и ПСО, отражающие катаболические процессы основного белка соединительной ткани, превышали интактные значения в 1,7 и 2,8 раза. Увеличение содержания БСО в динамике при ускорении метаболического оборота коллагена свидетельствует об избыточном фибриллогенезе, и как следствие, чрезмерном патологическом разрастании соединительной ткани.

При внутрисуставном введении мексидола на 3-и сутки содержание СО плазмы крови снижалось на 9% ($p_1 < 0,05$, $t^2 = 2,7$) по отношению к данным контрольной серии. На 28-ые сутки наблюдения в серии с применением мексидола отмечалось более выраженное снижение фракций, отражающих деструкцию основного вещества соединительной ткани. Свободный и пептидносвязанный оксипролин при введении мексидола на 20 и 37% были ниже, чем в серии с применением нимесулида. Уровень БСО в начале эксперимента достоверно не отличался от показателя контрольной серии, на 28-ые сутки его содержание было меньше контрольных данных на 43% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 19,2$).

Комбинированное применение нимесулида и мексидола оказывало наиболее выраженный эффект: на 3-и сутки наблюдалось достоверное снижение показателя деструкции коллагена – СО на 17,5% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 6,5$) относительно 3-их суток контроля и происходил рост БСО на 17% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 7,8$), отражающего анаболические процессы в обмене коллагена. Содержание ПСО достоверно не изменялось. На 28-ые сутки эксперимента отмечалось дальнейшее снижение свободного оксипролина на 44,2% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 22,6$), ПСО на 75% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 27,8$), БСО на 53,6% ($p_1 < 0,001$, $t^2 = 22,2$) соответственно относительно контрольной серии в соответствующие сроки.

Таблица 1

Динамика изменения некоторых показателей обмена коллагена при травматическом повреждении коленного сустава в эксперименте на фоне внутрисуставного введения мексидола и нестероидной противовоспалительной терапии ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные (n=15)	Контрольная серия (n=30)		НПВС (n=25)		В/С мексидол (n=27)		НПВС+ В/с введение мексидола (n=28)	
		3 сутки	28 сутки	3 сутки	28 сутки	3 сутки	28 сутки	3 сутки	28 сутки
СО, мкмоль/л	13,7±0,51	31,31±0,19*	28,31±0,24*	29,52±0,27	22,51±0,39"	28,2±0,21	18,12±0,17"	25,83±0,19	15,85±0,34"
ПСО, мкмоль/л	7,4±0,37	14,54±0,31*	39,32±0,49*	17,92±0,18	20,53±0,22"	16,63±0,31	12,86±0,3"	15,81±0,32	9,73±0,24"
БСО, мкмоль/л	51,2±4,32	52,73±1,14*	123,98±1,7*	53,64±0,24	91,75±0,68"	55,32±0,56	71,14±0,42"	61,12±0,63	57,27±0,67"

Примечание: * – достоверность к данным интактных животных, $p < 0,001$;
 " – достоверность к данным контрольной серии на соответствующие сутки, $p_1 < 0,001$.

Таким образом, при травматическом повреждении коленного сустава в эксперименте наблюдается дисбаланс в обмене коллагена в виде повышения СО и ПСО, являющихся продуктами деградации биополимеров соединительной ткани, и одновременного массивного накопления в сыворотке крови БСО, ПСО, отражающих процессы фибриллогенеза. Подобное изменение фракций оксипролина свидетельствует о прогрессировании деструктивных процессов в соединительной ткани, на фоне усиления интенсивности метаболического оборота коллагена с преобладанием его синтеза.

Внутрисуставное введение мексидола препятствует свободнорадикальной деструкции коллагена и протеогликанов, что проявляется снижением уровня СО и ПСО в сыворотке крови. Антиоксидантная терапия способствует также активации процессов биосинтеза коллагена и репарации хряща, о чем свидетельствует повышение концентрации БСО сыворотки. Нестероидная противовоспалительная терапия в некоторой степени также препятствует деградации биополимеров соединительной ткани сустава, однако, не способствует регенерации хряща, о чем свидетельствует низкий уровень БСО сыворотки на поздних стадиях экспериментального посттравматического артрита.

При морфологическом исследовании выявлены следующие изменения.

У интактных животных при микроскопическом исследовании гиалинового хряща коленного сустава были определены структурные зоны, аналогичные гиалиновому хрящу коленного сустава человека: поверх-

ностная, средняя и глубокая. В поверхностной зоне гиалинового хряща хондроциты располагались преимущественно поодиночке и имели форму от вертикально вытянутой до округлой.

На третьи сутки после моделирования посттравматического артрита при гистологическом исследовании выявлено, что экспериментально созданный дефект распространялся на всю толщу хряща и проникал в субхондральную кость. Дно дефекта заполнено тканевым детритом с массивным скоплением клеточных элементов. Вне зоны повреждения обнаруживались признаки отека хряща в виде его утолщения и участков разволокнения поверхностной зоны. Зональная структура хряща сохранена. Одновременно с дезорганизацией поверхностного слоя хрящевой ткани нарастали воспалительные изменения в синовиальной оболочке. Отмечался отек синовиальной оболочки и резко выраженная инфильтрация ее полиморфно-ядерными нейтрофилами и лимфоцитами.

