

## **ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННЫХ СТРУКТУР СУСТАВА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА**

**Захватов А.Н.<sup>1</sup>, Мосина Л.М.<sup>1</sup>, Тарасова Т.В.<sup>1</sup>, Саушев И.В.<sup>1</sup>,  
Хайдар Д.А.<sup>2</sup>, Паршина А.Ю.<sup>1</sup>, Коршунова А.А.<sup>1</sup>, Чигажов А.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: zachvatan78@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, e-mail: dhaidarA@mail.ru

Цель работы – оценка влияния нового производного 3-гидроксипиридина на гистоморфометрические изменения суставных тканей при посттравматическом артрите в эксперименте. Исследование терапевтических эффектов нового соединения проводилось на 59 экспериментальных животных, предварительно разделенных на 5 групп. Моделирование посттравматического артрита проводили с использованием методики Г.М. Дубровина. Рассекали кожу, фасцию и капсулу сустава с последующим введением иглы Дюфо, обточенной под углом 90, по направлению на медиальный мыщелок бедренной кости. Перфорировали суставной хрящ до упора в субхондральную кость, после чего иглу удаляли и производили послойное ушивание тканей. Оценка морфологических изменений соединительнотканых структур сустава проводили посредством применения гистологического метода в сочетании с изучением основных морфометрических показателей суставных тканей. При воспроизведении экспериментального посттравматического артрита определяли дегенеративно-дистрофические изменения, характеризующиеся формированием глубоких узур с преобладанием фиброзирующих процессов хрящевой ткани и образованием регенерата, распространяющегося за область дефекта, нарушением citoархитектоники хрящевого матрикса и утолщением синовиальной оболочки. Применение нового производного 3-гидроксипиридина в раннем посттравматическом периоде способствует ограничению прогрессирования дегенеративно-дистрофических процессов с последующим восстановлением нарушенного внутрисуставного гомеостаза. В связи с полученными результатами поиск новых лекарственных препаратов, оказывающих сочетанное влияние на различные звенья патогенеза данной патологии, представляется актуальным. Новое производное 3-гидроксипиридина способствует развитию в области травматического дефекта суставного хряща фиброзно-хрящевой ткани с уменьшением выраженности воспалительных изменений в синовиальной оболочке.

Ключевые слова: артрит, хондроцит, синовиальная оболочка, антиоксидантная терапия, 3-гидроксипиридин.

*Исследование выполнено в рамках прикладной НИР з/б 13-24, утвержденной приказом ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» №1211-л от 20.03.2024 г.*

## **HISTOMORPHOMETRIC CHANGES IN CONNECTIVE TISSUE STRUCTURES OF THE JOINT IN EXPERIMENTAL POST-TRAUMATIC ARTHRITIS AGAINST THE BACKGROUND OF THE USE OF A NEW 3-HYDROXYPYRIDINE DERIVATIVE**

**Zakhvatov A.N.<sup>1</sup>, Mosina L.M.<sup>1</sup>, Tarasova T.V.<sup>1</sup>, Saushev I.V.<sup>1</sup>,  
Khaidar D.A.<sup>2</sup>, Parshina A.Yu.<sup>1</sup>, Korshunova A.A.<sup>1</sup>, Chigazhov A.N.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>FGBOU VO «National Research Ogarev Mordovia State University», Saransk, e-mail: zachvatan78@mail.ru;

<sup>2</sup>FGBOU VO «Peoples' Friendship University of Russia», Moscow, e-mail: dhaidarA@mail.ru

