

ТКАНЕВАЯ И КЛЕТОЧНАЯ РЕАКЦИЯ СИНОВИАЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ВНУТРИСУСТАВНОЕ ВВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРНОГО ВИСКОПРОТЕЗА «НОЛТРЕКС» В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

А.Б. Шехтер¹, В.В. Зар², В.П. Волошин², В.В. Лопатин³

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

²ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ)

³ЗАО Научный центр «Биоформ», Москва

Изучена реакция синовиальной оболочки и хряща 20 кроликов на введение 1 мл полимерного геля «Нолтрекс» в полость скакательного сустава. Сделан вывод о биологической инертности и безопасности нолтрекса при его введении в полость сустава.

Ключевые слова: остеоартрит, остеоартроз, синовиальная жидкость, полиакриламидный гель, нолтрекс.

TISSUE AND CELL REACTION OF THE SYNOVIAL MEDIA TO INTRAARTICULAR INJECTION OF POLYMER VISCOPROSTHESIS "NOLTREX" IN EXPERIMENTAL CONDITIONS

A.B. Shekhter¹, V.V. Zar², V.P. Voloshin², V.V. Lopatin³

¹The First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov

²M.F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI)

³Research Center "Bioform", Close corporation, Moscow

Reaction of synovial membrane and cartilage on 1 ml of polymer gel «NOLTREX» injected into the cavity of jumping joint of 20 rabbits was investigated. Biological inertness and safety of noltrex injected into the joint cavity was established.

Key words: osteoarthritis, osteoarthrosis, synovial fluid, polyacrylamide gel, noltrex.

ВВЕДЕНИЕ

В структуре ортопедических заболеваний остеоартрит занимает лидирующие позиции. Считается, что к 60-летнему возрасту 1/2 популяции страдает дегенеративно-дистрофическими заболеваниями крупных суставов [1, 5, 6, 9]. Среди неоперативных или малоинвазивных методик лечения остеоартрита можно выделить основные: введение в сустав биополимера – солей гиалуроновой кислоты, пероральное или парентеральное применение глюкозамина или хондроитин сульфата и артроскопический дебридмент.

Обоснованием для применения полимера гиалуроновой кислоты послужила теория вискоапплементации [7]. Доказан факт уменьшения вязкости синовиальной жидкости и плотности гиалинового хряща у пациентов с остеоартритом в результате деполимеризации гиалуронана и его дефектного синтеза синовиоцитами [8]. Логичным является предложение о введении в полость инертного вещества неболо-

гического происхождения, не подвергающегося разрушению гиалуронидазой. Таким материалом может являться вязкий полиакриламидный гель (ПААГ), обладающий способностью к набуханию [3]. Такой гель был разработан в 2001 г. и выпускается под торговой маркой «Нолтрекс». В физических опытах была доказана идентичность вязкостных характеристик геля и естественных свойств синовиальной жидкости здорового организма [4]. Теоретически при взаимодействии с синовиальной жидкостью гель способен улучшить её физические характеристики, не подвергаясь разрушению со стороны ферментов синовиальной среды.

Целью работы явилось изучение реакции тканей скакательного сустава экспериментальных животных на инъекционное введение нолтрекса, применяемого в ортопедии для замещения вязкостных свойств синовиальной жидкости суставов у пациентов с остеоартрозом [2].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 20 беспородных кроликах-самцах с массой тела 3-4 кг. Животных содержали в стандартных условиях вивария на стандартном рационе, все манипуляции производили в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации. В полость правого скакательного сустава вводили 1,0 мл геля «Нолтрекс», левый служил контролем. Объем полости коленного сустава человека в 100-150 раз больше аналогичного сустава кролика, поэтому доза геля у животного превышала предполагаемую дозу у человека (2,5 мл) в 40-60 раз.

После введения в наркоз (5% кетамина гидрохлорид в дозе 50 мг/кг) пунктировали сустав иглой 23G в углу, образованном наружным отделом суставной щели и собственной связкой надколенника. В полость сустава вводили нолтрекс шприцем из упаковки. Выведение из опыта путём передозировки тиопентала натрия и дроперидола проводили через 1, 3, 7, 14 суток, 1, 2, 3, 6, 14 месяцев после инъекции материала. На протяжении опыта регистрировали общее состояние, поведение, массу тела, ректальную температуру. Для цитологического исследования делали мазки содержимого суставной полости (геля и синовиальной жидкости). Мазки фиксировали в метаноле, окрашивали по Романовскому-Гимзе, вычисляли соотношение клеток. Ткани для гистологического и гистохимического исследования фиксировали в 70% этаноле, заливали в парафин; срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином, толуидиновым синим, проводили PAS-реакцию и реакцию Браше на РНК. Контролем являлись ткани контралатерального сустава.

