

Оригинальное исследование

Клиническая и гистологическая оценка полиакриламидного геля в здоровых пястно-фаланговых/плюснефаланговых суставах у лошадей

Scott R. McClure^{a,*}, Michael Yaeger^b, Chong Wang^{c, d, e}

- A. Отдел ветеринарных клинических наук, Колледж Ветеринарной Медицины, Университет Штата Айова, Эймс, ИА
- B. Отдел ветеринарной патологии, Колледж Ветеринарной Медицины, Университет Штата Айова, Эймс, ИА
- C. Отдел ветеринарной диагностики, Колледж Ветеринарной Медицины, Университет Штата Айова, Эймс, ИА
- D. Отдел медицины продуктивных животных, Колледж Ветеринарной Медицины, Университет Штата Айова, Эймс, ИА
- E. Отдел статистики, Колледж Ветеринарной Медицины, Университет Штата Айова, Эймс, ИА

Ключевые слова: лошади, полиакриламид, гистологическая оценка

Резюме

Полиакриламидный гидрогель (РАНГ) разрабатывают для лечения остеоартрита у лошадей. До применения на суставах, пораженных остеоартритом, показана оценка РАНГ на здоровых суставах. Цели этого исследования заключали в оценке клинических, цитологических и метаболических эффектов РАНГ в здоровых суставах надкопытья. Это контролируемое исследование *in vivo* с использованием шести лошадей, с каждым из четырех надкопытцев, которые были распределены для обследования через 7, 28, 56 дней или в контрольную группу только для пункции сустава. Синовиальную жидкость брали до введения 2,5 мл 4% РАНГ и вновь по завершению исследования для проведения макроскопической, цитологической оценки и оценки хрящевого метаболизма. Проведение исследования включало макроскопическое и гистологическое обследование хряща и синовиальной оболочки. Отмечалось небольшое, но достоверное ($P = .0242$) увеличение числа клеток в синовиальной жидкости через 7 дней. Наблюдались существенные изменения гистологических показателей синовиальной оболочки ($P = .0277$) в результате гипертрофии синовиоцитов. Биомаркеры указали на небольшое повышение хрящевого метаболизма через 7 дней после введения РАНГ. РАНГ был видимым на поверхности синовиальной оболочки через 7 дней, и присутствие РАНГ отмечалось в интерстициальном пространстве синовиальной оболочки и внутри клеток через 28 и 56 дней. Данные этого исследования предоставляют информацию относительно переносимости и предрасположенности к действию внутрисуставной инъекции РАНГ в здоровом суставе надкопытья в ходе 56-дневного исследования. Не отмечалось значимых или стойких вредоносных эффектов от применения РАНГ на здоровые суставы.

1. Введение

Прогрессирующий характер и частота возникновения дегенеративного заболевания суставов у всех особей является стимулом для проведения исследований по методам лечения остеоартрита. У лошадей, в тех случаях, когда хромота и дегенеративное заболевание суставов являлись основной причиной потери в дни работы, наблюдается стабильное прогрессивное развитие лечения [1,2]. В настоящее время интерес для исследования представляет разработка инертных вязко-эластичных материалов для внутрисуставной терапии [3–9]. Полиакриламидные гели (РАНГs) являются

нетоксичными и неиммуногенными полимерами с большим числом изменений гидроксильной боковой цепи, что придает ей гидрофильность [10]. Полиакриламидный гидрогель обладает динамической вязкостью, аналогично обычной синовиальной жидкости, и образует стабильный полимер в суставе [11]. Полиакриламидный гидрогель одобрен для медицинского применения в России (Е-30-00,624-12), имеет международный сертификат (CZ-197/2013) и используется для лечения остеоартрита у человека. Клинические исследования указали на значимое улучшение клинических показателей как минимум на протяжении 24 недель, и улучшение по сравнению с исходными значениями наблюдалось в течение года [4–6]. После нескольких сотен внутрисуставных введений продукта человеку, упоминаемых в этих исследованиях [4–6] было зарегистрировано лишь несколько незначимых осложнений, включая жгущую боль после инъекции и суставной выпот.

На данный момент существует ограниченный объем информации о применении внутрисуставного РАНГ в ветеринарной медицине. В козлиной модели остеоартрита коленных суставов авторы показали, что три из четырех леченых козлов были здоровы, тогда как двое нелеченых козла из контрольной группы оставались хромыми через четыре месяца после введения РАНГ [7]. В проспективном исследовании на лошадях с остеоартритом запястья и надкопытья 70% лошадей были здоровыми через 6 месяцев после инъекции РАНГ [8]. Аналогичным образом, 8 из 12 лошадей с остеоартритом проксимального межфалангового сустава, которые так и не ответили на более традиционные виды лечения, были здоровыми через 6 месяцев после введения однократной дозы РАНГ [9]. Доступны данные гистологического обследования семи лошадей с диагнозом остеоартрита рогового башмака копыта, надкопытья и запястных суставов, которые получали лечение РАНГ [3]. В этом исследовании было выявлено, что за 24-месячный период РАНГ встраивался в синовиальную оболочку в сеть мелких волокон и нескольких воспалительных клеток. В настоящее время не имеется информации о том, как РАНГ влияет на здоровый сустав лошади. Цели этого исследования заключались в оценке клинических, гистологических и суставных метаболических эффектов геля РАНГ в здоровых суставах надкопытья.