The purpose of the work was to evaluate the effect of a new 3-hydroxypyridine derivative on histomorphometric changes in articular tissues in posttraumatic arthritis in an experiment. The study of the therapeutic effects of the new compound was conducted on 59 experimental animals, previously divided into 5 groups. Modeling of posttraumatic arthritis was carried out using the technique of G.M. Dubrovin. The skin, fascia and capsule of the joint were dissected, followed by the introduction of a Dufo needle, turned at an angle of 90, towards the medial condyle of the femur. The articular cartilage was perforated all the way into the subchondral bone, after which the needle was removed and layered suturing of the tissues was performed. The assessment of morphological changes in the connective tissue structures of the joint was carried out through the use of a histological method in combination with the study of the main morphometric parameters of articular tissues. When reproducing experimental post-traumatic arthritis, degenerative-dystrophic changes were determined, characterized by the

formation of deep usures with a predominance of fibrous processes of cartilage tissue and the formation of regenerate extending beyond the defect area, violation of the cytoarchitectonics of the cartilaginous matrix and thickening of the synovial membrane. The use of a new derivative of 3-hydroxypyridine in the early post-traumatic period helps to limit the progression of degenerative-dystrophic processes with subsequent restoration of impaired intraarticular homeostasis. In connection with the results obtained, the search for new drugs with a combined effect on various links in the pathogenesis of this pathology seems relevant. A new derivative of 3-hydroxypyridine promotes the development of fibrous-cartilaginous tissue in the area of traumatic articular cartilage defect with a decrease in the severity of inflammatory changes in the synovial membrane.

Keywords: arthritis, chondrocyte, synovial membrane, antioxidant therapy, 3-hydroxypyridine.

*The study was carried out within the framework of applied research r/b 13-24, approved by the order of MSU them. N.P. Ogaryov 1211-l from 20.03.2024.*

## **Введение**

Посттравматический остеоартрит представляет собой актуальную проблему современной медицины, имея высокую социально-экономическую значимость, что обуславливает большой интерес в поиске новых методов консервативного лечения данной патологии [1]. Травма выступает в качестве триггерного фактора, запускающего каскад воспалительных изменений, в том числе оксидативный стресс, способствующих формированию дегенеративно-дистрофических изменений в поврежденном суставе [2, 3]. Формирующиеся патологические изменения ведут к нарушению гистоморфометрических процессов (что проявляется дегенерацией клеточных структур хондроцитов), уменьшению их пролиферативного потенциала, утолщению синовиальной оболочки с последующим формированием необратимых фиброзных изменений в соединительнотканых структурах сустава [4, 5]. С учетом данных патогенетических механизмов закономерен вопрос о необходимости включения в схему терапии препаратов, производящих не только противовоспалительное, но и антиоксидантное действие.

**Цель исследования** – оценка влияния нового производного 3-гидроксипиридина (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния-4-изобутилфенилпропаноат) на гистоморфометрические изменения суставных тканей при посттравматическом артрите в эксперименте.

## **Материалы и методы исследования**

Экспериментальное исследование проводили на 59 белых беспородных крысах обоего пола, содержащихся в условиях вивария ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» при температуре воздуха в помещении 22–23<sup>0</sup>С и относительной влажности 40–60%. Исследование выполняли в соответствии с основными пунктами, изложенными в приказе Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Моделирование посттравматического остеоартрита осуществляли по методике Г.М. Дубровина под общим наркозом с использованием препарата «Золетил 100», вводимого внутримышечно в дозе 0,03 мл [6]. Проводили рассечение кожи, фасции и капсулы сустава с последующим введением иглы

Дюфо, обточенной под углом  $90^0$ , по направлению на медиальный мыщелок бедренной кости. Перфорировали суставной хрящ до упора в субхондральную кость, после чего иглу удаляли и производили послойное ушивание тканей.

Новое производное 3-гидроксипиридина (НПГ) – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния-4-изобутилфенилпропаноат – было получено путем химического синтеза в АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ», получен патент на изобретение RU № 2814495 [7]. Для сравнительной оценки эффективности НПГ были выбраны препараты ибупрофен и мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат), производящие противовоспалительное и антиоксидантное действие соответственно.

