

А. А. Коструб, Р. И. Блонский, В. В. Котюк,
В. В. Григоровский, Д. А. Смирнов

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СУХОЖИЛИЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины», г. Киев

Введение. Исследование и разработка методов лечения тендинопатии требует быстрого, дешевого и простого в применении способа ее моделирования. Цель работы – разработать модель дегенеративного повреждения сухожилий.

Методы. В толщу ахиллова сухожилия 60 половозрелых крыс-самцов вводили раствор Дипроспана. Через 7 суток после последнего введения препарата проводили гистоморфологическое и биохимическое исследование.

Результаты. Введение Дипроспана в толщу ахиллова сухожилия вызывает волнистость, дезорганизацию, вплоть до разрушения, сухожильных волокон, а биохимически – повышение активности коллагеназы и концентрации свободной фракции гидроксипролина.

Дискуссия. Тендинопатия – многофакторное поражение сухожилий, поэтому пока ни одна модель не может позволить адекватно исследовать все аспекты тендинопатии.

Многие модели затратны по времени и/или ресурсам, или приводят к непостоянным результатам. Предложенная нами модель тендинопатии характеризуется быстротой и простотой воспроизведения, низкой себестоимостью, высоким уровнем воспроизводимости, длительным сохранением дегенеративных изменений в сухожилии. Данная модель позволяет воспроизвести гистоморфологические и биохимические изменения, типичные для тендинопатии. В данном исследовании мы не анализировали субъективные ощущения в области тендинопатии и влияние изменений в сухожилии на функциональные показатели.

Выводы. Трехкратное введение раствора Дипроспана в толщу сухожилия вызывает развитие в нем дегенеративно-дистрофического процесса. Предложенная технология может использоваться в качестве модели дегенеративного повреждения сухожилия для дальнейших научных исследований.

Ключевые слова: тендинопатия, моделирование.

**A. A. Kostrub, R. I. Blonskyi, V. V. Kotiuk,
V. V. Grygorovskiy, D. A. Smirnov.**

MODELING OF TENDONS DEGENERATIVE DYSTROPHIC CHANGES (EXPERIMENTAL STUDY).

Acuality. Research and development of methods of the tendinopathy treatment requires a fast, cheap and easy-to-use method of its modeling. The aim of the work is to develop the model of degenerative damage to tendons.

Methods. 60 sexually mature male rats were injected into the Achilles tendon with a solution of Diprosan. Histomorphological and biochemical study were performed 7 days after the last administration of the preparation.

Results. Diprosan injection into the Achilles tendon leads to waviness, disorganization, up to destruction, of tendon fibers, and biochemically to the increase in the collagenase activity and concentration of the free fraction of hydroxyproline.

Discussion. Tendinopathy is a multifactorial tendons disease. Therefore, no model can adequately investigate all aspects of tendinopathy. Many models are costly in time and/or resources, or lead to intermittent results. The proposed model of tendinopathy is characterized by the speed and ease of reproduction, low cost, high reproducibility, long-term preservation of degenerative changes in the tendon. This model allows to reproduce histomorphological and biochemical changes typical for tendinopathy. In this study we did not analyze the subjective sensations in the area of tendinopathy and the effect of changes in the tendon on functional parameters.

Conclusion. Three-time injection of Diprosan into the tendon causes the development of a degenerative-dystrophic process in it. The proposed technology can be used as a model of degenerative tendon damage for further scientific research.

Key words: tendinopathy, modeling.

Повреждения, связанные с хроническим перенапряжением сухожилий, в зависимости от их локализации и вида спорта возникают у 15–30 % спортсменов [1]. Среди них синдром хронической перегрузки сухожилий (тендинопатия) по МКБ-10 (M70.8). «Другие болезни мягких тканей, связанные с нагрузкой, перегрузкой и давлением» являются самой распространенной причиной перерыва в тренировках и соревнованиях спортсменов и составляет 15–25 % от всех случаев [2].

Синдром хронической перегрузки сухожилий (тендинопатия) – это патологическая перестройка ткани сухожилия под действием хронической перегрузки и микротравматизации, характеризующаяся начальным воспалением с последующим

разрушением специализированных клеток и волокон с дальнейшим замещением дефекта грубоволокнистой тканью и формированием очагов осификатив и некроза, ведет к развитию дегенеративно дистрофических процессов в ткани сухожилия и сопровождается уменьшения прочностных характеристик самого сухожилия с последующим возможным его патологическим разрывом и возникновением стойкого болевого синдрома.

