

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

КРЫЛОВ

Павел Андреевич

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ
«СУСТАВНОЙ ХРЯЩ – СИНОВИАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ»
В УСЛОВИЯХ НОРМАЛЬНЫХ И ПОВРЕЖДАЮЩИХ НАГРУЗОК НА
СУСТАВ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
В.В. Новочадов**

Волгоград – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1. Лубрикативная функция суставного хряща в норме и при измененных нагрузках на сустав (обзор литературы)	11
1.1 Роль суставного хряща в обеспечении движения в сустава.....	11
1.2 Синтетическая функция хондроцитов в обеспечении физиологической и репаративной регенерации в суставного хряща.....	15
1.3 Роль синовиальной жидкости в обеспечении функций суставного хряща.....	20
Глава 2. Материал и методы исследования.....	32
2.1 Характеристика материала и экспериментальная модель.....	33
2.2 Морфологические методы исследования суставного хряща	36
2.3 Методы разработки функциональной модели и обоснование способа воздействия на поврежденную суставную поверхность при экспериментальном остеоартрозе.....	39
2.4 Методы получения и проверки физико-химических свойств <i>in vitro</i> субстанции содержащей белки сурфактанта.....	40
2.5 Математическая обработка данных.....	41
Глава 3. Морфофункциональная характеристика суставного хряща в норме и при воздействии на коленный сустав.....	44
3.1 Морфофункциональная характеристика суставного хряща в интактном состоянии	44
3.2 Морфофункциональная характеристика суставного хряща в условиях повышенной механической нагрузки.....	54
3.3 Морфофункциональная характеристика суставного хряща в условиях снижения лубрикативных свойств синовиальной жидкости.....	58
Глава 4. Функциональная модель ремоделирования суставного хряща при остеоартрозе и оценка лубрикативных свойств субстанции, содержащей белки сурфактанта, <i>in vitro</i>	69

4.1 Разработка функциональной модели управления синтетической функции хондроцитов в суставном хряще.....	69
4.2 Поиск и обоснование аналогов биомолекул обладающих лубрикативными функциями	75
4.3 Анализ и оценка субстанции, содержащей сурфактантные белки в качестве лубриканта для синовиальной жидкости in vitro	78
Глава 5 Морфофункциональная характеристика суставного хряща после введения субстанции содержащей сурфактантные белки при экспериментальном остеоартрозе.....	82
5.1 Морфология суставного хряща при экспериментальном остеоартрозе в условиях повышения лубрикативных свойств синовиальной жидкости.....	82
5.2 Морфофункциональная характеристика суставного хряща с помощью 3D-реконструкций при экспериментальном остеоартрозе в условиях повышения лубрикативных свойств синовиальной жидкости.....	91
Обсуждение полученных результатов.....	98
Заключение.....	107
Список сокращений.....	109
Список литературы.....	110

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

Суставной хрящ это - многокомпонентная система, которая функционирует за счет сложных физиологических, клеточных и молекулярных регуляторных механизмов, обеспечивающая работу коленного сустава [2, 8, 14, 24, 33, 85, 96; 102, 156, 169, 174]

Изменение или нарушение работы всех компонентов системы приводит к разрушению суставного хряща, а именно к развитию остеоартроза (ОА) – современной проблеме нарушения работы опорно-двигательного аппарата, что негативно отражается на двигательной активности. При высоких физических нагрузках или механических повреждениях - перерезка передней крестообразной связки или введение медицинского талка в синовиальную полость, происходит быстрое стирание суставной поверхности за счет увеличения силы трения, давления или смещения соприкасающихся поверхностей сустава. Последствием этого становится разрушение суставной поверхности и поверхностной зоны суставного хряща, что приводит к утрате основного вещества хрящевого матрикса с закономерным нарушением рельефа суставной поверхности. Разрушение хрящевого матрикса суставного хряща помимо механического воздействия так же сопровождается нарушением баланса между синтезом хондроцитами матриксных металлопротеиназ (ММП), участвующих в резорбции основного вещества хрящевого матрикса и их ингибиторов (ТИМП) подавляющих активность ферментов участвующих в резорбции хрящевого матрикса. [9, 38, 43, 54, 66, 74, 85, 95, 167].

В работе сустава, важную роль выполняет синовиальная жидкость (СЖ), заполняющая суставную полость и выполняющая роль гидродинамической смазки. Физико-химические свойства СЖ обеспечивают эффективную работу сустава, предотвращая стирание суставной поверхности (путем снижения силы трения скольжения), обеспечивая плавное движение всех элементов сустава.

Изменение лубрикативных свойств СЖ приводит к физическим и биохимическим нарушениям суставной поверхности и самого суставного хряща [11, 25, 26, 49, 91, 101].

Многообразие методов, применяемых в современной медицине для лечения и восстановления суставного хряща при остеоартрозе: противовоспалительная терапия [81], введение в суставную полость структурно-модифицирующих препаратов [6, 17, 31, 36, 47, 48, 70, 73, 99, 123, 142, 157, 159, 165], малоинвазивные артроскопические вмешательства [13, 34, 135] применение тканеинженерных конструкций – скаффолдов [4, 19, 21, 22, 121, 125, 133, 153, 181], являются свидетельством достаточной сложности этиопатогенеза этого заболевания и лишь частичной удовлетворенности клиницистов результатами лечения в конкретных случаях заболевания. Поэтому на сегодняшний день не теряется актуальность поиска и разработки препаратов способных, путем экзогенного введения в суставную полость, запускать процессы восстановления суставного хряща и улучшать лубрикативные свойства СЖ и суставной поверхности [23, 55, 58, 78, 88, 123].

В результате возникает вопрос, каким образом происходит и как запустить и поддерживать физиологическую регенерацию и восстановление суставного хряща, какие механизмы активируются и запускаются в хондроцитах поверхностной зоны суставного хряща и как на это влияет изменение лубрикативных свойств СЖ, и какие методы использовать для оценки эффективности вискоапплиментарной терапии. [5, 15, 17, 18, 30, 63, 173].

В связи с этим существует необходимость поиска природных биомолекул для управления процессами идущих в суставном хряще, основанных на понимании клеточных и молекулярных механизмов регуляции в хрящевой ткани. Механизмы следует искать в морфофункциональных преобразованиях суставного хряща в различных условиях (повышенной физической нагрузке). Исследование в этом направлении может привести к расширению современных представлений о механизмах ремоделирования суставного хряща при различных физических нагрузках и изменении (улучшении) физико-химических свойств СЖ.

Цель работы – установить закономерности морфофункциональных изменений суставного хряща в условиях ремоделирования в норме, при физической нагрузке и модификации физико-химических свойств синовиальной жидкости.

Задачи исследования

1. Дать структурно-функциональную характеристику суставному хрящу в норме и при физических нагрузках на сустав.
2. Дать характеристику синтетической функции хондроцитов суставного хряща в норме и при физических нагрузках на сустав.
3. Разработать функциональную модель ремоделирования суставного хряща при экспериментальном остеоартрозе и обосновать на её основе способ воздействия на суставной хрящ.
4. Получить и оценить лубрикативные свойства субстанции, содержащей белки сурфактанта, *in vitro*
5. На основании изучения лубрикативных свойств субстанции, содержащей белки сурфактанта, *in vitro*, оценить её эффективность при экспериментальном остеоартрозе у крыс.