На 28-ые сутки в контрольной серии морфологическое исследование выявило стертость зональности хрящевой ткани в перифокальной области, глубокие узур, доходящие до середины глубокой зоны. В промежуточной зоне определялись лакуны, содержащие 1-3 хондроцита и скопления из 4-6 клеток. Матрикс промежуточной зоны был слабо эозинофильным, волокнистым. Глубокая зона представлена небольшими участками, в которых наряду с колончатым расположением хондроцитов встречались клоны из 4-6 клеток. В поверхностном и среднем слое происходило развитие фибриллярности с дезорганизацией и уплотнением коллагеновых волокон, появлением горизонтальных и вертикальных трещин, формированием фиброзного хряща на поверхности (рис. 1).

На 3-и сутки в препаратах коленного сустава крыс, получавших как нимесулид, так и мексидол, наблюдались гистологические изменения, схожие с контролем. К концу эксперимента в серии с применением нимесулида при гистологическом исследовании наблюдалось заполнение области дефекта фиброзной тканью. В покровном хряще выявлялись дегенеративные изменения в виде очаговой узурации поверхностной зоны, наличия бесклеточных участков и уменьшения количества хондроцитов с дистрофией части из них. Зональное деление просматривалось не четко. В промежуточном и глубоком слоях имелось расслоение матрикса, появление скоплений хондроцитов, у большинства из которых были разрушающиеся ядра.

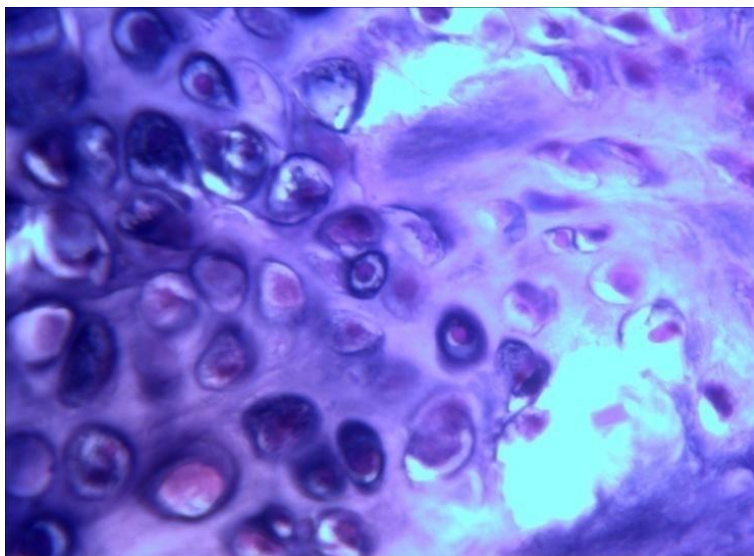


Рис. 1. Микрофотограмма суставного хряща, контрольная серия, 28-ые сутки. Ув. 10×40.
Окраска гематоксилином и эозином

К концу эксперимента в микропрепаратах коленного сустава в зоне дефекта находилась незрелая грануляционная ткань, в перифокальной области явлений хондролита и остеолита не было. Наблюдалось поражение поверхностной зоны в виде участков отека и разволокнения межклеточного матрикса, встречались безъядерные хондроциты и скопления клеток в количестве 1-2 с признаками дистрофии. Трещин в поверхностном слое не определялось. Средняя и глубокая зоны сохранены, определялось типичное лакунарное расположение хондроцитов и характерная вертикальная столбчатость.

Таким образом, применение нестероидной противовоспалительной терапии уменьшало распространение деструктивных процессов, ограничив их средней зоной хряща. В отличие от контрольной серии, у животных, получавших нимесулид, в глубоком слое хряща имелись только дистрофические изменения, а признаков деструкции, таких как узурация, трещины, не обнаруживалось. Внутрисуставное введение мексидола в большей степени, чем нимесулид, оказало защитное действие на суставной хрящ – у животных на протяжении всего срока эксперимента распространения патологического процесса не произошло глубже поверхностного слоя, однако полной редукции дистрофических изменений к концу эксперимента не происходило.

Состояние суставного хряща животных на фоне комбинированной антиоксидантной и нестероидной

противовоспалительной терапии на 3-и сутки не отличались от описанных в контрольной серии. Воспалительные изменения в синовиальной оболочке были менее выражены, чем в контрольной серии. Инфильтративные изменения носили очаговый характер, степень инфильтрации свободными клеточными элементами оценивалась как умеренная.