2. Материалы и методы

В исследование были включены шесть лошадей-скакунов, включая трех лошадей в возрасте 3 лет, двух лошадей в возрасте 4 лет и одной 5-летней лошади (медиана 3,5 лет), с одним кастрированным самцом и пятью самками со средним весом 412,5 кг (диапазон: 359–4318 кг). Все лошади были здоровыми, 0/5 балла по шкале оценки хромоты AAEP [12] на основании клинической оценки и тестов на сгибание. Все лошади имели здоровые пястно-фаланговых и плюснефаланговые суставы по данным рентгенологического обследования. Лошадей размещали в стойлах по 3,5 x 3,5 метра и выводили на огороженные участки из известняка 9 x 18 метров 5 дней в неделю, за исключением первых 4 дней после каждой точки времени инъекции. После окончания периода исследования лошадей умерщвляли при передозировке барбитурата, и брали образцы. Исследование было одобрено комитетом по биоэтике. Все четыре сустава надкопытья каждой лошади были распределены в одну из четырех исследуемых группы согласно заранее определенному графику выборочного распределению (Таблица 1):

56-дневная группа: после применения РАНГ в день 0.

28-дневная группа: после применения РАНГ в день 28.

7-дневная группа: после применения РАНГ в день 49.

Контрольная группа: только пункции суставов, по две лошади в дни 0, 28 и 49, всего шесть контрольных суставов.

Аспирация суставной жидкости проводилась в каждой из исследуемых групп до введения РАНГ, а также в нелеченом контрольном суставе каждой лошади в каждую назначенную точку времени. Лошадей умерщвляли через 7 дней после последнего введения РАНГ с целью макроскопического и гистологического обследования, а также анализов синовиальной жидкости. Это привело к получению точек данных по шести суставам через 7, 28 и 56 дней и по шести контрольным суставам.

Лошадей наблюдали ежедневно в течение 4 дней после каждой пункции сустава по признакам припухлости, выпоту и хромоте, и с еженедельными суставами на протяжении всего исследования. Хромоту оценивали от 0 до 5 на основании шкалы оценки хромоты AAEP [12]. Тесты надкопытца на сгибание выполняли, держа конечность в течение 45 секунд, и оценивали как: 0 ¼ отсутствие изменения, 1 ¼ незначимое изменение, 2 ¼ легкое изменение, 3 ¼ умеренное изменение, и 4 ¼ тяжелое изменение, и выпот оценивали от 0 до 4: 0 ¼ норма, 1 ¼ незначимый, 2 ¼ легкий, 3 ¼ умеренный и 4 ¼ тяжелый [13].

2.1. Пункция сустава

Для проведения пункции сустава лошадей усыпляли детомидина гидрохлоридом (Дормоседан; Зетис, Каламазу; MI; 20–40 мг/кг, в.в). Латеральную часть надкопытца зажимали клипсой и готовили асептически. Согнув сустав надкопытца через добавочную коллатеральную сесамовидную связку, вводили иглу 19 калибра размером 1 дюйм [14]. Выполняли аспирацию максимально возможного объема синовиальной жидкости для анализа синовиальной жидкости, затем вводили 2,5 мл полиакриламидного стерильного геля, состоящего из 4% трехмерного полиакриламида и 96% очищенной воды, и 0,0001%– 0,0025% ионов серебра (Нолтрекс; ООО Научный центр Биоформ, Москва, Россия). Каждый образец синовиальной жидкости делили на аликвоты для проведения клинико-патологического испытания и испытания на биомаркеры. Клинико-патологическая оценка включала уровень общего белка, pH, общее число лейкоцитов и процентную долю лимфоцитов, нейтрофилов, крупных моноцитов и эозинофилов. Прозрачность оценивалась: прозрачная 1, белесоватая 2, мутная 3, и непрозрачная 4. Цвет оценивали как: соломенно-желтый 1, желтый 2, оранжевый 3 и 4 красный [15].

Аликвоту для теста ИФА помещали в криопробирку и хранили при температуре 70°C до проведения испытания.

Таблица 1

Каждому из четырех надкопытцев каждой лошади назначали 56-, 28 или 7-дневное лечение или определяли как нелеченый контроль для 1 точки времени, либо 56, 28, либо 7 дней.

День исследования	- 1	0	28	49	56
Активность	Оценка хромоты	Получение СЖ до дня лечения 56	Получение СЖ до дня лечения 28	Получение СЖ до дня лечения 7	Окончание исследования
	Рентгенография	Введение через 56 дней	Введение через 28 дней	Введение через 7 дней	Получение СЖ из всех суставов
		Получение контроля до забора СЖ в день 56	Получение контроля до забора СЖ в день 28	Получение контроля до забора СЖ в день 7	Сбор образцов

Сокращение: СЖ, синовиальная жидкость.

У шести лошадей это привело к анализу 6 суставов в течение 56 дней, 6 суставов в течение 28 дней и 6 суставов в 7-дневной группе. Шесть контрольных суставов поделили на два сустава в 56-, 26 и 7-дневной группах.

Коммерчески доступные тесты ИФА использовали для измерения синтеза коллагена типа 2, биомаркера (синтеза коллагена СРІІ-тип ІІ; ІВЕХ Diagnostics, Монреаль, Квебек), расщепления коллагена типа ІІ (С2С-расщепление хряща; ІВЕХ Diagnostics), расщепление коллагена типа І и ІІ (С1, 2С- распад коллагена типа І и ІІ; ІВЕХ Diagnostics), и распад хондроитина сульфата (СS846; СS486; синтез агрекана; ІВЕХ Diagnostics). Образцы тестировали в двойном объеме в соответствующих разведениях (1:2 для СРІІ, С2С, С1,2С; 1:60 для СS846). Испытания выполняли согласно рекомендациям производителей. Все испытания были ранее валидированы и использовались для анализа синовиальной жидкости лошадей [16–19].