Абсорбционная способность образцов исходного ПААГ и геля, на 6-й месяц извлечённого из сустава, исследована на спектрометре ИК-Фурье Magna-IR 750 (Nicolet, США) со спектральным разрешением 2 см^{-1} в области волнового числа $4000 \div 400 \text{ см}^{-1}$. Образцы наносили на пластинку KBr и подсушивали для уменьшения содержания воды с целью исключения помех водного спектра. Полученные кривые спектров сопоставляли между собой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Макроскопическое изучение. В первые сутки суставная полость содержала прозрачную субстанцию, в которой гель и синовиальная жидкость представляли единый субстрат. Вязкость субстанции была выше, чем у синовиальной жидкости в контрольном суставе, и схожа с вязкостью интактного геля. Синовиальная оболочка имела обычную структуру, без воспалительных признаков, хрящевая пластинка не изменена. Че-

рез 7-14 и 30 суток количество геля уменьшалось, вязкость субстанции снижалась. Синовиальная оболочка и хрящ также не имели признаков патологических изменений.

Цитологическое исследование внутрисуставной среды. Через сутки в мазке из опытного сустава гель имел вид гомогенной метакроматично окрашенной толуидиновым синим массы на малом увеличении и мелкозернистой – на большом, что говорит о возможном образовании комплекса между гелем и синовиальной жидкостью, т.к. отдельно они не выявляются. Общее число клеток значительно выше, чем в контроле (в среднем 16,6 в поле зрения против 2,5 в контроле). Преобладал фагоцитирующий гель клетки (76,3% от общего количества) с вакуолями и мелкими включениями геля в цитоплазме. В клеточной резорбции геля участвовали выселяющиеся из крови макрофаги и имеющие макрофагальное происхождение менее крупные синовиоциты типа А. Выявлялись нефагоцитирующие синовиоциты, макрофаги моноцитидного типа без активного фагоцитоза и лимфоциты. Нейтрофильных лейкоцитов в абсолютном и процентном отношении было больше, чем в контроле, но не выше 3,3%, что говорит об отсутствии значимого воспалительного процесса (рис. 1).

На третьи сутки гель морфологически не менялся. Общее количество клеток незначительно увеличилось и составило 18,4 в поле зрения. Подавляющее большинство элементов (85,8%, из них 74,2 – фагоцитирующие синовиоциты, 11,6 – макрофаги) представляли собой фагоцитирующие клетки округлой или овальной формы с округлыми ядрами и большим ободком цитоплазмы с многочисленными вакуолями; клетки были в 1,5-2 раза крупнее синовиоцитов в контроле (рис. 2,а). Меньше становилось нефагоцитирующих синовиоцитов и неактивных моноцитидных макрофагов. Содержание лимфоцитов и нейтрофилов менялось мало – воспалительный процесс не усиливался.

На 7-е сутки в мазке элементы геля имели гомогенную структуру с очагами вакуолизации и фибриллизации (начало лизиса геля). Общее количество клеточных элементов вдвое уменьшилось (8,5 в поле зрения, 62,3% из них – фагоцитирующие синовиоциты и макрофаги). Постепенно нормализовался клеточный состав (см. рис. 1). На 14-е сутки увеличились области, где гель мелко вакуолизирован, встречались крупные вакуоли. Возрастало количество активных макрофагальных клеток (12,2%), отличных от фагоцитирующих синовиоцитов (58,1%). Отмечены единичные клетки с вытянутой цитоплазмой, похожие на фибробласты (рис. 2,б).

Через месяц общее количество клеток снизилось до 5,4 в поле зрения. Большинство их являлось обычными синовиоцитами (51,2%), что говорило о дальнейшей нормализации внутрисуставной среды.