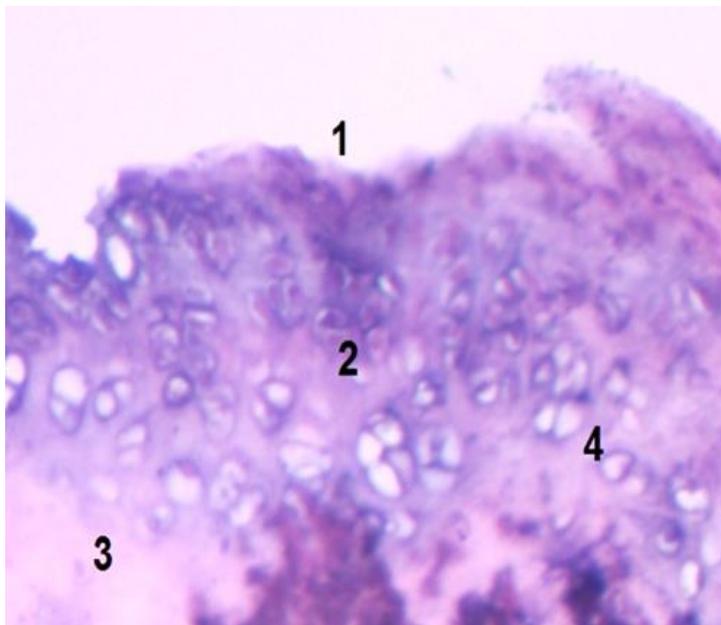
Животные были разделены на 5 групп: интактная группа (n=15), имеющая здоровый сустав, и группы № 2–5, в которых осуществляли воспроизведение экспериментальной модели. Во 2-й группе (n=11) лечение не проводили. Особям 3-й группы (n=11) осуществляли внутрижелудочное (в/ж) введение ибупрофена в дозе, эквивалентной 2% показателя острой токсичности ( $LD_{50}$ ). В 4-й группе (n=11) проводили в/ж введение мексидола в дозе 5% показателя  $LD_{50}$ . На животных 5-й группы (n=11) оценивали эффективность НПГ, вводимого в/ж в дозе, соответствующей 5% показателя  $LD_{50}$ . Курс лечения составил 15 суток. Вывод животных из эксперимента проводили на 28-е сутки путем декапитации.

Оценку патоморфологических изменений суставного хряща и синовиальной оболочки проводили с предварительной декальцинацией этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), обезвоживанием в серии этанола, просветлением в ксилоле и заливкой в парафин полученных тканей с последующим окрашиванием серийных срезов гематоксилином и эозином. Исследование выполняли с использованием светового микроскопа исследовательского класса «HUMASCOPE ADVANCED LED» (Human GmbH, Германия). Морфометрическую оценку изменений суставного хряща и синовиальной оболочки проводили при увеличении препаратов в 400 раз с калибровкой изображений посредством использования объект-микрометра. Численную плотность хондроцитов определяли с применением методики Г.Г. Автандилова (1990).

Полученные морфометрические показатели обрабатывали с использованием прикладного программного комплекса SPSS Statistic 20.0 (IBM, USA) посредством однофакторного дисперсионного анализа и параметрического критерия Тьюки. Критический уровень значимости был равен 0,001.

**Результаты исследования и их обсуждение.** После моделирования травмы сустава в условиях эксперимента на 28-е сутки при макроскопической оценке в области нанесения травмы определяли фиброзную ткань, распространяющуюся за пределы дефекта. Вне дефекта обнаружены узур, доходящие до глубокой хрящевой зоны. В поверхностной зоне

визуализировалась потеря структуры бесклеточной пластики. В промежуточной зоне определяли деструкцию хрящевых клеток. В субхондральной кости визуализировались остеолитические очаги, на фоне которых определяли начальные признаки остеосклероза (рис. 1).



*Рис. 1. Суставной хрящ коленного сустава крысы опытной серии без лечения. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ . 1 – разрушение бесклеточной пластинки с образованием узур; 2 – нарушение зональной структуры хряща, исчезновение колонковых структур; 3 – фибриллярные бесклеточные участки промежуточной зоны; 4 – очаги некроза, пустые клеточные лакуны*

При морфометрическом анализе выявляли достоверное увеличение общей толщины хряща на 35,9% ( $p < 0,001$ ) относительно аналогичного показателя интактных особей. При этом отмечали утолщение поверхностной, промежуточной и глубоких хрящевых зон на 107,1% ( $p < 0,001$ ), 31,8% ( $p < 0,001$ ) и 25,5% ( $p < 0,001$ ) соответственно по отношению к референсным значениям с нарушением их цитоархитектоники. Данные изменения обусловлены дезорганизацией межклеточного матрикса в сочетании с гипергидратацией основного вещества и коллагеновых волокон. Кроме того, при оценке состояния синовиальной оболочки определяли увеличение ее толщины на 173,0% ( $p < 0,001$ ) относительно интактных особей, что свидетельствует о хроническом синовите и начальных процессах фиброзировании (таблица).