Таблица 2

Показаны групповые средние значения белка, общего числа клеток и процентной доли каждого типа клеток в синовиальной жидкости для каждой группы.

Группа	До Белок г/дл	После Белок г/дл	До Число клеток клетки/мкл	После Число клеток клетки/мкл	До Лимфоциты %	После Лимфоциты %	До Нейтрофилы %	После Нейтрофилы %	До Крупные мононуклеар. Клетки %	После Крупные мононуклеар. Клетки %	До Эозинофилы %	После Эозинофилы %
День 7	0,33	1,07	211,67	1553,33	55,7	20,7	5,2	1,8	39,0	77,5	0,0	0,0
День 28	0,25	0,53	366,67	673,33	72,2	21,8	3,8	1,5	24,0	76,3	0,0	0,0
День 56	0,40	0,52	943,33	590,00	32,7	18,0	8,0	0,0	59,2	80,0	0,2	0,0
Контроль	0,45	0,63	223,33	343,33	49,7	42,7	6,5	6,0	43,8	51,3	0,0	0,0
<i>P</i> -значение	<i>P</i> = .3043		<i>P</i> = .0242		<i>P</i> = 1575		<i>P</i> = 3396		<i>P</i> = .0573		<i>P</i> = .4199	

РАНГ = полиакриламидный гидрогель

P-значения отображают результат линейной смешанной модели, которая оценивала различие между образцами, взятыми до лечения и после лечения. Единственной значимой переменной (*P* = .0242) в общей модели являлось общее число клеток, где среднее значение в группе в день 7 достоверно различалась (*p*=0,0004) от остальных средних значений группы. После введения РАНГ наблюдалась тенденцию к увеличению процентной доли крупных мононуклеарных клеток.

2.2. Посмертное обследование

После умерщвления животного каждый сустав зажимали клипсой и готовили в асептических условиях, и выполняли аспирацию синовиальной жидкости, как описывается выше. Каждый сустав вскрывали и делали фотографию для документального подтверждения любой макроскопической патологии сустава. Линии износа внутрисуставного хряща, эрозию поверхности, пальмарные артрозы и гиперемии синовиальной оболочки оценивали по шкале 0–3 и также суммировали для получения макроскопического патологического значения [13,20]. При наличии также регистрировали любые дополнительные субъективные наблюдения

2.3. Гистологическое исследование синовиальной оболочки

Образцы синовиальной оболочки и суставной капсулы брали из задней части сустава в срединной зоне суставной головки в месте прикрепления первой фаланги к проксимальному сгибательному суставной капсулы. Их помещали в 10% забуференный нейтральный формалин, и готовили срезы по 5 мм для проведения гистологического исследования при окрашивании гематоксилином и эозином. Клеточную инфильтрацию, васкуляриность, гиперплазию интимы, отек субинтимы и фиброз субинтимы оценивали по шкале от 0 до 4 на основании ранее опубликованной бальной системы оценки [20], и суммировали для получения гистологического показателя синовиальной оболочки.

Бальную систему оценки (0 норма, 1 незначительное, 2 легкое, 3 умеренное и 4 тяжелое) применяли для определения окрашивания базофилов на поверхности синовиальной оболочки, базофильного материала, связанного с гиперпластическими синовиоцитами, синовиальным базофильным материалом и воспаления, на которое указывало наличие клеточного инфильтрата, связанного с субсиновиальным

базофильным материалом. Эти категории суммировали для проведения статистической оценки. Репрезентативный образец синовиальной оболочки для каждой точки времени в исследовании (через 7, 28, 56 дней после инъекции и нелеченый контроль) далее изучали методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) для субъективной оценки.

2.4. Трансмиссионная электронная микроскопия

Синовиальную оболочку, сохраненную в формалине, использовали для ТЭМ. Для проведения ТЭМ образцы получали в 10% нейтральном забуференном формалине, далее рассекали и фиксируют с 2% глутаральдегидом (м/о) и 2% параформальдегидом (м/о в 0,1 М какодилатном буфере, рН 7,2 в течение 48 часов при 4°C.

Образцы промывали трехкратно в 0,1 М какодилатном буфере и затем фиксировали в 1% осмия тетроксиде в 0,1 М какодилатного буфера в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы промывали деионизированной дистиллированной водой и, зафиксировав, окрашивали 2% водным уранилацетатом в течение 30 минут, обезвоживали в серии градуированного этанола, очищенного ультрачистым ацетоном, инфильтрировали и погружали в эпоксильную смолу (EPON 812; Electron Microscopy Sciences, Ft, Washington, PA). Блоки смолы полимеризовали в течение 48 часов при 65°C. Готовили толстые и ультратонкие слезы с использованием ультрамикротомы (Leica UC6; North Central Instruments, Minneapolis, MN). Ультратонкие срезы собирали на медные сетки, и снимки делали с использованием сканирующего и трансмиссионного электронного микроскопа (JEOL 2100; Japan Electron Optic Laboratories, Peabody, MA).

2.5. Гистологическое обследование хряща

Срез толщиной 1 см срединной трети суставной головки пястно-фалангового и плюснефалангового сустава и проксимальной части первой фаланги удаляли с помощью ленточной пилы и помещали в 10% забуференный нейтральный формалин на 7 дней, затем подвергали деминерализации в муравьиной кислоте в течение 7–14 дней. Затем образцы нарезают на срезы по 5мм для проведения гистологического исследования. Каждый срез окрашивали гематоксилином и эозином, и малахитовым зеленым красителем сафранин-О. Для оценки суставного хряща использовали ранее описанную систему бальной оценки [20]. Балл 0–4 давали при некрозе хондроцитов, образовании хондронов, очаговой потере клеток и фибрилляции суставного хряща при окрашивании гематоксилином и эозином, и малахитовым зеленым красителем. При этом значение 0 являлось нормой, а 4 – максимально тяжелым поражением в каждой категории. Каждый параметр оценивали индивидуально, и для оценки получали суммарный балл по гистологии хряща.