Среди лабораторных методов исследования наиболее информативным является гистоморфологическое исследование. Гистоморфологически картина изменений при дегенеративных повреждениях сухожилия характеризуется ухудшением тинкториальных свойств ткани сухожилия, появлением участков с меньшим числом клеточ-

ных элементов, выраженной локальной волнистостью и дезорганизацией сухожильных волокон, вплоть до их разрушения [2].

Для исследования новых методов лечения дегенеративно-дистрофического повреждения сухожилий существует необходимость создания адекватной быстрой и простой в использовании модели этой патологии в эксперименте. На сегодняшний день существует ряд моделей дегенеративно-дистрофического повреждения сухожилий у опытных животных. В основу этих моделей положены как действие физических факторов на ткань сухожилия, в частности влияния острой и хронической миостимуляции мышц (модели Rais 1961, Backman 1990, Smutz 1994, Archambault 2001), хронической перегрузки мышц (модели Lai, 1995, Soslowsky, 2000), так и действие химических факторов, в частности введение коллагеназы в толщу сухожилия (модели Williams, 1995, Soslowsky, 1996, Stone, 1999), цитокинов (модель Sakata, 1988), а также путем приема антибактериальных препаратов группы фторхинолонов (модель Shakibaei, 2001) [2]. Учитывая данные литературы о том, что введение в толщу сухожилия препаратов группы глюкокортикостероидов вызывает в нем развитие дегенеративно-дистрофических изменений, нами предпринята попытка создать модель дегенеративного процесса, используя препарат Дипроспан. В случае положительного результата эта модель может быть применена как при проведении научных исследований, так и для разработки методов профилактики и лечения дегенеративные-дистрофических поражений в клинике.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на базе научно-исследовательских подразделений Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков), отделов спортивной и балетной травмы, биохимии, патоморфологии с экспериментально-биологическим отделением ГУ «Институт травматологии и ортопедии АМН Украины» (г. Киев), а также отдела физики биологических систем Института физики НАН Украины (г. Киев).

Работа выполнена на 60 половозрелых крысах-самцах массой 250 ± 15 г. Все манипуляции с животными проводили согласно международным правилам о гуманном отношении к животным (ETS 123, 1986) [3].

Содержание животных осуществляли в соответствии с «Санитарными правилами создания,

оборудования и содержания экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 06.04.1973 г. и дополнений от 04.12.1978 г. к приказу МЗ СССР № 163 от 10.03.1966 г. «О суточных нормах питания животных и продуцентах». В период акклиматизации (2 недели) и в ходе эксперимента животные находились в виварии при температуре $18-22$ °С, влажности 50–60 %, естественном световом режиме «день–ночь». Крысы содержали в условиях клиники для экспериментальных животных на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к пище и воде. Во время исследования руководствовались «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых с экспериментальными и другими научными целями» (Страсбург, 18.03.1986 г.), а также «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.2004, Киев, Украина). Подбор животных и формирование групп проводили по методу случайных чисел.

60 крысам-самцам (5 исследовательских групп – по 6 животных в каждой и контрольная группа – 30 животных) массой 250 ± 15 г в толщу ахиллова сухожилия на 0,25 см от места крепления к пяточной кости вводили с помощью инсулиновой иглы 0,025 мл Дипроспана. Интервал между введением Дипроспана во всех группах животных составлял 7 суток. Животным первой группы препарат вводили однократно; II группы – двукратно; III группы – троекратно; IV группе – четырехкратно; V группы – пятикратно. Крысам VI группы (контроль) – в толщу ахиллова сухожилия по схеме введения Дипроспана вводили 0,025 мл физиологического раствора с интервалом 7 дней. Из эксперимента животных выводили через 7 суток после последнего введения препарата, забирая кровь для биохимического исследования.

Статистическую обработку полученного материала проводили с помощью стандартной статистической компьютерной системы «Microsoft Excel», адаптированной для медикобиологических исследований.

Результаты и обсуждение

Гистоморфологические изменения в соединительной ткани под влиянием Дипроспана

Влияние Дипроспана на структурно-функциональную организацию сухожилий изучено через 7 суток после одно-, двух-, трех-, четырех- и пятикратного введения Дипроспана в толщу ахиллова



Рис. 1. Гистологическое строение нормального ахиллова сухожилия крыс. Гематоксилин и эозин. $\times 40$

сухожилия животных. С целью контроля животным по такой же схеме вводили физиологический раствор. Из эксперимента животных выводили спустя 7 суток после последнего введения препарата или физиологического раствора.