Научная новизна работы

Впервые в работе используется технологии ступенчатого высокоточного сошлифования с последующей обработкой и получения 3D-реконструкций суставного хряща для качественного и количественного анализа морфометрических показателей суставного хряща.

В работе впервые произведено сопоставление морфологических особенностей участков мозаично организованного хряща. Разработана функциональная модель ремоделирования суставного хряща в норме.

Впервые в работе описан новый способ получения субстанции содержащей белки сурфактанта (ССБС), проведена оценка и анализ физико-химических свойств синовиальной жидкости *in vitro* до и после добавления ССБС. Дана

морфофункциональная характеристика суставного хряща после внутрисуставного введения ССБС, для улучшения лубрикативных свойств СЖ при экспериментальном ОА коленного сустава у крыс.

Научно-практическая значимость

В результате исследований была предложена функциональная модель управления синтетической функции хондроцитов, которая дополняет и объединяет в себе данные о протекании и регуляции основных процессов в хондроцитах, что позволяет прогнозировать ответную реакцию хондроцитов при воздействии на них внутренних (в суставном хряще) и внешних (физических или поступающих из СЖ) факторов

В результате исследования нами были выявлены специализированные участки – «микрокластеры», характеризующиеся более интенсивными процессами образования основного вещества хрящевого матрикса. Мозаичное расположение и особенности трехмерного строения таких микрокластеров являются основой для понимания векторов сил, действующих в суставном хряще при перераспределении статических и динамических нагрузок в процессе функционирования крупных суставов.

Разработан новый метод выделения, и последующие определение физико-химических свойств синовиальной жидкости после структурной модификации ССБС.

Получены новые данные и дана морфофункциональная характеристика суставного хряща при остеоартрозе коленного сустава в условиях повышенной нагрузки на сустав (перерезка передней крестообразной связки) и стирания суставной поверхности (введение медицинского талька), а также при внутрисуставном введении в синовиальную жидкость ССБС.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В морфологии суставного хряща коленного сустава можно выделить особые участки – «микрокластеры» (мозаичное строение), отличающиеся от

окружающей ткани относительно более высокой плотностью хрящевого матрикса и численной плотностью хондроцитов в нагружаемых и не нагружаемых областях, в норме и при повышенных нагрузках.

2. В условиях повышенных нагрузок на коленный сустав в результате ППКС, происходит снижение синтетической активности хондроцитами хрящевого матрикса поверхностной зоны - лубрицина и промежуточной зоны - агрекана. При внутрисуставном введении стерильного талька происходит изменение метаболической активности хондроцитов (преимущественно – в промежуточной зоне) между синтезом матриксных металлопротеиназ (ММП-9) и их ингибиторов (ТИМП-1) в суставном хряще.

3. Функциональная модель управления синтетической функцией хондроцитов позволяет выделить управляющие воздействия на хондроциты, что позволяет спрогнозировать ответную реакцию хондроцитов на то или иное воздействие с возможностью предсказания ответного запуска основных процессов в суставном хряще: синтез и распад хрящевого матрикса, дифференцировка, пролиферация, а также апоптоз хондроцитов.

4. Субстанцию, содержащую белки сурфактанта, возможно получить с помощью забора стеклянной палочкой с шероховатой поверхностью со специальным элюентом и последующей очисткой обращено-фазной и эксклюзионной хроматографии, снижающих количество примесей в виде провоспалительных факторов. ССБС улучшает лубрикативные свойства СЖ, за счет небольшого снижения вязкости, силы поверхностного натяжения, а также силы трения скольжения при подборе оптимальном соотношения компонентов.

5. Внутрисуставное введение лубриканта на основе ССБС, позволяет частично корректировать нарушения суставной поверхности суставного хряща, за счет уменьшения силы трения между суставными поверхностями, а также восстановление метаболической активности хондроцитов в сторону повышения синтеза ингибиторов матриксных металлопротеиназ при экспериментальном ОА.

Внедрение

Материалы диссертации внедрены в учебный процесс на кафедре биоинженерии и биоинформатики ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет». ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ на кафедре травматологии и ортопедии, а также в проведении научно-исследовательских работ и инновационной деятельности в НИИ Травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «СГМУ им. В.И. Разумовского» МЗ РФ.

Апробация результатов исследования

Основные результаты исследования докладывались и обсуждались на международной научно-практической конференции "Современные биотехнологии для науки и практики" в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. академика И.П. Павлова (г. Санкт-Петербург, 2014); 19-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» в Пущинском научном центре РАН. Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пущино, 2015); XII Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Управление большими системами» в Волгоградской государственном университете (г. Волгоград, 2015); 20-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» в Пущинском научном центре РАН. Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пущино, 2016); международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова (г. Москва, 2016)

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ в отечественной печати, из них 4 работы в журналах, включенных в перечень ВАК РФ.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы описания материала и методов исследования, 3-х глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов и заключения. В работе имеется 16 таблиц, 32 рисунка. Список литературы включает в себя 182 источников (в том числе 50 на русском языке и 132 - зарубежных)

Глава 1.

ЛУБРИКАТИВНАЯ ФУНКЦИЯ СУСТАВНОГО ХРЯЩА В НОРМЕ И ПРИ
ИЗМЕНЕННЫХ НАГРУЗКАХ НА СУСТАВ

(Обзор литературы)

Получение повреждений и утрата тканей в суставном хряще относится к серьезным проблемам современной восстановительной медицины. Остеоартроз (ОА) на сегодняшний день лидирует в списке наиболее распространенных заболеваний опорно-двигательного аппарата, что обуславливает многочисленные исследования, направленные на поиск эффективных способов его профилактики и лечения. Многообразие механизмов повреждения суставного хряща при ОА, равно как и динамическая смена морфологических феноменов, определяющих клинику ОА, так или иначе, формируются вокруг ведущего звена патогенеза ОА – недостаточности физиологической и репаративной регенерации суставного хряща в условиях повышенной его деструкции [18, 80, 90, 164]

1.1. Роль суставного хряща в обеспечении движения в суставе

Суставной хрящ является тканью, обеспечивающей в наибольшей степени проявление суставом его функциональных особенностей. Поверхность суставного хряща гладкая и скользящая, плотно-эластичная и устойчивая к деформациям, что делает суставной хрящ устойчивым к широкому спектру сил, включающих в себя сдвиг, сжатие и растяжение. Суставной хрящ распределяет нагрузку и смазывает контактирующие поверхности, выполняя двигательную функцию.

Функциональные особенности хряща напрямую зависят от его структурных особенностей. Одна из особенностей заключается в том, что хрящевая ткань лишена сосудов и нервных элементов. Хрящевая ткань состоит из воды (60% - 85%), богатого хрящевого матрикса и относительно небольшого объема клеток - хондроцитов. Основные компоненты хрящевого матрикса включает в себя коллаген II-типа и протеогликаны (аггрекан) [182], а также белки поверхностной зоны суставного хряща (лубрицин). Другие компоненты хрящевого матрикса включают в себя олигомерный белок, линейный хрящевой белок, гиалуроновую

кислоту. Отсутствие кровеносных сосудов в хрящевой ткани объясняется ее особым механическим положением: значительные циклические нагрузки несовместимы с работой тока крови по сосудистой системе, подавление ангиогенеза осуществляется хондроцитами, путем секреции специфического белка. Поддержание гомеостаза хрящевого матрикса регулируется хондроцитами за счет ферментативной деградации и секреции компонентов матрикса. Клетки составляют лишь 5% -10% суставного хряща по объему, но плотность клеток уменьшается с возрастом. Эти клетки обладают низкими пролиферативными и метаболическими способностями [37, 40, 61, 95, 98].