2.6. Статистический анализ

Все данные вносили в электронную таблицу (Excel, Microsoft Office; Microsoft Corp, Redmond, WA), и статистический анализ выполняли с помощью коммерческого программного обеспечения (SAS, версия 9.2; SAS Institute Inc, Cary, NC). Использовали метод линейной смешанной модели с лечебной группой и лошадью как случайным эффектом. Клинико-патологические данные и данные ИФА анализировали в виде различия (после – до) и сравнивали между группами. Для подсчета клеток в анализе использовали различие между естественными

логарифмами. За исключением ежедневных наблюдений, все данные получали заслепленным образом. Статистическая значимость была установлена при $P \leq .05$.

3. Результаты

Все лошади оставались здоровыми (не страдали от хромоты) и имели отрицательный результат тестов на сгибание на протяжении всего периода исследования. За исключением присутствующего выпота в некоторых надкопытьях не отмечалось других атипичных клинических признаков, связанных с пункцией сустава и введением РАНГ, на протяжении всего периода исследования. В лечебной группе выпот степени 1 наблюдали: в шести надкопытьях на протяжении 28 дней (три в 56-дневной группе и три в 28-дневной группе), четыре надкопытья в течение 21 дня (одно в 56-дневной группе и 3 в 28-дневной группе), и пять надкопытьев в течение 7 дней (пять в 7-дневной группе). В контрольной группе наблюдался выпот степени 1: одно надкопытье в течение 1 дня и одно надкопытье в течение 4 дней. В любой из групп не наблюдалось выпота степени 2 или 3. Наблюдали одно надкопытье с выпотом степени 1 в течение 2 дней до любого лечения, что было нормальным до любого вмешательства и оставалось в норме после включения в исследование.

Число лейкоцитов было единственным клинико-патологическим параметром, который существенно варьировал ($P .0242$) в модели. В этой группе среднее значение (стандартная погрешность среднего [SEM]) увеличение числа лейкоцитов 1,342 клеток/мкл (SEM 233) между временем исходной пункции и через 7 дней после инъекции было достоверно выше ($P .0004$), чем в других группах (Рис. 1А, Таблица 2). Умеренное увеличение на 1,342 клетки/мкл наблюдалось преимущественно в крупных мононуклеарных клетках. Процентная доля крупных мононуклеарных клеток до введения составляла 39%, и это значение увеличилось на 77,5% через 7 дней. Изменение типа клеток было несущественным в этой модели ($P .0573$), но присутствовала тенденция по увеличению числа мононуклеарных клеток. Отмечалось увеличение на 306 клеток/мкл (SEM 165) и 120 клеток/мкл (SEM 100) в течение 28 дней и в контрольных группах, соответственно, и снижение на 353 клеток/мкл (SEM 728) в 56-дневной группе.

Макроскопическая посмертная оценка не выявила достоверных наблюдений по отдельным категориям или по суммарному значению категорий ($P .6709$). Отмечались линии износа суставной поверхности степени 1 в трех надкопытьях (1–56 дней и 1–7 дней после лечения, и 1–7 дней для контроля). Модель была значимой для суммарного гистологического показателя синовиальной оболочки ($P .0277$) (Рис. 1В) и для суммарных показателей базофильного материала синовиальной оболочки ($P .0003$) (Рис. 1С).

РАНГ можно было наблюдать на поверхности синовиальной оболочки в пяти из шести суставов, в которые вводили изделие, за 7 дней до забора образцов, в 1 суставе через 28 дней и 1 суставе через 56 дней (Рис. 2). Базофильный материал можно было идентифицировать внутри синовиальной оболочки во всех суставах ко дню 28 (Рис. 3). Отмечались реактивные, крупные нуклеированные синовиоциты с минимальным воспалительным ответом. Показатели воспаления внутри синовиальной оболочки, ассоциированные с базофильным материалом, имели медиану 0 при максимальном балле 1 для всех леченых групп, и не отмечалось воспаления в контрольной группе. Во всех хрящах отсутствовал некроз хондроцитов, образование кластеров, фибрилляция и очаговая потеря, и все значения поглощения SOFG были 0 или 1, что не было значимым ($P .8601$). Проведенная ТЭМ подтвердила, что синовиоциты находились в процессе поглощения зернистого материала, которым предположительно являлся РАНГ (Рис. 4А–С).

В этой модели биомаркеры СРП (P .0032) и С2С (P .0034) достоверно отличались между лечебными группами (Рис. 5А–В). При оценке лишь переменной СРП между лечебными группами в 7-дневной группе отмечалось увеличение на 936,6 нг/мл (P .0001), и аналогично уровень С2С в день 7 незначимо, но достоверно (P .0002) на 33,15 нг/мл. Модель не демонстрировала достоверного изменения С1,2С (P .1690).

У 3 лошадей в 56-дневной группе уровень CS846 примерно в четыре раз превышал (среднее значение 23,116 нг/мл; диапазон 20,773– 26,170 нг/мл) значения всех других образцов, полученных до любого вмешательства (среднее значение 6,463 нг/мл; диапазон 2,527– 10,568 нг/мл). Это были образцы, полученные вскоре после транспортировки в исследовательский центр, и уровни могли быть повышенными из-за повреждения и мероприятий, связанных с отправкой. Включение этих значений могло привести к искусственному улучшению сустава, связанного с лечением, поэтому эти показатели исключили из модели.