Структурно-функциональная организация ахиллова сухожилия в норме характеризуется наличием толстых сухожильных волокон, сформированных из коллагенового белка, которые плотно прилегают друг к другу, располагаются параллельно и формируют пучки сухожилий I порядка, между которыми расположены тендиноциты и аморфное основное вещество (рис. 1).

Тоненькие пластинчатые отростки тендиноцитов входят в промежутки между сухожильными волокнами и плотно контактируют с ними. Несколько пучков I порядка объединяются в пучки II порядка, которые окружены слоями рыхлой волокнистой соединительной ткани (эндотений), в которой проходят кровеносные и лимфатические сосуды, нервы. Плотная соединительная оболочка, окружающая сухожилия внешне, называется перитендинием. Ахиллово сухожилие внешне не имеет сухожильного влагалища, поэтому окружен рыхлой соединительной тканью, которая называется паратендиний.

Через 7 суток после первого введения Дипроспана в сухожилия в зоне введения отмечали участки ослабления окраски клеточных элементов и сухожильных волокон и полного отсутствия клеточных элементов (рис. 2, а).

В дальнейших наблюдениях и с увеличением кратности введения Дипроспана в толщу ахиллова сухожилия дегенеративно-дистрофические изменения усиливались. Уже на 7 сутки после двукратного введения Дипроспана (14 сутки эксперимента) в сухожилии возникали волнистость и признаки дезорганизации сухожильных волокон (рис. 2, б). После трехкратного введения Дипроспана (21 сутки эксперимента) волнистость и дезорганизация сухожильных волокон усиливались и распространялись. После четырехкратного введения препарата (28 сутки эксперимента) наблюдали усиление волнистости и дезорганизации сухожильных волокон, а после пятикратного введения (35 суток) появлялись выраженные признаки разрушения сухожильных волокон (рис. 2, в, г, д). В то же время у контрольных животных даже после пятикратного введения физиологического раствора не отмечали нарушения структурно-функциональной организации ахиллова сухожилия (рис. 2, е).

Метаболические изменения в соединительной ткани под влиянием Дипроспана

Анализ полученных данных при исследовании активности коллагеназы показал, что активность этого фермента у животных I группы достигает ($3,27 \pm 0,10$) мкмоль/(л·ч), в то время как у животных контрольной группы – ($2,80 \pm 0,15$) мкмоль/(л·ч). Рост активности этого фермента в первой группе животных относительно контрольной группы составило 117 %. Концентрация свободной фракции гидроксипролина (СФГП) – биохимического маркера распада коллагена, в этой группе животных составляет 114 % относительно такого показателя у крыс контрольной группы. В абсолютных показателях ($9,8 \pm 0,3$) мкмоль/л при норме ($8,59 \pm 0,43$) мкмоль/л. Показатели, отражающие синтетическую фазу в метаболизме коллагена, – белковосвязанная фракция гидроксипролина (БСФГП) на 7 сутки после от начала исследования остается на уровне контрольной группы животных, достигая ($4,1 \pm 0,12$) мкмоль/л.

Уровень ГАГ, который отражает интенсивность метаболических процессов межклеточного вещества, на 7 сутки от начала эксперимента имеет тенденцию к росту и достигает 105 % по отношению к показателям у контрольных животных (табл. 1).

У животных II группы активность коллагеназы возрастает до 143 % по сравнению с показателями