Влияние нового производного 3-гидроксипиридина при экспериментальном посттравматическом артрите на морфометрические показатели суставного хряща и синовиальной оболочки

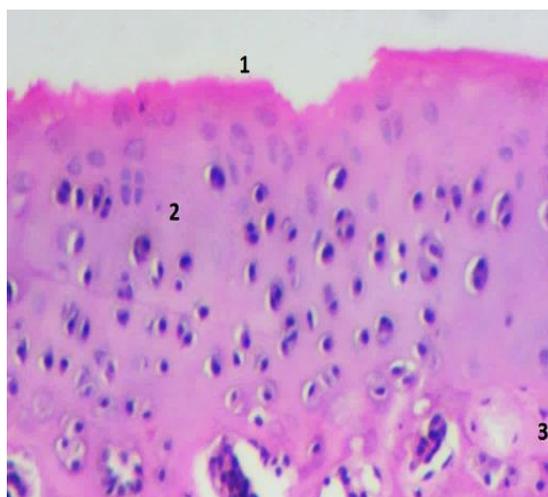
Показатель	Опытные серии
------------	---------------

	Интактные животные (n=15)	Контроль (n=11)	Ибупрофен (n=11)	Мексидол (n=11)	Соединение 1 в/ж (n=11)
Общая толщина хряща, мкм	181,54±2,03	246,36±2,32*	219,61±2,54* <sup>A</sup>	198,58±1,73* <sup>^ A</sup>	187,36±2,10* <sup>^ AB</sup>
Поверхностная зона, мкм	23,15±1,59	47,96±1,58*	42,69±0,83* <sup>A</sup>	30,98±0,61* <sup>^ A</sup>	24,76±0,98 <sup>^ AB</sup>
Промежуточная зона, мкм	86,24±1,93	113,63±1,77*	99,27±1,05* <sup>A</sup>	95,19±1,10* <sup>^ A</sup>	89,35±1,98* <sup>^ AB</sup>
Глубокая зона, мкм	69,10±0,97	86,71±1,42*	76,68±1,64* <sup>A</sup>	72,29±1,41* <sup>^ A</sup>	70,33±0,85 <sup>^ AB</sup>
Толщина покровного слоя синовиальной оболочки, мкм	17,56±0,55	47,94±0,82*	34,54±1,05* <sup>A</sup>	32,81±0,73* <sup>^ A</sup>	18,65±0,42 <sup>^ AB</sup>
Численная плотность хондроцитов, мм <sup>2</sup>	218,98±3,84	171,80±1,70*	191,48±1,51* <sup>A</sup>	233,33±2,49* <sup>^ A</sup>	238,90±2,14* <sup>^ A</sup>

Примечание: \* – достоверность различия к норме ( $p < 0,001$ ); A – достоверность различия по отношению к показателям серии без лечения ( $p_1 < 0,001$ ); ^ – достоверность различия по отношению к ибупрофену ( $p_2 < 0,001$ ); B – достоверность различия по отношению к мексидолу ( $p_3 < 0,001$ ) (одномерный дисперсионный анализ (ANOVA), критерий Тьюки).

В 3-й группе при применении ибупрофена при микроскопии суставного хряща визуализировалось отсутствие его четкой зональности. Так, в поверхностной зоне отмечали явления деструкции бесклеточной пластинки, определяли глубокие узуры, достигающие до промежуточной зоны, в которой выявляли беспорядочно расположенные хондроциты, запустевшие лакуны и сформированные участки бесклеточных зон. В глубокой зоне сохранялись хондроциты с признаками дегенеративных изменений. В области субхондральной кости определяли чередование остеолитических очагов с зонами остеосклероза, имеющими ограниченный характер. В капсуле и синовиальной оболочке находили скопление клеток макрофагального типа, отмечалась избыточная пролиферация кровеносных сосудов с утолщением их стенок. В области покровного слоя визуализировались синовиоциты с признаками дегенеративных изменений (рис. 2).