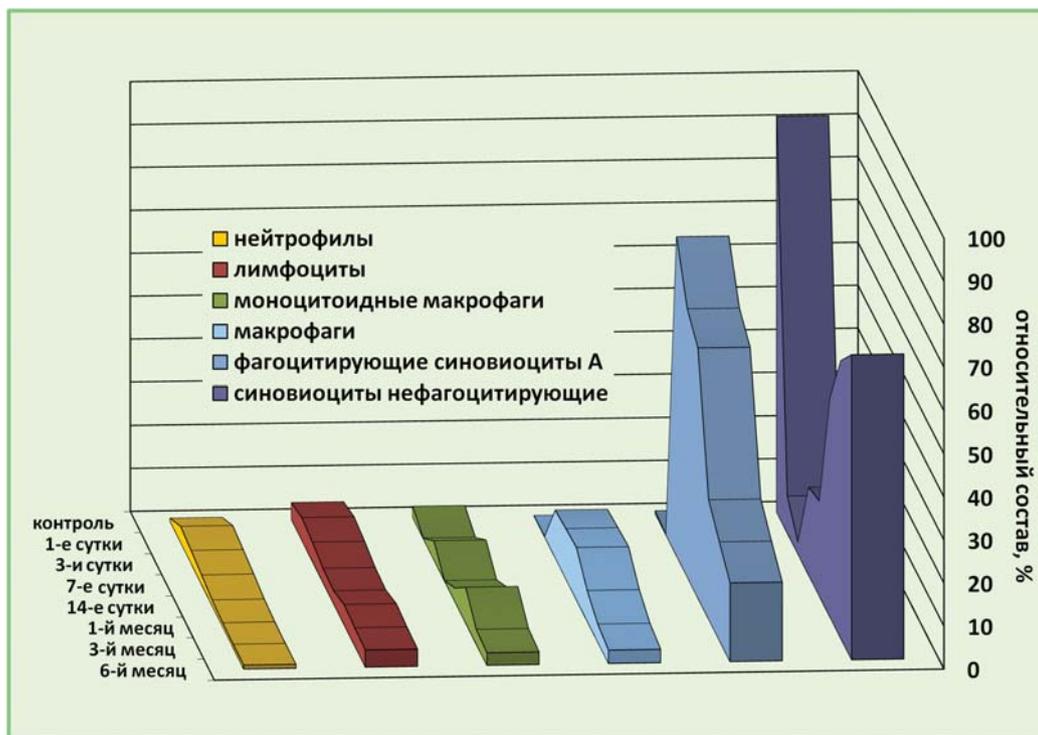


Рис. 1. Диаграмма клеточного состава синовиальной жидкости контрольного и опытного суставов в динамике

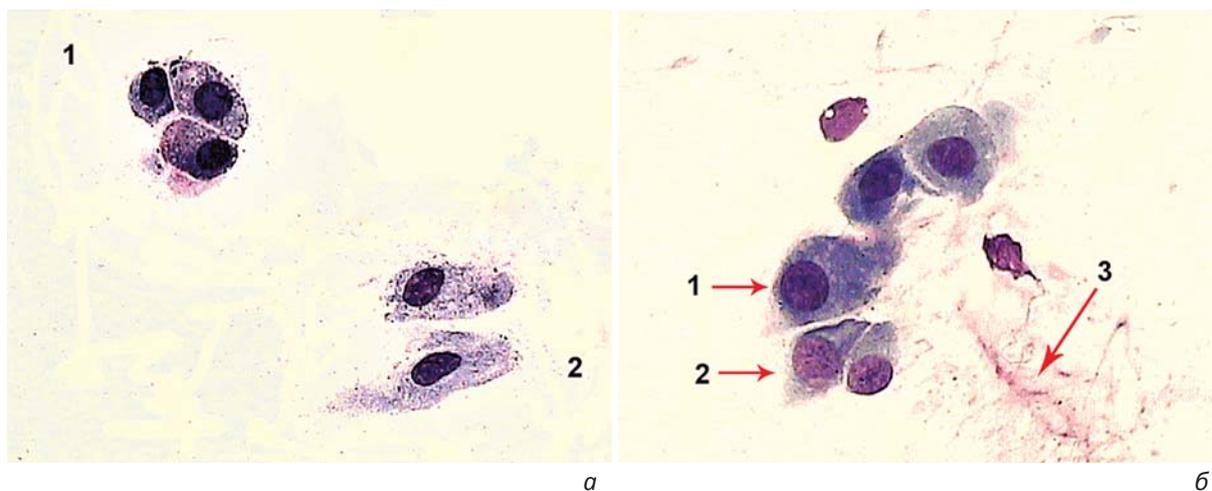


Рис. 2. Цитограмма синовиальной жидкости: а – третьи сутки: клетки, фагоцитирующие гель – синовиоциты А (1) и крупные макрофаги (2); б – 14-е сутки: крупные макрофагальные клетки (1), активные и неактивные синовиоциты (2), остатки вакуолизированного геля (3). Окраска по Романовскому–Гимзе. $\times 900$