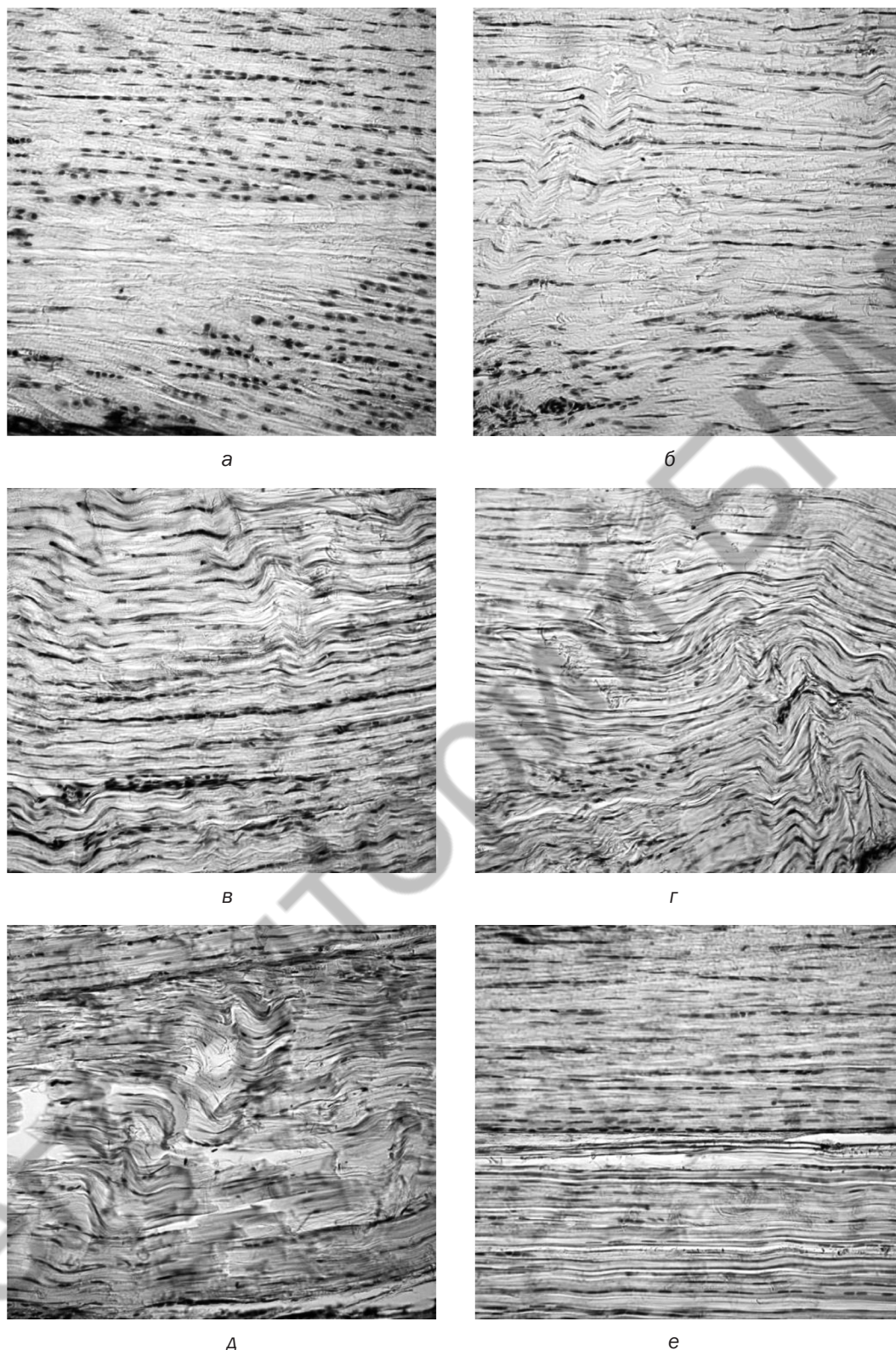


Рис. 2. Участки ахиллова сухожилия в месте введения Дипроспана: а – появление зон без клеточных элементов после однократного введения; б – уменьшение количества клеток, волнистость и признаки дезорганизации сухожильных волокон после двукратного введения; в – волнистость и дезорганизация сухожильных волокон возрастает после трехкратного ввода; г – выразительная дезорганизация сухожильных волокон после четырехкратного введения; д – разрушение сухожильных волокон после пятикратного введения Дипроспана; е – структурно-функциональная организация сухожилия сохраняется после пятикратного введения физиологического раствора. Гематоксилин и эозин. × 40

Таблица 1. Биохимические показатели сыворотки крови у экспериментальных животных с смоделированным дегенеративно-дистрофическим повреждением ткани сухожилия

Показатели	Контрольная группа	Сроки наблюдения, суток				
		7	14	21	28	35
Колагеназа, мкмоль/(л·г)	2,80 ± 0,15	3,27 ± 0,10	4,00 ± 0,20	4,90 ± 0,10	4,80 ± 0,20	4,90 ± 0,20
Фракции ГП, мкмоль/л:						
свободная	8,59 ± 0,43	9,80 ± 0,30	9,70 ± 0,20	12,70 ± 0,30	11,90 ± 0,10	12,80 ± 0,40
белковосвязанная	4,14 ± 0,16	4,10 ± 0,12	3,80 ± 0,10	3,00 ± 0,07	2,80 ± 0,06	3,10 ± 0,20
ГАГ, г/л	0,057 ± 0,003	0,060 ± 0,001	0,070 ± 0,002	0,087 ± 0,002	0,079 ± 0,001	0,084 ± 0,002

Примечание. ГП – гидроксипролин; ГАГ – гликозаминогликаны.