Источниками сигналов, регулирующих метаболизм хондроцитов, считаются изменения химического состава СЖ и/или суставного давления. Достаточно тонкий механизм регуляции синтетических процессов в хондроцитах может дифференцированно реагировать на уменьшение содержания в основном веществе протеогликанов, гиалуроновой кислоты или потерю коллагена II-типа [163].

Суставной хрящ является анизотропной и гетерогенной тканью на разных уровнях. Структура хрящевого матрикса, фенотип хондроцитов и формы клеток колеблется в пределах каждой зоны. Морфологические различия в ткани суставного хряща на протяжении от его поверхности до субхондральной костной пластинки позволяет выделить три зоны: поверхностную (тангенциальную, зону скольжения), промежуточную (радиальную) и глубокую зону (кальцификации хряща). Последние биологические и механические исследования показывают, что зональная организация имеет и функциональную основу [124].

В поверхностной зоне, преобладает коллаген II-типа, ориентированный параллельно с суставной поверхностью и белки поверхностной зоны (БПЗ/Лубрицин/PRG4) [127]. Фибриллы коллагена ориентированы в поверхностную зону для сопротивления силам сдвига на суставной поверхности, созданным шарнирным соединением. В поверхностной зоне находится небольшая плотность клеток, где хондроциты имеют уплощенную форму и направлены перпендикулярно по отношению к поверхности. Центральная часть 40% - 60%

хряща, включает в себя промежуточную зону содержащая вытянутый коллаген II-типа и закругленные клетки. Остальные 30% составляет глубокая зона, где происходит минерализация.

Хрящевой матрикс каждой зоны суставного хряща различается по соотношению концентрации воды, протеогликанов и коллагена. Хондроциты в разных зонах имеют отличия по форме, размерам, метаболической активности и ориентации относительно суставной поверхности, что определяет их функциональные свойства [18, 31, 124].

Тканевая жидкость составляет от 60% до 80% веса невысушенного хряща и включает воду с растворенными в ней газами, маленькие протеины и продукты метаболизма. Объем, концентрация и перемещение воды в хрящевой ткани зависят, в первую очередь, от взаимодействия со структурными макромолекулами - большими агрегатами протеогликанов. Молекулы воды располагаются внутри пространств, занимаемых диффузными молекулами протеогликанов и их агрегатов. Но протеогликаны удерживают воду непрочно, и основная ее часть подвижна и может вместе с растворенными в ней мелкими молекулами передвигаться по матриксу, а при сжатии - диффундировать за пределы хряща, в том числе в синовиальную жидкость. Лишь небольшое количество воды в матриксе связано с коллагеновыми волокнами, и эта вода практически неподвижна [163]. Вследствие гипергидратации коллагеновая сеть хряща находится постоянно в состоянии напряжения, но остается устойчивой к повышенному осмотическому давлению благодаря наличию связей с протеогликанами матрикса. Функциональная роль тканевой жидкости заключается в формообразовании, диффузном питании и смазке хряща [166].

Структурные макромолекулы представлены коллагенами, протеогликанами, неколлагеновыми белками и гликопротеинами. Они составляют от 20% до 40% влажного веса ткани. Исходя из сухого веса, коллаген составляет 50%, протеогликаны - 30% - 35%, неколлагеновые белки и гликопротеины - приблизительно 15% - 20%. Хондроциты синтезируют эти молекулы из аминокислот и сахаров. Коллагены находятся в суставном хряще в виде

нескольких генетически определенных типов - 2, 4, 9, 10, 11 [126, 159]. Доминирующим типом коллагена в суставном хряще является второй тип (90% - 95% от всех типов коллагена). Именно из его молекул построена основная часть волокон сетчатой структуры - своеобразного каркаса матрикса.

Протеогликаны являются вторым по массе компонентом в хрящевой ткани и представлены в виде мономера и сложной конструкции макромолекул. Молекула мономера протеогликана состоит из белкового ядра и полисахаридных цепей. В зависимости от преобладания в протеогликоне того или иного типа гликозаминогликана соответственно выделяют три разных типа протеогликанов. Количественные взаимоотношения в хрящевой ткани разных типов протеогликанов зависят от возраста, наличия или отсутствия дегенеративно-дистрофического поражения сустава [31].

Центральное ядро этого протеогликанового агрегата представлено длинной цепью гиалуроновой кислоты, которая составляет менее 1% от всего полисахарида в ткани. Вторым и третьим компонентами протеогликанового агрегата являются линейный белок агрекан от 180 до 200 нм длиной и полисахаридные цепи. Четвертым составляющим протеогликанового агрегата является другой пептид - связывающий белок. Он укрепляет или связывает протеогликановые субъединицы с гиалуроновой кислотой, стабилизируя трехмерную структуру агрегата. Формированию агрегатных молекул способствует также многочисленные соединения протеогликанов с коллагеновыми волокнами, что предотвращает их смещение во время деформации ткани и создает стабильное взаимоотношение с коллагеновым каркасом. Наружная часть из коллагеновых волокон, формирующих лакуны, переходит в волокнистый каркас матрикса. Свою ориентацию они меняют в соответствии действием вектора сил распределения нагрузки на данном участке суставной поверхности. В многочисленных работах многих лет убедительно показано, что патологические изменения хряща при многих заболеваниях сопровождаются потерей гликозаминогликанов из матрикса и, соответственно, разрушением протеогликановых агрегатов [29, 171,].

1.2. Синтетическая функция хондроцитов в обеспечении физиологической и репаративной регенерации суставного хряща

Клетки, обеспечивающие гомеостаз и ремоделирование суставного хряща в течение всей жизни человека, являются хондроциты. Именно их рецепторный аппарат призван регулировать процессы самообновления и восстановления хрящевой ткани. Регуляция всех биохимических процессов, протекающих в суставном хряще, осуществляется за счет воздействия различных факторов (лигандов) на рецепторный аппарат хондроцитов. Это необходимо для регуляции основных процессов, протекающих в хондроцитах и определяющих, в итоге, функциональное состояние суставного хряща. К таким процессам относятся: синтез и распад хрящевого матрикса, регуляция дифференцировки и пролиферации хондроцитов и их запрограммированной клеточной гибели (апоптоза) [56, 64, 98, 155].

Запуск вышеприведенных процессов осуществляется путем взаимодействия лиганда со специфическими рецепторами: трансформирующего фактора роста бета (TGF β R), костные морфогенетические белки (BMPR), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1R), толл-лайн рецептор (TLR), фактор некроза опухоли (TNFR), рецептор интерлейкина-1 (ИЛ-1R), рецептор к лептину (LRB), ангиотензиновый рецептор (ATR), CD44, рецептор простагландинов (E2/E4). Все вышеперечисленные рецепторы оказывают прямое или косвенное воздействие на катаболические или анаболические функции хондроцитов, за счет чего осуществляется ремоделирование хрящевой ткани [57, 59, 60, 62, 72, 95, 108, 109, 128, 133, 134, 137, 175].