На 28-ые сутки микроскопически наблюдалось разрастание зрелой грануляционной ткани, и проникновение ее в толщу основного вещества хряща из субхондрального пространства. В грануляционной ткани отмечено появление клеток различной степени зрелости: недифференцированные округлые клетки, малодифференцированные хондробласты и типичные хондроциты. Матрикс в регенерате развит слабо. Такая ткань, отграничивая регенерирующую субхондральную кость от суставной полости, видимо, исполняет роль суставного покрытия. В перифокальном хряще четко просматриваются глубокая, промежуточная и поверхностная зоны. В отличие от интактных животных в поверхностной зоне частой находкой являются 1-2 клеточные лакуны, а в средней и глубокой зонах встречаются скопления хондроцитов из 2-8 клеток (рис. 2).

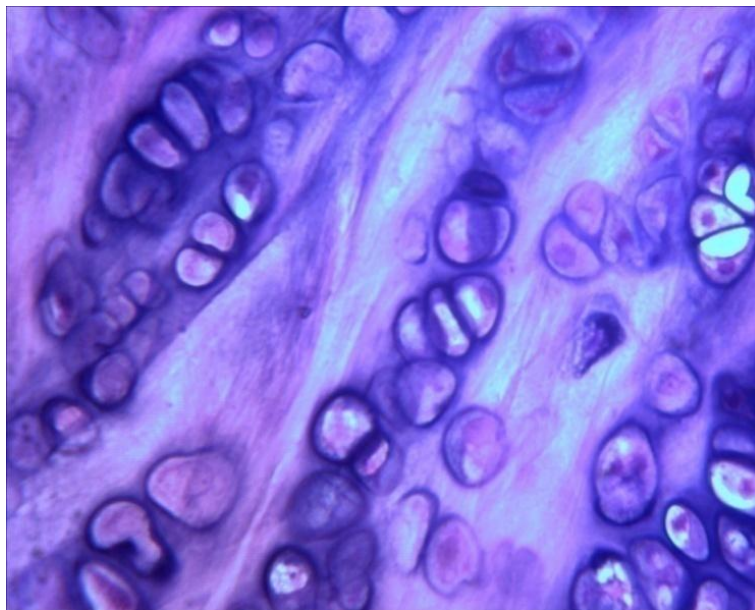


Рис. 2. Микрофотограмма суставного хряща, опытная серия, 28 суток. Ув. 10×40.
Окраска гематоксилином и эозином

Следовательно, применение антиоксиданта мексидола на фоне нестероидной противовоспалительной терапии нимесулидом на 3-и сутки способствовало уменьшению выраженности воспалительных изменений в синовиальной оболочке. К концу эксперимента произошло восстановление дефектной зоны грануляционной тканью с появлением в ней элементов хондронной ткани. Хрящ вне зоны поражения и синовиальная оболочка существенно не отличались от интактных. Следовательно, комбинированное применение нимесулида и мексидола позволяет купировать посттравматическое асептическое воспаление в суставе и предотвратить развитие деструктивно-дистрофических изменений.

Полученные результаты показывают обоснованность внутрисуставной антиоксидантной терапии, позволяющей в ранние сроки купировать воспалительный процесс в поврежденном суставе, стимулировать заживление травматического дефекта и, следовательно, предотвратить развитие деструктивно-дистрофического процесса в тканях сустава.

Выводы:

1. При травматическом повреждении коленного сустава в эксперименте наблюдается нарушение метаболического оборота коллагена с преобладанием его синтеза на фоне продолжающейся деструкции, приводя к развитию деструктивно-дистрофических изменений.
2. Использование в комплексном лечении внутрисуставного введения мексидола в дозе 5 мг/кг в эксперименте корректирует обменные процессы соединительной ткани и уменьшает прогрессирование посттравматического артрозо-артрита.

Литература

1. Виноградова, Е.В. Морфофункциональная характеристика хондроцитов / Е.В. Виноградова, И.Н. Михайлов // Физиология и патология соединительной ткани.– 1980.– Т 1.– С. 133–135.
2. Дубровин, Г.М. Обоснование применения миелопида для профилактики посттравматического остеоартроза (экспериментальное исследование) / Г.М. Дубровин, Ю.А. Блинков, С.В. Нетяга, А.А. Нетяга //

Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова.– 2005.– № 2.– С. 60–62.

3. *Насонов, Е. Л.* Нестероидные противовоспалительные препараты в ревматологии / Е.Л. Насонов // Лечащий врач.– 2006.– № 2.– С. 34–39.

4. *Павлова, В.Н.* Синовиальная среда суставов / В.Н. Павлова.– М.: Медицина.– 1980.– С. 246–270.

5. *Шараев, П.Н.* Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови / П.Н. Шараев // Лабораторное дело.– 1990.– № 5.– С.283–285.

6. *Bekkers, J.E.* Diagnostic modalities for diseased articular cartilage – from defect to degeneration a review / J.E. Bekkers, L. Creemers, W.J Dhert // Cartilage.– 2010.– Vol. 1.– P. 157–164.