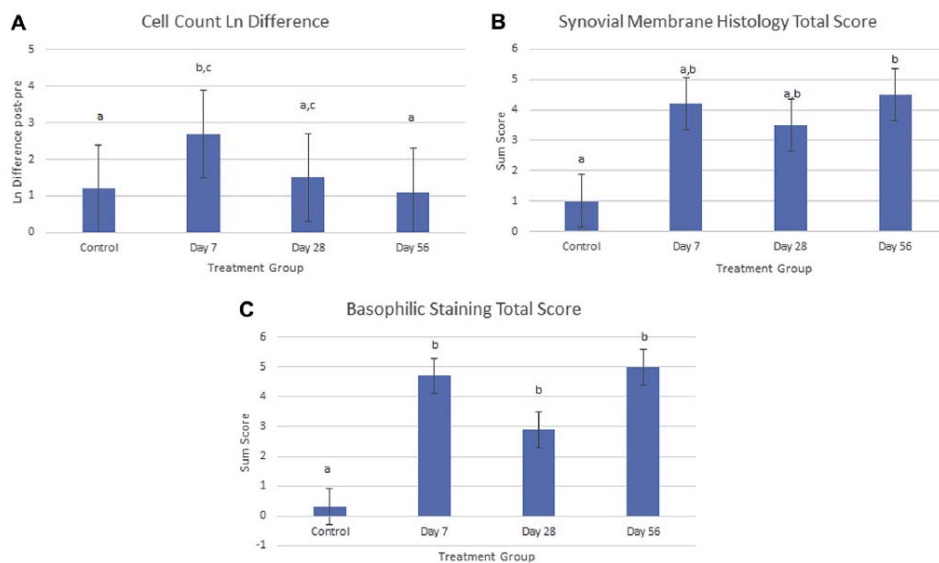


Рис. 1. (А) Показано среднее различие естественного логарифма синовиальной жидкости после лечения (Ln) по числу клеток. (В) Показан средний общий балл гистологической оценки синовиальной жидкости в каждой группе. (С) Показано среднее значение окрашенных базофилов в каждой группе. Группы с различными буквами достоверно отличались при P < .05. Полосы погрешностей отражают стандартную погрешность среднего значения, SEM.

Это привело к отсутствию достоверного изменения (P .3618) молекулы CS846 в течение времени, связанного с лечением. У трех лошадей с исходными высокими концентрациями CS846 в аналогичных образцах были получены концентрации С2С, СРП и С12С, аналогичные другим точкам данных.

4. Обсуждение

У лошадей отсутствовала хромота, и единственным клиническим признаком, наблюдаемым после введения РАНГ, было утолщение, определяемое при пальпации суставов, которое оценивалось как небольшой выпот сустава (балл 1).

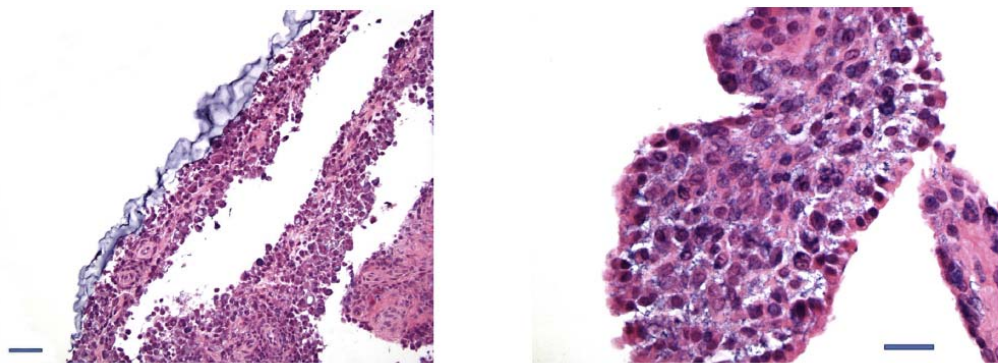


Рис. 2. Срез синовиальной оболочки, полученный через 7 дней после введения РАНГ, демонстрирует наличие базофильного РАНГ на поверхности синовиальной оболочки. Окрашивание гематоксилином и эозином; масштабная линейка $\frac{1}{4}$ 50 мм. РАНГ, полиакриламидный гидрогель.

Рис. 3. Срез синовиальной оболочки, полученной через 28 дней после применения РАНГ. Синовиоциты имеют большое ядро, окрашенное базофилами (большая стрелка), и базофильный материал отмечался в интерстициальном пространстве. Окрашивание гематоксилином и эозином; масштабная линейка $\frac{1}{4}$ 20 мм. РАНГ, полиакриламидный гидрогель.

Неизвестно, являлось ли утолщение результатом утолщения синовиальной оболочки, суставной капсулы, перисуставной припухлости или выпота сустава. Это клинический признак наблюдался в течение 21–28 дней после применения РАНГ. После гистологической оценки синовиальной оболочки припухлость пальмарной/плантарной синовиальной оболочки, вероятно, являлась результатом присутствия РАНГ на синовиальной оболочке, удерживающего жидкость, что стало результатом определенной припухлости.

Гистологическое исследование синовиальной оболочки дало информацию по приверженности РАНГ.