Проблема разрушения хрящевого матрикса и последующая потеря биомеханических функций суставного хряща, являются базисом к пониманию основных событий при разрушении суставного хряща. Разрушение хряща возникает под действием специфических ферментов – матриксных металлопротеиназ (1-3, 8, 9 и 13), которые действуют как на коллаген, так и на протеогликаны хрящевого матрикса. К основным факторами разрушения хрящевого матрикса можно отнести ИЛ-1 β и ФНО α . Под действием этих

факторов первоначально устанавливается определенный баланс на уровне высокой интенсивности, как синтеза, так и распада структурных компонентов хрящевого матрикса, действие ИЛ-1 β и ФНО α приводит к снижению численной плотности хондроцитов в суставном хряще, в результате чего происходит быстрое снижение интенсивности синтеза протеогликанов, а распад сохраняется на высоком уровне, также нарушается способность синтезировать полноценные гликозаминогликаны [82, 147].

Довольно большое количество специалистов сходятся во мнении, что одним из ключевых факторов, влияющих на разрушение суставного хряща в коленном суставе, является высокая нагрузка на сустав. Такого рода перегрузки действительно оказывают влияние на все основные виды процессов как самих хондроцитов, так и самого суставного хряща. Рассматривая в формате молекулярных представлений, нормальные нагрузки способны стимулировать экспрессию TGF [164], а высокие физические нагрузки вызывают апоптоз хондроцитов и деструкцию хрящевого матрикса, за счет опосредованного воздействия ИЛ-1 и других провоспалительных цитокинов.

Основную роль в регуляции синтеза основного вещества хрящевого матрикса и дифференцировки хондроцитов осуществляют рецепторы, принадлежащие к двум большим семействам: TGFR и BMPR. Рецепторы TGFR- β 1, TGFR- β 2, TGFR- β 3 связываются с соответствующими молекулами суперсемейства TGF β , а BMPR - с костными морфогенетическими белками BMP2, BMP4, BMP6 и BMP7 [22, 39]. Внутриклеточная передача сигнала от TGFR- β и BMPR осуществляется за счет фосфорилирования R-Smad (1, 2, 3, 5, 8), с последующей активацией транскрипционного фактора, и запуска синтеза матриксных металлопротеиназ и белки поверхностной зоны [62]. Помимо указанных выше сигнальных молекул, в регуляции синтеза хрящевого матрикса активное участие принимает рецептор IGF-1R, который может связываться с лигандами IGF-1 и IGF-2. В результате их взаимодействия по сигнальному пути Akt/MAPK активируется синтез протеогликанов и коллагена II [128]. Еще одна

особенность IGF-1R состоит в том, что он принимает участие в процессе дифференцировки хондроцитов [104].

Не так давно появились данные о том, что лептины имеют специфические рецепторы (LRB) на мембране хондроцитов. Роль такой сигнализации остается не до конца понятной, но возможно, что такие взаимодействия способны регулировать дифференцировку хондроцитов и также синтез коллагена X. Неясно, является ли это прямым или косвенным эффектом действия лептина [133].

Сходными функциями обладает еще один рецептор, экспрессирующийся на мембране хондроцитов – CD44, который является специфическим рецептором для гиалуроновой кислоты. Их взаимодействие активирует передачу сигнала за счет транскрипционного фактора SOX9, что позволяет реагировать на изменения хрящевого матрикса, благодаря увеличению синтеза металлопротеиназ и аггрекиназ хондроцитами [108]. Также влияние на синтез хрящевого матрикса может оказывать семейство паттерн-распознающих рецепторов TLR-4, специфически узнающих бактериальные липополисахариды [168]. При активации TLR-4 увеличивается синтез ММП-13 и циклооксигеназы 2 (COX-2), параллельно снижается синтез коллагена II [59].

Описаны рецепторы, активация которых сопровождается уменьшением объема хрящевого матрикса, вследствие повышения скорости его деградации. Подобными свойствами обладает ИЛ-1R, взаимодействие, которого с ИЛ-1 α и ИЛ-1 β приводит к стимуляции синтеза ММП, которые способны разрушать белки хрящевого матрикса [86, 95, 147]. Взаимодействие ИЛ-1 β с ИЛ-1R также может индуцировать апоптоз хондроцитов, что приводит к дальнейшим дегенеративным изменениям хрящевой ткани. Все приведенные процессы регулируются центральным транскрипционным ядерным фактором (NF-kB). В хондроцитах NF-kB, активация которого является общим результатом нескольких катаболических сигнальных путей, запускает синтез является ключевым регулятором циклооксигеназы-2 и, далее, простагландинов, а также нескольких ММП [127]. Внеклеточного расположенные простагландины могут связываться со специфическими рецепторами E2, E4, в результате чего замедляется синтез

протеогликанов, но увеличивается синтез матриксных металлопротеиназ (ММП-13) и агрекиназ (ADAMTS-5). Итогом этого становится прогрессивное уменьшение плотности хрящевого матрикса. Некоторые данные указывают на то, что простагландины, помимо участия в деградации хрящевого матрикса, также способствуют хондрогистогенезу и терминальной дифференцировке хондроцитов [175].

Дифференцировка хондроцитов занимает ключевое значение в поддержании клеточной популяции хондроцитов. Как уже описывалось выше, в регуляции дифференцировки принимают участие такие рецепторы как: TGF- β BMPR IGF-1R. Но кроме этих распространённых рецепторов, в дифференцировке хондроцитов принимает участие - CD 44, следует отметить, что в молодых хондрокитах экспрессия данной молекулы выше, чем в гипертрофированных хондрокитах [108]. На сегодняшний день есть данные о том, что в регуляции дифференцировки хондроцитов принимает участие ренин-ангиотензиновая система (RAS). Молекула ангиотензина II взаимодействует со специфическими рецепторами AT1R и AT2R, в результате их взаимодействия происходит запуск дифференцировки мезенхимальных клеток в гипертрофические хондрокиты [57].

Пролиферация хондроцитов и синтез хрящевого матрикса протекают одновременно и зачастую взаимосвязаны, поскольку тот и другой процесс индуцируются группами идентичных сигналов. Есть примеры, единственного сигнала к синтезу основного вещества хрящевого матрикса, при этом, не оказывая влияния на пролиферацию или дифференцировку хондроцитов - является гиалуронат [95, 97], в то время как молекулы трансформирующего фактора роста TGF- β или инсулиноподобный фактор роста IGF-1 [180], а также представители костно-морфогенетических белков BMP, запускают все катаболические процессы. Большое количество ответных реакций хондроцитов можно разделить на два подмножества. Например, при стимулировании их пролиферации наблюдается повышение экспрессии белков PCNA и KI-67, а также рецептора CD-44 [77], маркеры хондрогенеза COL2A1, COL10A1, RUNX2, SOX9. В то же время, при стимуляции синтеза хрящевого матрикса происходит секреция гиалуроната,

ВМР-7, протеогликанов - агрекана [95], коллагенов II и X типа [179], тканевых ингибиторов металлопротеиназ TIMP-1 и TIMP-3 [130].