Нейтрофилы составляли всего 0,9%, что сопоставимо с контролем (0,7%); нормализовалось содержание лимфоцитов, снизилось число фагоцитирующих синовиоцитов (27,8%) и макрофагов (7,1%). Через 3-6 месяцев клеточный состав приближался к контролю (см. рис. 1).

Таким образом, через 1-3 суток гель сохранял гомогенность, с 7-х суток в нём начинался частичный лизис, который усиливался к 14-м суткам и завершился к 3-6-му месяцу. Экстраполируя данные эксперимента, можно сделать вывод, что в условиях человеческого

организма лизис, скорее всего, будет завершаться в сроки от 7 до 21 месяца (метаболизм организма кроликов значительно выше).

Гистологическое и гистохимическое исследование синовиальной оболочки и суставного хряща. Через 1-3 суток в синовиальной оболочке не было заметного воспаления, тканевая реакция состояла из очаговой гиперплазии синовиоцитов (за счёт А-клеток). На 3-7-е сутки у части животных формировались небольшие очаги утолщения кроющего слоя синовиоцитов

(рис. 3,а), в них происходила резорбция геля без усиления воспалительной реакции. Отсутствовала заметная сосудистая реакция, в синовиоцитах была увеличена зернистость PAS+ и содержание РНК, что говорило об усилении фагоцитарной и биосинтетической активности клеток (рис. 3,а). Суставной хрящ практически не изменён в сравнении с контролем, не наблюдалась дистрофия клеток и матрикса, содержание гликозаминогликанов – высокое. На 14-30-е сутки воспалительные явления не проявлялись, очаги гиперплазии синовиоцитов оставались у отдельных животных, структура синовиальной оболочки в основном приближалась к норме (рис. 3,б). Хрящевая ткань, как и ранее, по сравнению с контролем не имела изменений (рис. 3,в,г).

К третьему месяцу в большинстве случаев структура синовиальной оболочки полностью приходила в норму. Через 14 месяцев изменений в оболочке по сравнению с контролем не выявляли. Гистохимическое исследование не показало отличий от контроля в содержании РНК и синтезе кислых гликозаминогликанов в синовиоцитах, что говорило о сохранности

их синтетической функции. Суставной хрящ в опыте по структурным и гистохимическим особенностям не имел отличий от контроля. Питание хрящевой ткани частично осуществляется через диффузию веществ из синовиальной жидкости, поэтому отсутствие дистрофических изменений показывало, что введение геля в сустав не отражалось на метаболизме тканей.

Инфракрасная спектроскопия исходного и удалённого из сустава геля. На рис. 4 приведены ИК-спектры исходного и использованного геля, сопоставление которых позволяет увидеть дифференцирующие признаки в волновой области $1700 \div 1500 \text{ см}^{-1}$, т.е. полос колебаний амидной группы «Амид I» и «Амид II». Полоса «Амид I» в спектрах первичных и вторичных амидов лежит в области $1690 \div 1600$ и $1570 \div 1515 \text{ см}^{-1}$. После нахождения в организме в спектре геля уменьшилась по интенсивности полоса 1607 см^{-1} и выросла полоса 1542 см^{-1} , что объясняет переход первичных амидов в полимерной цепи во вторичные. Данный факт доказывает образование комплекса полимерной структуры ПААГ с синовиальной жидкостью.