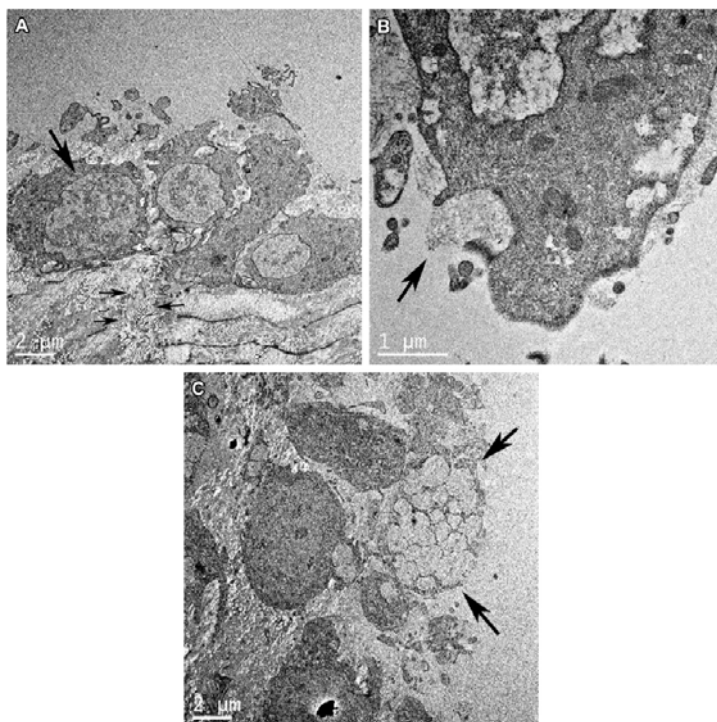


Рис. 4. Снимки ТЭМ: (А) Синовиальная оболочка нелеченого контрольного надкопытия. Крупные ядра синовиоцитов (большая стрелка) являются преобладающей характеристикой с отсутствием фагосом в

клетках. Коллагеновые фибриллы наблюдались в интерстициальном пространстве (небольшие стрелки). Масштабная линейка $\frac{1}{4}$ 2 мм (B) Синовиальная оболочка через 7 дней после внутрисуставного введения РАНГ. Синовиоцит содержит большое количество фагоцитированного РАНГ (стрелки). Масштабная шкала $\frac{1}{4}$ 2 мм. (C) ТЭМ синовиальной оболочки через 56 дней после инъекции демонстрирует процесс фагоцитоза синовиоцита (стрелка), который, как полагают, является результатом РАНГ. Масштабная шкала $\frac{1}{4}$ 1 мм. РАНГ, полиакриламидный гидрогель; ТЭМ, трансмиссионная электронная микроскопия.

В суставах, полученных через 7 дней после инъекции РАНГ, РАНГ наблюдался на поверхности синовиальной оболочки пяти из шести суставов. В 28- и 56-дневных группах число суставов с РАНГ, устилающим синовиальную оболочку, уменьшалось и было более выраженным в соединительных тканях синовиальной оболочки и синовиоцитах. На это указывает увеличение содержания базофильного материала, наблюдаемого в интерстициальной зоне синовиальной оболочки, что являлось в конечном итоге процессом фагоцитоза РАНГ синовиоцитами. Суставы, пораженные остеоартритом, могут быть в различной степени предрасположены действию РАНГ. Было предположено, что РАНГ может покрывать поверхностные дефекты суставов, пораженных остеоартритом [9]; однако это не наблюдалось в этих здоровых суставах. По завершению рутинных гистологических исследований возникли вопросы по предрасположенности действию РАНГ. Исследователи решили проводить ТЭМ синовиальной оболочки, чтобы определить возможность получения дополнительной информации. Использовали оболочку, сохраненную в формалине, и было признано, что при этом методе сохранения будут утрачены некоторые клеточные данные. Полученные снимки давали возможность увидеть зернистый материал, который подвергался фагоцитозу синовиоцитами и присутствовал в интерстициальных пространствах. Это наблюдение было схоже с базофильным окрашиванием, наблюдаемым при гистологическом исследовании синовиальной оболочки с окрашиванием гематоксилином и эозином.

Синовиальная оболочка суставов, пораженных остеоартритом, приобретала все большую фибротичность [20]. Среди козлов с индуцированным остеоартритом животные, получавшие РАНГ, имели сниженную скованность суставной капсулы, что выражало болезнь-модифицирующий эффект, который мог снижать боль и хромоту [7]. Лишь воспаление синовиальной оболочки может привести к прогрессирующему остеоартриту [21], а повторное растяжение и разрыв фибротической синовиальной оболочки приведет к стойкому воспалению.

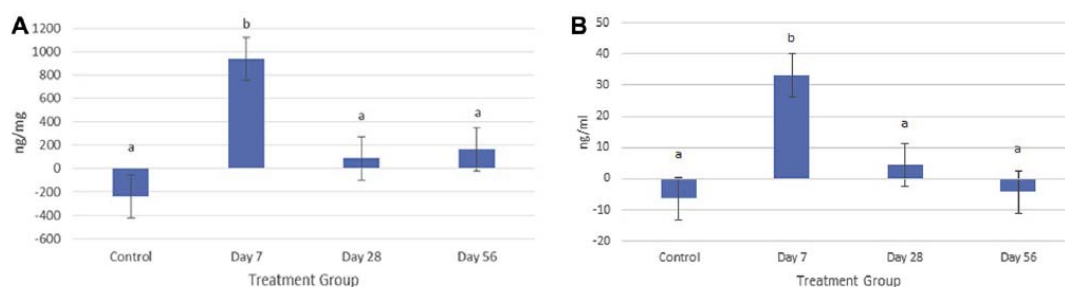


Рис. 5. Среднее различие между концентрацией хрящевых биомаркеров после и до лечения. Положительное число указывает на более высокую концентрацию после введения РАНГ, чем это наблюдалось в суставе до введения. (A) СРП. (B) С2С. Группы с различными буквами, имели достоверно различные показатели при $P < .05$. Полосы погрешности отражают SEM. С2С, расщепление коллагена типа II; СРП, биомаркер синтеза коллагена типа 2; РАНГ, полиакриламидный гидрогель; SEM, стандартная погрешность среднего.