Факторы роста, костноматричные белки и сам гиалуронат, в свою очередь, являются катализаторами анаболических процессов – хондроциты начинают активнее делиться [180] и синтезировать коллагены и другие структурные компоненты хрящевого матрикса, а также ингибиторы металлопротеиназ.

Апоптоз хондроцитов регулируется несколькими системами рецепторов: TNFR1, Fas/apo-1(CD95) и TRAILR-1 (DR4). Развитие Fas- и TNF-опосредованного апоптоза ассоциируется с каспаз-зависимым путем, с участием каспазы-8. В случае передачи апоптотического сигнала через TNFR происходит одновременный запуск антиапоптотического сигнала, что в результате вызывает экспрессию генов цитокинов TNF, ИЛ-1 β , ИЛ-6, а также коллагеназы, стромолизина и молекул адгезии. TRAIL-рецепторы модулируют два различных сигнала - клеточную гибель, опосредованную каспазами, и экспрессию ряда генов, опосредованную ядерным транскрипционным фактором NF- κ B [109]. Сам апоптоз хондроцитов запускается фактором некроза опухоли альфа (TNF- α) [117, 144, 178], а также провоспалительными цитокинами – интерлейкинами -1, -6, -8 (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , IL-6, ИЛ-8) [117, 162]. При этом происходит синтез нитроксидсинтазы (iNOS) [144], циклооксигеназы-2 (COX-2) [117, 162], снижение плотности хрящевого матрикса, а также экспрессия рецептора TRAIL [95] и активация каспаз -3 и -9 (CASP-3, CASP-9).

Сигнальными молекулами к резорбции хрящевого матрикса являются факторы роста фибробластов (FGF-2/FGF- β , FGF-18) [103, 162]. Но в этом процессе принимают активное участие уже упомянутые выше TNF- α и интерлейкины. Хондроциты отвечают синтезом большого количества металлопротеиназ (ММП-3, ММП-9, ММП-10, ММП-13, ADAMTS-5) [117, 162] напрямую разрушающих хрящевой матрикс, и сокращается количество коллагена, гиалуроната и агрекана – «строительного материала» внеклеточного матрикса. При этом также возрастает количество молекул, вызывающих гибель

хондроцитов [95], одновременно происходит подавление и TIMP-3 [130], что в итоге сопровождается деградацией компонентов хрящевого матрикса.

Как мы видим в поддержании гомеостаза и структуры суставного хряща определена важнейшая роль хондроцитов, их функциональная роль в синтезе и разрушении структуры хрящевого матрикса, пролиферации, дифференцировке и апоптоз, в ответ на различные физические и химические воздействия.

1.3. Роль синовиальной жидкости в обеспечении функции суставного хряща

Синовиальная жидкость (СЖ) рассматривается не только как итог во многом антагонистической деятельности синовиальной оболочки и суставного гиалинового хряща, но и как активный самостоятельный элемент синовиальной среды. Присущие ей специфические функции играют важную роль в реализации функций сустава и обеспечении его связи с другими тканями. Она отражает процессы, происходящие в хряще и синовиальной оболочке, очень тонко реагирует на малейшие нарушения в сочленении изменением своих характеристик. В настоящее время выделяют четыре основных функции СЖ в составе синовиальной среды: локомоторная, метаболическая, трофическая и защитная.

Движение в суставах неизбежно приводит к трению суставных поверхностей между собой, которое нет возможности устранить, но основной функциональной целью смазочного аппарата становится снижения силы трения скольжения между соприкасающимися суставными поверхностями. Сведение к минимальным показателям коэффициента трения скольжения, определяемого свойствами контактирующих поверхностей, сам по себе суставной хрящ обладает минимальным коэффициентом трения скольжения среди изученных биоматериалов. Воздействие сил большой величины, которые формируется при активном движении или перегрузке в коленном суставе человека, зачастую превышает допустимые пороговые значения коэффициентов трения скольжения обеспечивающихся за счет свойств суставных поверхностей хряща. Воздействие

таких сил может быть уменьшено за счет уменьшения контакта при движении – смазки, которые можно разделить на две группы: гидродинамические (синовиальная жидкость) и поверхностные (белки поверхностной зоны) лубриканты [58, 125].

Гидродинамическая смазка (СЖ) достигает максимальной эффективности при малых и умеренных нагрузках. Это предотвращает контакт при боковом скольжении и обеспечивает распределение и рассеивание давления всей толщиной СЖ, между суставными поверхностями. Вязкость СЖ обеспечивает толщину пленки, которая определяет геометрию и шероховатость суставных поверхностей, а также нагрузку и скорость скольжения между ними. Повышенные нагрузки и высокое давление СЖ приводят к упругой деформации суставной поверхности [107]. Когда гидродинамическая смазка не может погасить (снизить) нагрузку на суставные поверхности, лубрикативные свойства проявляет молекулярная пленка на суставной поверхности (граничная смазка). [65, 75]. Этот тонкий слой постепенно удаляется при каждом превышении нагрузки на суставную поверхность, и, следовательно, граничные лубриканты должны быстро и непрерывно восполняться [58, 107, 116].

Во время ходьбы суставные поверхности в коленном суставе, как и в любом другом, имеют довольно широкий спектр контактных напряжений и скоростей скольжения. Понятно, что скорость скольжения становится равной нулю после каждого изменения направления движений при шаге. Таким образом, смешанный режим, включающий в себя гидродинамическую, жидкостно-плёночную и смазку самой поверхности, обеспечивая работу суставных поверхностей [65, 71, 75, 125].

В составе смешанной смазки, могут присутствовать также экссудативный и форсированный механизмы лубрикации. Экссудативный механизм заключается в высвобождении тканевой жидкости из сжимаемого хряща. За счет движения нагрузка передается на неровности контактирующих суставных поверхностей, которые и приводят к сжатию хрящевого матрикса, вызывая экссудацию интерстициальной жидкости. Форсированный механизм смазки формируется в условиях, когда за счет давления, жидкость возвращается обратно в хрящевой

матрикс, тем самым эффективно поддерживая транспорт и обогащение смазочными веществами суставной поверхности хряща [107].

Описанные трибологические свойства имеют значения для замедления износа и обеспечения функциональных свойств хряща, и абсолютно необходимо, чтобы предотвратить или замедлить разрушение суставного хряща.

Состав СЖ в процессе нормальной жизнедеятельности включает в себя следующие компоненты: транссудативная части крови, секреция продуктов клетками синовиальной оболочки, диффузией и слущиванием хрящевого матрикса и мягких тканей сустава [3]. Синовиальная жидкость коленного сустава включает в себя 2 типа клеток: высокоспециализированные клетки покровного слоя синовиальной оболочки и лейкоциты крови. Клеточный состав СЖ различных типов клеток колеблется от 13 до 180 в 1 мм³. Клетки синовии происходят из клеток самой синовиальной оболочки и крови (их соотношение — 110:100). В норме СЖ представлена синовиальными покровными клетками — синовиоцитами (34,2—37,8%), гистиоцитами (8,9—12,5%), лимфоцитами (37,4—42,6%), моноцитами (1,8—3,2%), нейтрофилами (1,2—2,0) и неклассифицированными клетками (8,3—10,1%). Примерно 20% лимфоцитов - функционирующие.