контрольной группы животных. Концентрация СФГП продолжает расти и достигает в абсолютных показателях ($9,70 \pm 0,20$) мкмоль/л, а в контрольной группе этот показатель составляет ($8,59 \pm 0,43$) мкмоль/л. В процентном отношении этот рост составил 113 % (табл. 1).

В этой группе животных содержание белковосвязанной фракции шиджроксипролина (БСФГП) снижается до ($3,80 \pm 0,10$) мкмоль/л, тогда как у животных контрольной группы этот показатель составляет ($4,14 \pm 0,16$) мкмоль/л (табл. 1).

Концентрация гликозаминогликанов (ГАГ) в межклеточном веществе продолжает расти по сравнению с предыдущей исследовательской группой и достигает 123 %, по отношению к норме, а в абсолютных показателях – ($0,070 \pm 0,002$) г/л (табл. 1).

У животных III группы активность коллагеназы в сыворотке крови продолжает расти и достигает ($4,90 \pm 0,10$) мкмоль/(л·ч), тогда как в контрольной группе – ($2,80 \pm 0,15$) мкмоль/(л·ч). Это составило 175 % относительно нормы (табл. 1).

Вместе с ростом активности коллагеназы обнаружено и рост содержания СФГП, что свидетельствует о повышении катаболической активности в метаболизме основного белка соединительной ткани, и характеризует разрушение коллагена. Так, содержание этой аминокислоты составило 148 % по отношению к показателям контрольной группы животных (табл. 1). В этой группе животных концентрация БСФГП – биохимического маркера синтетической фазы метаболизма коллагена снижается до 72 % по отношению к показателям контрольной группы животных. В абсолютных показателях это снижение составило ($3,00 \pm 0,07$) мкмоль/л, тогда как в контрольной группе этот показатель равен ($4,14 \pm 0,16$) мкмоль/л (табл. 1).

Изменения в показателях межклеточного вещества – ГАГ еще более выражены. Так, в III опытной группе содержание ГАГ равно ($0,087 \pm 0,002$) г/л, а в контрольной ($0,057 \pm 0,003$) г/л, в процентном отношении 153 % (табл. 1, рис. 4).

У животных IV группы активность коллагеназы остается на уровне показателей животных III группы с небольшими изменениями, хпj составило 171 % относительно показателей контрольной группы (табл. 1, рис. 5). Следует отметить, что содержание СФГП также остается на уровне показателей животных III группы с небольшим ростом – 139 % по отношению к показателям контрольной группы. В это же время содержание БСФГП еще больше снижается и составляет 68 % от нормы. Концентрация ГАГ несколько снижается по сравнению с показателями животных III группы (табл. 1).

У животных V группы активность коллагеназы остается без изменений относительно показателей животных III опытной группы, что составило 179 % относительно нормальных показателей. Содержание фракций гидроксипролина (свободной и белковосвязанной) также остаются на уровне показателей животных III исследовательской группы. Концентрация ГАГ у животных V группы исследования остается без особых изменений относительно показателей ГАГ контрольной группы животных (табл. 1).

Приведенные результаты патоморфологического исследования свидетельствуют о том, что введение Дипроспана в толщу ахиллова сухожилия вызывает развитие дегенеративно-дистрофических изменений сухожильных волокон и приводит к нарушению их структурно-функциональной организации, характеризующейся прогрессирующим течением как по времени, так и по кратности введения препарата. Эти патологические процессы сопровождаются появлением участков с меньшим количеством клеточных элементов, выразительной локальной волнистостью и дезорганизацией сухожильных волокон, вплоть до их разрушения. Перечисленные четкие гистоморфологические проявления дегенеративно-дистрофических изменений и дезорганизации сухожильных волокон наблюдались уже на 21 сутки после трех-

кратного введения Дипроспана и могут служить критериями оценки дегенеративно-дистрофического поражения сухожилия. Учитывая полученные нами данные, для моделирования дегенеративно-дистрофического поражения сухожилия мы предлагаем именно трехкратное введение Дипроспана.