Утолщенная фибротическая синовиальная оболочка нежелательным образом повлияет на синовиоциты, помогающие защитить хрящ от прогрессирования до остеоартрита [22].

Возможно, что основной болезнью-модифицирующий эффект РАНГ заключается в улучшении функции синовиальной оболочки.

Другим возможным болезнью-модифицирующим эффектом будет клеточный ответ на РАНГ. Клеточный ответ в синовиальной жидкости был мононуклеарным, и в синовиальной оболочке увеличилось содержание крупных реактивных синовиоцитов. При экспозиции апирогенной поверхности на мононуклеарные клетки отмечалось увеличение числа противовоспалительных цитокинов, включая антагонист рецептора белка интерлейкин-1, трансформирующий фактор роста-b1, инсулиноподобный фактор роста 1 и т.д. [23]. РАНГ может оказывать стимулирующее действие на анаболический цитокиновый ответ. Требуются дальнейшие исследования для проверки этой терапии. После пункции сустава и введения РАНГ наблюдался минимальный клеточный ответ. Не отмечалось воспалительной реакции в синовиальной оболочке, что продемонстрировано при отсутствии изменения значения микроскопической шкалы оценки для клеточного инфильтрата. Отмечалось большее количество крупных реактивных синовиоцитов. При добавлении маркеров воспаления, включая интерлейкин-1 и простагландин-E2, возможно получить дополнительную информацию. Первоначальное повышение концентрации CS846 в трех надкопытях указывает на чувствительность биомаркеров. Три надкопытя с высокой концентрацией при первом заборе образцов были аналогичны остальным надкопытям лечебной и контрольной группы 56 дней спустя. В трех других надкопытях 56-дневной группы первоначальные концентрации CS846 были аналогичны концентрациям в здоровых суставах [17,24]. Физическая нагрузка увеличивает концентрации CS846 в синовиальной жидкости [17], и аналогичным образом, транспортировка и смешивание могли стать причиной повышения концентрации, наблюдаемого в трех суставах в начале исследования. В эти три сустава с исходно повышенными концентрациями CS846 вводили РАНГ, когда присутствовала повышенная концентрация CS846, и в последующем они были аналогичны суставам других леченых и контрольных лошадей по окончании проекта. Концентрации C2C, CPII и C1,C2 не были повышенными у трех лошадей с высокой концентрацией CS846, это подтверждает, что подобные повышения были результатом кратковременного инсульта до включения в исследование.

Концентрации как CPII, так и C2C были существенно повышенными через 7 дней после введения РАНГ. Увеличение концентрации CPII, анаболического маркера синтеза хрящевого матрикса, и C2C, маркера распада коллагена, указывает на небольшое увеличение метаболизма хрящевого матрикса. Оба этих наблюдения были значимыми, но относительно невыраженными, и эти биомаркеры не изучали в других исследованиях РАНГ с целью сравнения. Это указывает на увеличение метаболизма коллагена, что может свидетельствовать о наличии анаболического эффекта или быть результатом инсульта и восстановления после инъекции РАНГ. Увеличение концентрации CPII (936 нг/мл) было меньше результата через 7 дней после внутрисуставного введения бупивакаина, и концентрация C2C (33,2 нг/мл) была также меньше концентрации после введения бупивакаина [24].

В этом исследовании изучали эффекты РАНГ на здоровые суставы в течение 56-дневного периода. В этом исследовании не выявлено свободного РАНГ в суставах, подвергнутых макроскопическому исследованию уже через 7 дней после инъекции, и даже хотя материал гистологически наблюдался на поверхности синовиальной оболочки. Christensen et al [3] сообщают, что наблюдали РАНГ в виде блестящего желтого материала в углублениях внутри сустава у лошадей с хроническим остеоартритом. Возможно, что изменения синовиальной оболочки у лошадей с остеоартритом влияют на долгосрочную предрасположенность к материалу. Отмечались схожие моменты между этим исследованием и результатами, сообщаемыми Christensen et al [3] в том, что РАНГ в конечном итоге выявляли в субсиновиальной соединительной

ткани. При введении РАНГ в здоровые суставы кролика [3] гистологические наблюдения утолщения синовиальной оболочки с содержанием РАНГ на субсиновиальном уровне были аналогичны результатам в здоровых надкопытцах лошадей.

Потенциальным ограничением этого исследования было то, что каждая лошадь представляла все четыре лечебные группы. Возможно присутствие системного перекрестного эффекта. Авторы считают это маловероятным фактором, и отсутствие изменений в контрольных суставах подтверждает маловероятность системного эффекта. Цели этого исследования заключались в оценке клинических, гистологических и суставных метаболических эффектов полиакриламида в здоровых суставах надкопытца. Поэтому авторы не предприняли попыток идентифицировать механизм, посредством которого РАНГ может снижать выраженность хромоты у лошадей с остеоартритом. Это исследование проводилось для определения изменений, которые могут возникать при отсутствии основополагающего воспаления, фиброза и эрозии хряща. Информация этого исследования может стать основой для проведения дальнейшего изучения и стать руководством для исследований с дополнительной переменной основного заболевания остеоартрит. Данные этого исследования подтверждают необходимость дальнейших исследований по применению РАНГ для лечения остеоартрита у лошадей.