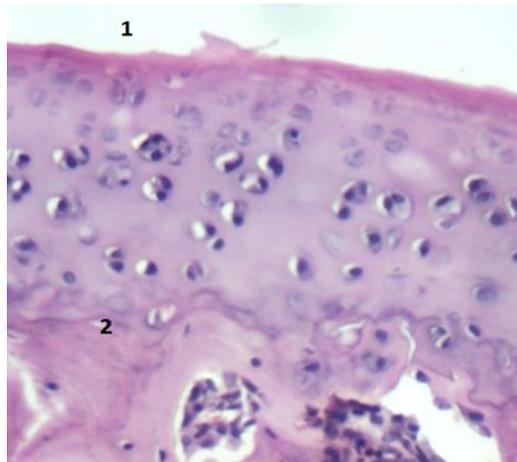
При морфометрическом исследовании отмечали некоторое уменьшение толщины общей толщины хряща на 10,9% ( $p_1 < 0,001$ ) относительно серии контроля. Кроме того, определяли увеличение численной плотности хондроцитов до  $191,48 \pm 1,51$  в  $1 \text{ мм}^2$ , что на 11,5% ( $p_1 < 0,001$ ) выше аналогичного показателя контрольной серии, но на 12,6% ( $p < 0,001$ ) ниже серии интактных животных. Толщина покровного слоя синовиальной оболочки уменьшалась на 28% ( $p < 0,001$ ) относительно серии без лечения (таблица).



*Рис. 2. Суставной хрящ коленного сустава крысы при применении ибупрофена. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ . 1 – повреждение поверхностной зоны хряща; 2 – пустые лакуны в поверхностной и промежуточной зоне; 3 – разрастание фиброзной ткани*

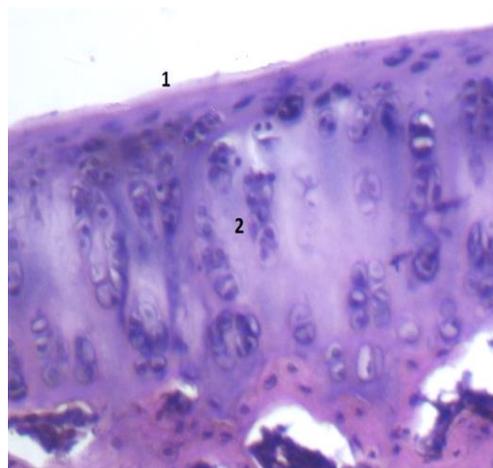
В 4-й серии при применении мексидола обнаруживали ограничение процессов вторичных деструктивных изменений, торможение процессов разрастания тканей мезенхимального происхождения. Однако в поверхностной хрящевой зоне были определены явления деструкции бесклеточной пластинки. Отмечали сохранение зональной структуры хрящевого матрикса в промежуточной и глубокой зонах, а также уменьшение общего числа разрушенных и дегенеративно-измененных хондроцитов. Кроме того, в субхондральной кости отсутствовали очаги остеосклероза. В промежуточной зоне на фоне применения мексидола определялись репаративные изменения, характеризующиеся увеличением количества хондроцитов и изогенных групп (рис. 3).

Морфометрическое исследование суставных тканей при применении мексидола выявило уменьшение толщины общей хрящевой зоны на 19,4% ( $p_1 < 0,001$ ) относительно особой группы контроля и на 9,6% ( $p_2 < 0,001$ ) относительно серии применения ибупрофена. Однако, несмотря на положительную динамику, сохранялось преобладание данного показателя над интактными особями на 9,4% ( $p < 0,001$ ). Кроме этого, при оценке толщины покровного слоя синовиальной оболочки отмечалось ее уменьшение на 31,6% ( $p_1 < 0,001$ ) относительно серии без лечения, но она на 86,8% ( $p < 0,001$ ) превышала аналогичный показатель здоровых особей, что свидетельствует о недостаточном терапевтическом эффекте и сохранении признаков хронического воспаления (таблица).