Максимальные изменения метаболизма органических компонентов соединительной ткани при дегенеративно-дистрофических поражениях сухожилий наблюдались у животных III исследовательской группы (также после трехкратного введения Дипроспана). Данные показатели содержания коллагеназы, свободной и белковосвязанной фракций ГП, а также ГАГ сыворотки крови без значительных изменений остаются и у животных IV и V групп. Эти данные свидетельствуют об устойчивых дегенеративно-дистрофических изменениях, происходящих в ткани сухожилия уже после трехкратного ввода в его толщу 0,025 мл Дипроспана. Увеличение количества введений Дипроспана приводит уже к менее существенным изменениям в метаболических показателях дегенеративно-дистрофических изменений сухожилия, поэтому введение Дипроспана более 3-х раз с целью моделирования тендинопатии не целесообразно.

Существует множество моделей дегенеративно-дистрофического поражения сухожилий (тендинопатии). У всех моделей есть свои достоинства и недостатки. К тому же сама тендинопатия – это многофакторное поражение сухожилий. Поэтому вряд ли стоит рассчитывать, что какая-то единственная модель может позволить адекватно исследовать все аспекты тендинопатии. Некоторые модели требуют много времени, дороги или приводят к непостоянным результатам [4, 5]. Данная модель, как и остальные разработанные в мире модели могут использоваться для изучения лишь отдельных определенных аспектов тендинопатии, но не для того, чтоб делать глобальные выводы в отношении всех ее аспектов.

Предложенная нами модель тендинопатии характеризуется быстротой и простотой воспроизведения, низкой себестоимостью, высоким уровнем воспроизводимости, длительным сохранением дегенеративных изменений в сухожилии. Данная модель позволяет воспроизвести гистоморфологические и биохимические изменения, типичные для тендинопатии. В данном исследовании мы не анализировали субъективные ощу-

щения в области тендинопатии и влияние изменений в сухожилии на функциональные показатели. Это является определенным ограничением данного исследования и предполагается изучить в последующих экспериментах.

Выводы

Проанализировав полученные выше результаты по моделированию дегенеративного повреждения сухожилия путем введения в его толщу раствора Дипроспана, можно сделать выводы:

1. Введение Дипроспана в толщу сухожилия вызывает в последнем развитие дегенеративно-дистрофического процесса.

2. Четкие дегенеративно-дистрофические изменения сухожилия возникают уже на 7 сутки после трехкратного ввода в его толщу 0,025 мл Дипроспана.

3. Определены метаболические и патоморфологические изменения, которые могут служить критериями развития дегенеративно-дистрофического процесса ткани сухожилия.

4. Полученные нами данные дают основание рекомендовать предложенную нами технологию получения дегенеративно-дистрофического повреждения ткани сухожилия в качестве модели при последующих научных исследованиях.

Литература

1. Ackermann, P. W. , Renström P. Tendinopathy in sport. *Sports Health*. 2012 May;4(3):193–201. PubMed PMID: 23016086; PubMed Central PMCID: PMC3435934.
2. *Tendon Injuries*. Basic Science and Clinical Medicine. Editors: Maffulli, Nicola, Renstrom, Per, Leadbetter, Wayne B. (Eds.). Springer-Verlag London, 2005. 332 p. ISBN 978-1-84628-050-4. DOI10.1007/b137778.
3. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose*: Council of Europe (18.03.1986). – Strasburg, 1986. – 52 p.
4. Lui, P. P., Maffulli N., Rolf C. and Smith R. K. (2011), What are the validated animal models for tendinopathy? *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 21: 3–17. doi:10.1111/j.1600–0838.2010.01164.x.
5. *Creating an Animal Model of Tendinopathy by Inducing Chondrogenic Differentiation with Kartogenin* / T. Yuan, J. Zhang, G. Zhao, Y. Zhou, C. Q. Zhang, J. H. Wang // *PLoS One*. 2016 Feb 5;11(2):e0148557. doi: 10.1371/journal.pone.0148557. eCollection 2016. PMID: 26848746.
6. *Models for the study of tendinopathy* / R. C. Dirks, S. J. Warden // *J. Musculoskelet Neuronal Interact*. 2011 Jun;11(2):141–9. Review. PMID: 21625051.

Поступила 04.12.2019 г.