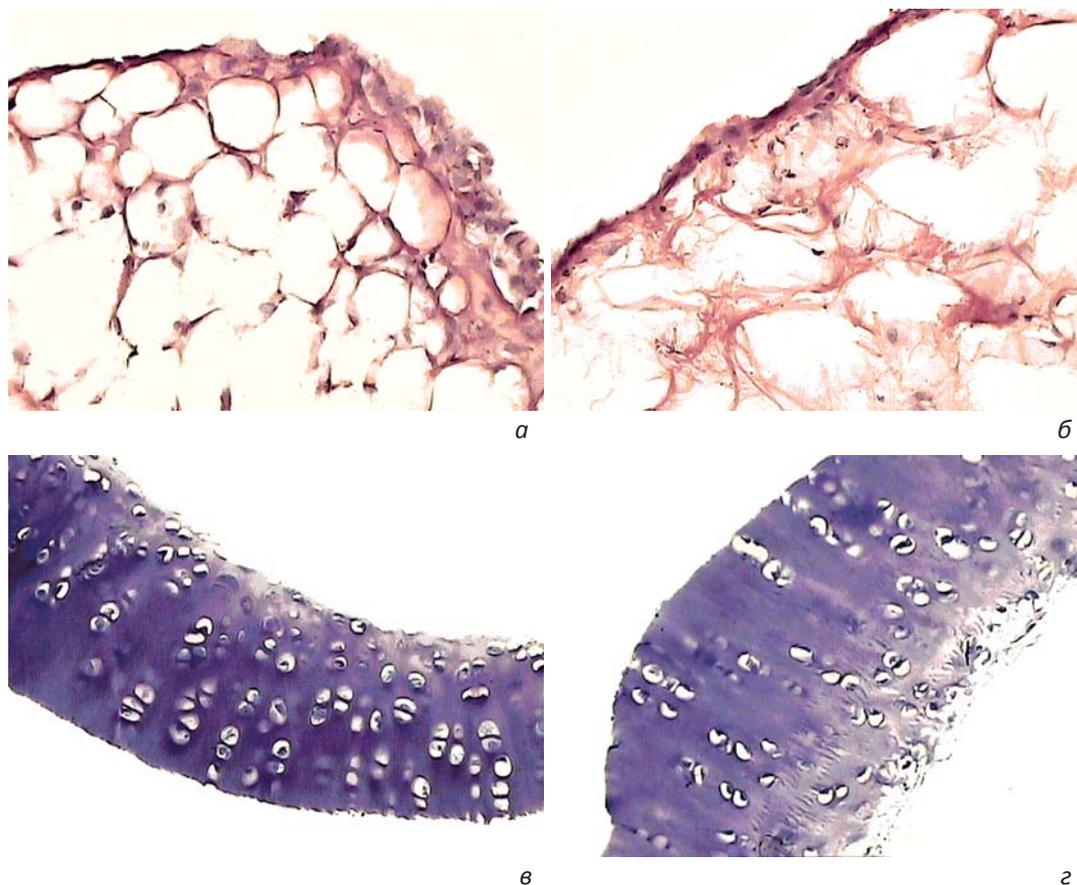


Рис. 3. Гистологическая картина синовиальной оболочки и хрящевой ткани суставов: а – третьи сутки: локальное утолщение слоёв синовиоцитов за счёт пролиферации клеток, увеличение количества макрофагальных А-клеток; б – 30-е сутки: одно-двухрядный слой синовиоцитов, синовиальная оболочка без изменений; в – суставной хрящ в опыте: высокое содержание гликозаминогликанов в межклеточном матриксе, дистрофия хондроцитов, хондробластов и матрикса отсутствует, отличий от контроля нет; г – контроль: интактный хрящ. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