Синовиоциты продуцирующие гиалуроновую кислоту, протеогликаны, металлопротеиназы и часть цитокинов — один из главных компонентов, формирующих синовиальную среду сустава [53, 111]. Также синовиальная жидкость обладает барьерной функцией, в результате чего в СЖ отсутствуют белки массой более 160 кД. Вязкость из важнейших параметров, по которой можно оценить эффективности смазочной функции СЖ [107].

Основные молекулярные игроки, отвечающие за лубрикативные свойства СЖ, можно разделить на три группы молекул: поверхностно-активные липиды, гиалуроновая кислота (ГК) и белки поверхностной зоны (БПЗ/lubricin/PRG4). Хотя существуют различные мнение о роли каждого из этих компонентов, накопленные результаты за годы исследований являются основанием для более тщательного изучения функциональной роли каждой молекулы.

Также в составе СЖ были найдены фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, и сфингомиелин, большинство из них прочно связаны с суставной поверхностью. Аналогичную роль, в снижении поверхностного натяжения, выполняют молекулы в составе сурфактанта легких, поэтому возникает предположение об использовании найденных фосфолипидов в качестве молекул граничной смазки для суставной поверхности хрящей. Были проведены исследования, в которых изучались эффекты удаления фосфолипидов с поверхности хряща, при этом значимого влияния на коэффициент трения скольжения не наблюдалось, поэтому участие фосфолипидов в поддержании граничной смазки суставной поверхности остается не выяснено [65, 51].

Гиалоурановая кислота является основным веществом, определяющим трибологические (лубрикативные) свойства СЖ. В основном синтез осуществляется клетками преимущественно синовиальной оболочки, но также частично ГК поступает в СЖ из хрящевого матрикса. Трехмерная структура ГК представляет собой спираль, что позволяет образовывать в растворах сетчатые структуры, за счет протеогликанов, благодаря чему СЖ обладает эластичностью, вязкостью, и способностью варьировать этими свойствами при динамическом изменении давления в суставе при скольжении суставных поверхностей [107, 151]. Существуют данные, полученные с помощью атомно-силового микроскопа подтверждающие, что ГК является хондропротектором и снижает износ суставной поверхности, что препятствует повреждению хрящевого матрикса, но не уменьшает коэффициент трения [75].

Основным компонентом СЖ, обеспечивающий граничную смазку суставных поверхностей является гликопротеин – лубрицин. Синтез гликопротеина осуществляется клетками синовиальной оболочки. Лубрицин принадлежит семейству белков, в структуре которых имеется наличие муцинового домена, за экспрессию которого отвечает ген - *prg4*. В это семейство белков также входит белок поверхностной зоны (БПЗ), молекулярная масса которого составляет 345 кД. За синтез БПЗ отвечают хондроциты поверхностной зоны суставного хряща, собственно белок, синтезируемый с гена *prg4*, является

предшественником мегакариоцит-стимулирующего фактора и гемангиопоэтина. Высокая степень гликолизации позволяет лубрицину легко образовывать на поверхности хряща наноразмерные пленки с выраженными антиадгезивными, а также лубрикативными свойствами обеспечивающие скольжение суставных поверхностей. Наличие БПЗ и их участие в обеспечении функций лубрикации граничной смазки суставной поверхности подтверждено результатами исследований генетических нарушений у человека, на животных с экспериментальным артритом, нокаутированием гена *prg4* у грызунов и функциональных трибологических экспериментах. В то время как СЖ, обработанная гиалуронидазой, не теряла своих лубрикативных свойств, дополнительная обработка протеазами, позволяло разрушить БПЗ, приводило к полной их утрате на суставной поверхности. Также были исследования, в ходе которых производили смешение БПЗ и ГК, в результате чего были получены данные о том, что снижается вязкость, при этом улучшаются диффузионные свойства растворов, моделирующих СЖ [176].

БПЗ синтезируются хондроцитами поверхностной зоны хряща. Поэтому считается, что БПЗ выполняет главную роль в формировании поверхностной наноструктурной пленки на суставной поверхности, нивелируя неровности и снижая силы поверхностного натяжения и повышения коэффициента трения скольжения при соприкосновении суставных поверхностей [115]. Регуляция синтеза двух основных белков в коленном суставе ведется совместно через экспрессию гена *prg4* [122].

Модуляция экспрессии БПЗ/лубрицина осуществляется с помощью цитокинов и факторов роста. Например, трансформирующий фактор роста – β (TGF- β) и костные морфогенетические белки (BMP) усиливают экспрессию БПЗ как в хондроцитах поверхностной зоны, так и в синовиоцитах [112, 146]. Регуляция продукции БПЗ/лубрицина в хондроцитах инсулиноподобным фактором роста-1 (который стимулирует экспрессии аггрекана) в большей мере зависит от ситуации. ИЛ-1 и ФНО- α снижают экспрессию БПЗ/лубрицина в синовиоцитах и хондроцитах. Хотя ИЛ-1 однократно уменьшал коэффициент

трения, в долгосрочной перспективе это повреждение ускоряло изнашивание суставной поверхности [115, 149].

Экспрессия БПЗ/лубрицина распределена не равномерно и с разной интенсивностью на протяжении всей суставной поверхности. Топография этой экспрессии может быть частично связана с возникающими в естественных условиях механическими нагрузками. Было доказано, что в коленном суставе быка экспрессия БПЗ/лубрицина в основном локализована в зоне опорной нагрузки в передних отделах бедренных мышечков, в то время как менее нагруженные задние отделы экспрессировали значительно меньше протеогликана. Высокая концентрация БПЗ/лубрицина в нагружаемых областях коррелировали с низкими величинами коэффициента трения [107].

Также были проведены другие исследования по сжатию эксплантатов хряща при статических и переменных нагрузках с различными интервалами. При различных условиях экспрессия БПЗ/лубрицина хондроцитами сразу после воздействия. Был зафиксирован только один случай, когда нагрузка составляла 3-300 кПа, стимулирующая синтез БПЗ/лубрицина в 1.5 раза на первые сутки после воздействия. Все другие методы воздействия не вызывали достоверных изменений [107]. Использование монослойных культур хондроцитов человека в эксперименте формирования двухосной деформации в 0,5% и 3,0%, наблюдалось 2-е увеличение транскрипции гена PRG4. В условиях длительной обработки и культивирования было зафиксировано снижение экспрессии гена, из-за потери хондрального фенотипа клеток [106].

Таким образом, хотя синтез БПЗ/лубрицина изменяется при сжатии тканей, отсутствие надежного ответа показывает, что механические нагрузки не могут действовать в качестве основного регулятора экспрессии генов.