*Рис. 3. Суставной хрящ коленного сустава крысы при применении мексидола. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ . 1 – нарушение целостности поверхностной бесклеточной пластинки; 2 – участки остеосклероза субхондральной кости*

При применении НПГ микроскопически дефект в области наносимой травмы был выполнен регенератом, ограниченным размерами поврежденного участка, составляющими которого были хондроциты и фиброзная ткань. Вне зоны повреждения суставной хрящ имел равномерную окраску с сохранением нормальной цитоархитектоники и отсутствием очагов деструкции. Поверхностная бесклеточная пластинка сохранила свою равномерность и структуру без признаков истончения и отслойки. Хондроциты составляли изогенные группы, лишь единичные из них имели дистрофические изменения. В промежуточной зоне хряща наблюдались репаративные процессы, характеризующиеся увеличением количества изогенных групп, представленных скоплением хондроцитов с нормальными ядрами (рис. 4).



*Рис. 4. Суставной хрящ коленного сустава крысы при применении НПГ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ . 1 – сохранная поверхностная бесклеточная пластинка; 2 – вертикальная столбчатость хондроцитов промежуточной зоны*

При морфометрической оценке в серии применения НПГ определялось достоверное уменьшение общей толщины хряща на 23,9% ( $p_1 < 0,001$ ) относительно показателей серии без лечения, что на 13% ( $p_2 < 0,001$ ) ниже аналогичных значений групп применения ибупрофена. Кроме того, отмечалось уменьшение толщины синовиальной оболочки на 61,1% ( $p_1 < 0,001$ ) относительно контрольной серии с приближением изучаемого показателя к интактным значениям (таблица).

**Заключение.** Таким образом, применение нового производного 3-гидроксипиридина способствует развитию в области травматического дефекта суставного хряща фиброзно-хрящевой ткани с уменьшением выраженности воспалительных изменений в синовиальной оболочке.

### Список литературы

1. Головач И.Ю., Егудина Е.Д. Посттравматический остеоартрит: современные представления о развитии, прогрессировании и терапевтических подходах // Политравма. 2019. №1. С. 82-89.
2. Каратеев А.Е., Черникова А.А., Макаров М.А. Посттравматический остеоартрит: эпидемиология, патогенез, клиническая картина, подходы к фармакотерапии // Современная ревматология. 2023. Т.84, №1. С. 108-116.
3. M.Y. Ansari, N. Ahmad, T.M. Haqqi. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols // Biomed and Pharmacotherapy. 2020. Vol. 129. P.110452. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110452.
4. Y.A. Rim, Y. Nam, J.H. Ju. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, №7. P. 2358. DOI: 10.3390/ijms21072358.
5. Coppola C, Greco M, Munir A, Musarò D, Quarta S, Massaro M, Lionetto MG, Maffia M. Osteoarthritis: Insights into Diagnosis, Pathophysiology, Therapeutic Avenues, and the Potential of Natural Extracts // Curr Issues Mol Biol. 2024. Vol. 46. Is. 5. P. 4063-4105. DOI: 10.3390/cimb46050251.
6. Дубровин Г.М., Блинков Ю.А., Нетяга С.В., Нетяга А.А. Обоснование применения миелопида для профилактики посттравматического остеоартроза (экспериментальное исследование) // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2005. № 2. С. 60–62.
7. Скачилова С.Я., Захватов А.Н., Яснецов В.В., Симакина Е.А., Проскурина О.В., Шилова Е.В., Захаркин И.А., Паршина А.Ю. Средство, обладающее противовоспалительным, антиоксидантным и антиульцерогенным действием, способностью ингибировать развитие

дегенеративно-деструктивных процессов тканей, представляющее собой 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния-4-изобутилфенилпропаноат // Патент РФ № 2814495. Патентообладатель АО «ВНЦ БАВ». 2024. Бюл. № 7.