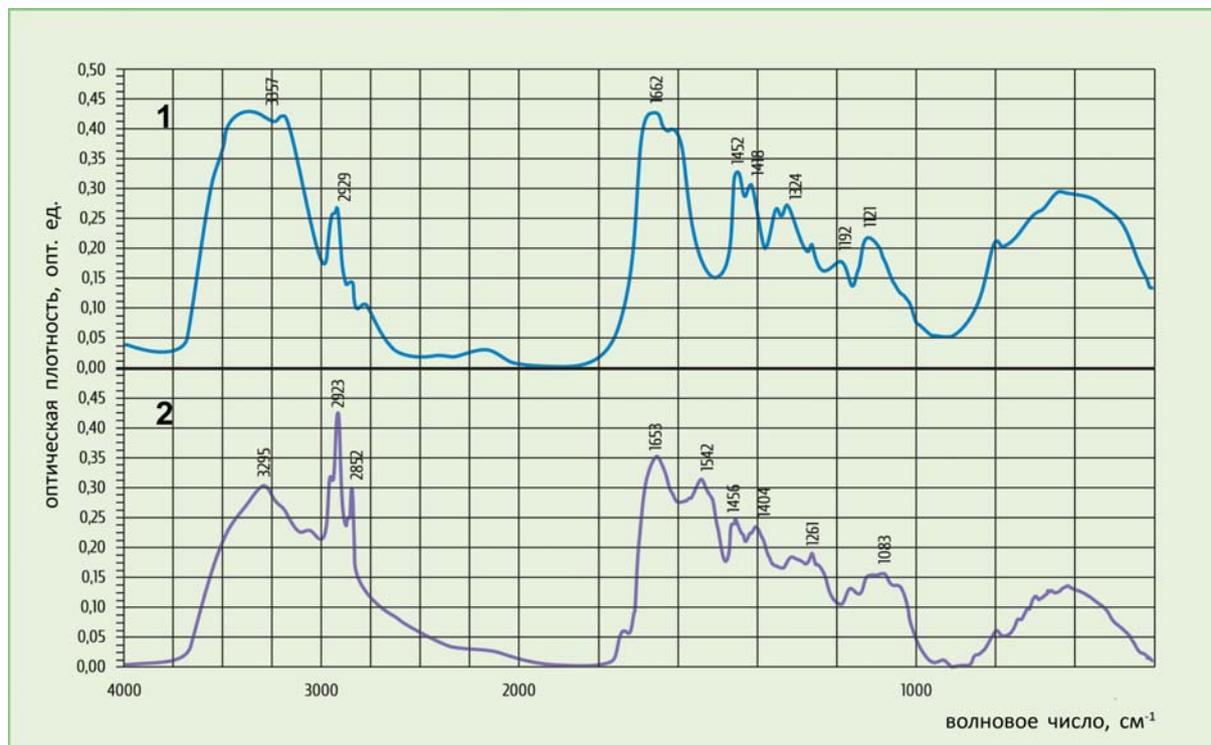


Рис. 4. ИК-спектроскопия исходного геля (1) и образца, извлечённого из сустава (2)

ВЫВОДЫ

1. Внутрисуставное введение геля «Нолтрекс» не приводит к развитию воспаления синовиальной оболочки и дистрофии хрящевой ткани.

2. Тканевая реакция на введение геля в сустав минимальна и состоит из очаговой гиперплазии синовиоцитов и выселения в суставную полость макрофагов и фагоцитирующих синовиоцитов типа А, которые постепенно резорбируют гель.

3. Гель образует с синовиальной жидкостью комплексное соединение, не ухудшающее метаболизм суставных тканей. При этом нолтрекс является матрицей, способной удерживать синовиальную оболочку в суставной сумке.

4. Получены доказательства тканевой совместимости и безопасности полиакриламидного геля «Нолтрекс» при его инъекционном введении в полость сустава.

5. Медленная резорбция геля ставит его в выгодное положение по сравнению с быстроэлиминирующимися препаратами солей гиалуроновой кислоты и объясняет преимущества применения ПААГ в инъекционном лечении пациентов с остеоартрозом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балабанова Р.М., Эрдес Ш.Ф. Динамика распространенности ревматических заболеваний, входящих в VIII класс

МКБ-10, в популяции взрослого населения РФ за 2000-2010 гг. // Науч.-практ. ревматол. 2012. №3. С.10-12.

2. Зар В.В., Волошин В.П., Мартынов М.Д. Функциональная оценка результатов внутрисуставного введения полиакриламидного геля «Нолтрекс» при лечении пациентов с гонартрозом // Альманах клин. мед. 2012. №27. С.18-27.
3. Лопатин В.В. и др. Набухание полиакриламидных гелей медицинского назначения // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2005. №7. С.1187-1195.
4. Лопатин В.В., Белоненко В.Н., Зар В.В., Аскадский А.А. Сравнительное исследование механического поведения суставной жидкости человека и полиакриламидных гидрогелей в зависимости от давления // Пласт. массы. 2004. №7. С.24-29.
5. Маколкин В.И. и др. Коксартроз – вопросы этиологии, эпидемиологии, клинических проявлений и новых подходов к лечению // Тер. арх. 2007. №1. С.81-85.
6. Хитров Н.А. Структура заболеваемости остеоартрозом и проблема наличия сопутствующих заболеваний // Тер. арх. 2005. №12. С.59-64.
7. Balazs E.A., Denlinger J.L. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis // J. Rheumatol. 1993. V.39. Suppl. P.3-9.
8. Holmes M.W.A. et al. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size // Biochemical J. 1988. V.250. P.435-441.
9. Pereira D. et al. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review // Osteoarth. Cartilage. 2011. V.19, No.11. P.1270-1285.