Метаболическая функция СЖ заключается в осуществлении процессов обмена между сосудистым руслом и хрящом, а также в удалении из полости сустава через лимфатическое русло ферментативно разрушенных клеточных компонентов и крупномолекулярных соединений. При движениях сустава из хряща в полость сустава выделяется интерстициальная жидкость, которая,

смешиваясь с СЖ, обогащается и «очищается» от продуктов обмена хрящевой ткани. После прекращения сжатия хряща происходит обратная диффузия жидкости. Отмечено, что жизнеспособность хрящевой ткани обеспечивается только при условии переменной нагрузки поверхностей трения суставов. В условиях же непрерывного сжатия либо ограничения движений возникает дегенерация хряща, причем раньше других разрушению подвергаются участки, не испытывающие нагрузку от массы тела.

Биомеханическая функция СЖ осуществляется благодаря ее вязкости и псевдоупругости. Относительная вязкость синовии ($\sim 0,57$ ПаЧс) связана с гиалуроновой кислотой, что подтверждено экспериментально: в присутствии гиалуронидазы вязкость СЖ значительно уменьшается (до $0,1$ ПаЧс). Упругие свойства синовии объясняются пространственной молекулярной структурой комплексов гиалуроновой кислоты и протеинов, образующих трехмерные сети с консистенцией геля, благодаря чему создается амортизационный эффект.

Реологические характеристики включают в себя показатели вязкости и динамического и стабильного вязкоупругого измерений (т.е. измерения динамического модуля упругости G' , отражающего эластичность, и модуля потерь G'' , отражающего вязкость). Это является удобным для оценки свойств СЖ, особенно для мониторинга ее вязкоупругих свойств в условиях разрушения суставного хряща, по сравнению с нормальной СЖ. Реологические свойства растворов ГК линейной структуры строго связаны с произведением молекулярной массы и концентрации ГК, что также определяет ее биологические эффекты. Важное значение при заболеваниях опорно-двигательного аппарата придается исследованию реологических свойств синовиальной жидкости. Нормальная СЖ очень вязкая, и показатели на 20% превышают значения крови, а при всех заболеваниях суставов вязкость снижается (исключение, пожалуй, составляет лишь волчаночный артрит), что связано с деполимеризацией гиалуроновой кислоты или же с образованием низкополимерных гиалуронатов вследствие нарушения процессов синтеза. В первую очередь процессы деполимеризации вызываются действием лизосомных ферментов и перекисных радикалов.

Существует прямая связь между вязкостью СЖ и содержанием в ней фагоцитов. Снижение вязкозных свойств синовия на клеточном уровне сопровождается деградацией фагоцитов по пути апоптоза и появлением клеток дегенеративного типа.

Вязкозные свойства СЖ зависят также от pH среды и концентрации в ней неорганических электролитов. Если последние являются поверхностно-инактивными веществами, то белки и липиды в суставном ликворе — поверхностно-активными (сурфактантами), способными уменьшать поверхностное натяжение данной жидкости, а адсорбируясь на границах раздела фаз, изменять межфазную активность, ускорять или замедлять процессы переноса вещества и энергии через биологические мембраны.

Низкомолекулярные сурфактанты характеризуются диффузией и адсорбирующим барьером, тогда как высокомолекулярным присуща еще стадия перестройки соединений в поверхностном слое, замедляющая адсорбцию. Особенно сложные процессы отмечают в смесях поверхностно-активных веществ СЖ. Уровень межфазной активности суставного ликвора несколько ниже, чем сыворотки крови. В первую очередь это касается значений в области коротких времен «жизни» поверхности (при $t=0,01$ с). Как свидетельствуют данные регрессионного анализа, показатели равновесной межфазной активности СЖ обратно связаны с концентрациями в суставном ликворе IgG, $\beta 2$ -микроглобулина, ХС, фосфолипидов, триглицеридов, липопротеидов высокой и низкой плотности, но прямо соотносятся с уровнем фибронектина. На ухудшение вязкоупругих характеристик СЖ влияет тяжесть суставной патологии.

Помимо смазки, существуют другие препятствия. Вопросы касательно целостности и стабильности инженерных тканей в требовательных и сложных биологической и механической среды жизни суставных соединений остаются неразрешенными [110].

Понимание того, что СЖ разрушающегося коленного сустава содержит гиалуронат со сниженной молекулярной массой и в меньшей концентрации, чем в нативном суставе, и это влияет на защитные свойства СЖ, стало основой для

изучения возможности внутрисуставного введения экзогенного гиалуроната. Уже в течение десятилетия время внутрисуставное введение ГК (вискосапплементарная терапия) официально входит в руководство по лечению разрушающегося коленного сустава, так как обезболивающий эффект сохраняется в течение нескольких месяцев после введения. Имеются положительные результаты использования внутрисуставных инъекций ГК при разрушении плечевого, бедренного и голеностопного суставов [52, 87, 170].

В настоящее время в мировой клинической практике применяются разные по составу препараты ГК: содержащие низкомолекулярные ГК и промежуточной массой, до поперечно-сшитых. Первая группа – это препараты ГК обладающие линейным строением, которые в физиологических растворах образуют петли случайной формы. Период полувыведения ГК зависит от ее среднего значения молекулярной массы, что в итоге определяет длительность курса: препараты первой группы обычно используют от 4 до 6 раз, второй группы – до 3-х раз еженедельно [42, 171]. Однако эффективность вискосапплиментарной терапии при повреждении по-прежнему является предметом научных дискуссий. Существует множество проведенных анализов, подтверждающих положительные эффекты внутрисуставного введения ГК при различных дегенеративных процессах в суставном хряще, но также имеются работы, не подтверждающие преимуществ препаратов ГК над плацебо. Ключевым преимуществом поперечно-сшитых ГК состоит, главным образом, в повышении устойчивости, стабильности и времени «жизни» поддержания функциональных свойств препарата в суставе, тогда как основные клинические эффекты большинства препаратов ГК с различной молекулярной массой практически сопоставимы.

Flannery et al. [140] с успехом использовали рекомбинантную форму лубрицина с укороченным центральным доменом муцина для уменьшения прогрессирования ОА у крыс в модели с менискэктомией. Это исследование не включало ни рентгенографического анализа, ни биохимического анализа СЖ или экспрессии фенотипических маркеров в хондроцитах. Более доказательные результаты, с использованием рентгенологических и гистологических критериев,

были получены для очищенного лубрицина, полноразмерного рекомбинантного протеогликана 4 человека и модифицированного лубрицина у крыс в модели с пересечением передней крестообразной связки.

ГК и БПЗ/лубрицин могут использоваться совместно в качестве потенциальной комбинированной терапии для ОА, улучшающей реологические свойства СЖ и лубрикацию граничащих поверхностей сустава [118, 140].

В экспериментальных условиях и модельных опытах *in vitro* опробованы и другие трибосуплементы, вплоть до использования химических соединений кадмия [141]. Chawla et al. [76] показали, что белок prg4, счет взаимодействия с альдегидной группой обладает лубрикативными функциями схожими с лубрикантом. Оценка лубрикативных свойств была дана хондроитинсульфатам, как перспективному компоненту для граничной смазки [114], также оценка была дана поверхностно-активным фосфолипидам, как варианту граничной тонкопленчатой смазки [100]. Только повышение лубрикации граничной смазки, по всей вероятности, будет не в состоянии ослабить симптомы ОА в случае обширных полнослойных дефектов суставного хряща коленного сустава. В перспективе следующим этапом будет обеспечение лубрикативной функции непосредственно в процессе создания биомиметических протезов хрящевой ткани [129, 152].