Выражение признательности

Это исследование финансировалось компанией Nucleus Regenerative Therapies LLC, Кеннесо, Джорджия, США. Nucleus Regenerative Therapies является эксклюзивным дистрибьютором Нолтрекс Веет в Северной Америке. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Библиография

- [1] Caron JP, Genovese RL. Principles and practices of joint disease treatment. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. Lameness in the horse. Philadelphia: Elsevier; 2003. p. 746–64.
- [2] Caron JP. Osteoarthritis. In: Ross MW, Dyson SJ, editors. Lameness in the horse. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 655–68.
- [3] Christensen L, Camitz L, Illiger KE, Hansen M, Sarvaa R, Conaghan PG. Synovial incorporation of polyacrylamide hydrogel after injection into normal and osteoarthritic animal joints. *Osteo- arthritis and Cartilage* 2016;11:1999–2002.
- [4] Zar VV, Zagorodny NV, Martinov DV. Effectiveness and safety of injectable endoprosthetics of synovial fluid by cross-linked polymer Noltrex for treatment OA knee. *Eur J Muscl Dis* 2012;1:23–32.
- [5] Zar VV, Voloshin VP, Martynov MD. Functional assessment of results of the intra-articular injection of polyacrylamide gel Noltrex in gonarthrosis treatment. *Almanac Clin Med* 2012;27:18–24.
- [6] Zargorodny NV, Karpovich NI, Abdulkhabirov MA, Dirin VA, Tikhonov OA, Tarukhodzhaev FA, Malkov VA. New biopolymer medical device named Noltrex in combine treatment of gonarthrosis. *Zemskiy Vrach* 2012;6:49–52.
- [7] Tnibar A, Persson AB, Nielsen H, Svalastoga E, Westrup U, McEvoy F, et al. Evaluation of a polyacrylamide hydrogel in the treatment of induced osteoarthritis in a goat model: a randomized controlled pilot study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2014;22:S5477 (abstract).
- [8] Tnibar A, Schougaard H, Camitz L, Rasmussen J, Koene M, Jahn W, Markussen B. An international multi-centre prospective study of the efficacy of an intraarticular polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis: a 24 months follow-up. *ACTA Vet Scand* 2015;57:1–8.
- [9] Janssen I, Koene M, Lischer C. Intraarticulare application von polyacrylamide hydrogel zur behandlung von osteoarthritis des hufge- lenkes: Fallserie von 12 pferden. *Pferdeheilkunde* 2012;28:650–6.

- [10] Peppas NA, Merrill EW. Development of semicrystalline poly (vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications. *J Biomed Mater Res* 1977;11:423–34.
- [11] Zar VV, Troitsky VM, Stepanov AI, Lopatin VV. Future of viscoelastic behavior of 3-D structure of artificial and natural samples of articular liquids at the pressure 0.1 – 100 MPa. *Materials of 16th chemical thermodynamics international conference, Vol. 1*; 2007. Suzdal.
- [12] Kaneps AJ. Diagnosis of lameness. In: Hinchcliff, Kaneps, Geor, editors. *Equine sports medicine & surgery*. Edinburg: Saunders; 2014. p. 4239–51.
- [13] Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* 2002;9:12–20.
- [14] Misheff MM, Stover SM. A comparison of two techniques for arthrocentesis of the equine metacarpophalangeal joint. *Equine Vet J* 1991;23:273–6.
- [15] Frisbie DD, Kawcak CE, Baxter GM, Trotter GW, Powers BE, Lassen ED, et al. Effects of 6alpha-methylprednisolone acetate on an equine osteochondral fragment exercise model. *Am J Vet Res* 1998; 59:1619–28.
- [16] Nicholson AM, Trumble TN, Merritt KA, Brown MP. Associations of horse age, joint type, and osteochondral injury with serum and synovial fluid concentrations of type II collagen biomarkers in Thoroughbreds. *Am J Vet Res* 2010;71:741–9.
- [17] Frisbie DD, Al-Sobayil F, Billingham RC, Kawcak CE, McIlwraith CW. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Cartilage* 2008;16:1196–204.
- [18] Frisbie DD, Ray C, Ionescu M, Poole AR, Chapman PL, McIlwraith CW. Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses. *Am J Vet Res* 1999;60:305–9.
- [19] de Grauw JC, van de Lest CH, van Weeren R, Brommer H, Brama PA. Arthrogenic lameness of the fetlock: synovial fluid markers of inflammation and cartilage turnover in relation to clinical joint pain. *Equine Vet J* 2006;38:305–11.
- [20] McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE, Fuller CJ, Hurtig M, Cruz A. The OARSI histopathology initiative recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;8(Suppl 3):S93–105.
- [21] McIlwraith CW, Van Sickle DC. Experimentally induced arthritis of the equine carpus: histologic and histochemical changes in the articular cartilage. *Am J Vet Res* 1981;42:209–17.
- [22] Lee CM, Kisiday JD, McIlwraith CW, Grodzinsky AJ, Frisbie DD. Synoviocytes protect cartilage from the effects of injury in vitro. *BMC Musculoskelet Disord* 2013;14:54.
- [23] Wehling P, Carsten M, Frisbie D, McIlwraith CW, Kawcak CE, Ruediger K, et al. Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases, the Orthokine® therapy. *Biodrugs* 2007;21: 323–32.
- [24] Piat P, Richard H, Beauchamp G, Laverty S. In vivo effects of a single intra-articular injection of 2% Lidocaine or 0.5% bupivacaine on articular cartilage of normal horses. *Vet Surg* 2012;42:1002–12