Поскольку собственный хрящ работает в условиях смешанного режима смазки, принципиально важно подключать компонент граничной смазки в любую тканеинженерную конструкцию для восстановления суставных поверхностей [113]. Проблемы ограниченной доступности клеток здесь будут связаны с тем, что БПЗ/Лубрицин экспрессируется только хондроцитами поверхностной зоны хряща. Одним из вариантов может стать использование стволовых клеток, так как их доступность значительно выше, чем чистая линия хондроцитов поверхностной зоны, но трудность их использования будет, заключается в запуске индукции синтеза БПЗ/Лубрицина в нужном количестве [31, 115].

Также не совсем ясно, могут ли трибологические характеристики в должной мере формироваться в процессе ремоделирования тканеинженерной конструкции,

или же их следует привносить в нее при изготовлении, сообщая определенные свойства поверхностным слоям на границе с полостью сустава. Предстоит определить, как именно свойства среды или/и технические характеристик биореактора могут привести к выходу хондроцитов с необходимыми свойствами в отношении устойчивого синтеза лубрикантов. Не исключено, что к процедуре имплантации необходимо будет добавлять временную трибосупплементацию гелями на основе, например, белков группы БПЗ/лубрицина.

Модификация СЖ идет параллельно и взаимосвязана с уменьшением концентрации ГК и количества молекул в ней с высокой молекулярной массой. Функции такой СЖ, как более вязкой, но менее упругой, меняют весь диапазон движений в суставах, что приводит к дальнейшему снижению защитного действия на клетки и матрикс хряща. Механизмы деградации ГК были описаны. Эти изменения снижают вязкоупругие свойства СЖ и ее способность защищать сустав [138].

Постепенно приходит и понимание того, что при ОА повреждаются также механизмы граничной смазки, обеспечиваемой группой белков БПЗ/лубрицина. Так, показано, что уровень лубрицина в СЖ уменьшается у пациентов с перенесенными травмами передней крестообразной связки, и это соотнесено с краткосрочным подъемом уровня цитокинов после травмы [Teerple E, et al. 2008 139, 158]. Также обнаружено, что травмирование изолированных эксплантов хрящевой ткани приводило к повышению трения поверхностей и сопровождалось повышенным экспрессии БПЗ/лубрицина в хондроцитах, что свидетельствовало о возможной компенсаторной реакции [113]. Моделирование ОА у животных продемонстрировало понижение синтеза лубрицина и увеличения коэффициента трения после травм коленного сустава, таких как ППКС и менискэктомия [140].

Вискосапплементарная терапия, в ходе которой, осуществляется введение в суставную полость различных лекарственных препаратов делящихся на хондропротекторы и гиалуронаты. Появляются новейшие разработки по проблеме лечения остеоартроза путем введения в суставную полость плазмы крови.

Однако воспроизведение всех трибологических свойств сопоставимых с хрящевой смазкой, требуется создать условия, максимально соответствующие их свойствам СЖ в нормальном суставном хряще коленного сустава. Новая концепция заключается в необходимости обеспечить точное или приближенное соотношение всех компонентов смешанной смазки сустава, то есть провести трибосупплементацию. Скорее всего, основным элементом такого воздействия должно стать формирование граничной смазки [94, 140]. В настоящее время одним из успешных опытов стало использование рекомбинантной формы БПЗ/лубрицина с укороченным центральным муциновым доменом, для достижения снижения деградации суставного хряща коленного сустава у крыс.

Взятые вместе описанные факты представляют собой убедительное свидетельство связи развития ОА и нарушения регуляции БПЗ/лубрицина. Подавление синтеза белков граничной смазки приводит к увеличению трения и износа суставной поверхности [113].

Одним из вариантов природного лубриканта для улучшения лубрикативных свойств СЖ может быть представлен сурфактант-ассоциированными белками синтезируемыми альвеолоцитами II-типа выстилающих альвеолы легких. Сурфактант-ассоциированные белки представлены 4-мя изоформами: гидрофильными SP-A и SP-D [148], гидрофобными SP-B и SP-C. Благодаря их структурным особенностям они могут выступать в роли иммуномодуляторов, взаимодействие их коллагеновых хвостов (у SP-B и SP-C этот домен отсутствует) с комплексом кальретикулин/CD91 (LRP1/lipoprotein receptor-related protein 1 – эндотелиальный рецептор в норме интернализирующий ADAMTS-4/-5) индуцирует макропиноцитоз апоптотических клеток, благодаря наличию CTLD домена, в проксимальной части которого содержатся сайты связывания для хондроитинсульфата, ингибируют активность NF- κ B [154], а следовательно подавляют синтез фосфолипазы A2 в СЖ, а также активность некоторых матриксных металлопротеиназ (стромелизина, коллагеназы) [145]. На основании их природных лубрикативных и противовоспалительных свойств, данные

молекулы можно использовать как модификатор СЖ при повышенных нагрузках на суставной хрящ коленного сустава.

В связи с этим, с целью обеспечения положительного восстановления суставного хряща в настоящее время актуален поиск более эффективных способов и оптимальных условий, которые позволят управлять ремоделированием суставного хряща для его восстановления путем улучшения лубрикативных свойств синовиальной жидкости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика материала и экспериментальная модель

Работа носила экспериментальный характер и была выполнена на 56 самцах белых крыс линии Wistar.

Морфологические и функциональные изменения суставного хряща были изучены в эксперименте: в норме и при использовании двух моделей экспериментального остеоартроза (табл. 1).

Таблица 1

Модель	Характеристика а серии	Кол-во животных	Кол-во коленных суставов
Интактные животные		8	16
Повышенная нагрузка на суставную поверхность			
Перерезка крестообразной связки	3 недели	6	12
	6 недель	6	12
	12 недель	6	12
Снижение лубрикативных свойств синовиальной жидкости			
Введение медицинского талька	3 недели	5	10
	6 недель	5	10
	12 недель	5	10
Повышение лубрикативных свойств синовиальной жидкости при экспериментальном остеоартрозе			
Введение медицинского талька + ССБС	Контроль (3+0)	5	10
	6 недель (3 + 3)	5	10
	12 недель (3 + 9)	5	10
Всего коленных суставов		56	112

Выбор, содержание животных, моделирование экспериментального ОА и выведение животных из опыта осуществляли на основе «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях.

Перед включением животных в эксперимент, все животные прошли полный осмотр. Контрольные группы формировались для каждой серии экспериментов с учетом пола и возраста животных. При моделировании экспериментального ОА суставного хряща, крысы оценивались в трех временных интервалах: 3 недели, 6 недель и 12 недель. Выведение животных из эксперимента осуществлялось с помощью введения высокой дозы миорелаксирующего средства «Рометар» (1 мл/кг массы животного).

Для получения сведений о суставном хряще в норме и последующем сравнении во всех сериях эксперимента, были взяты 16 коленных суставов (КС) от 8 интактных животных

В первой модели, экспериментальный ОА моделировали путем перерезки передних крестообразных связок обоих коленных суставов у 18 (36 КС) животных, что обеспечивало у этих животных повышенную физическую нагрузку на суставной хрящ [146]. Шесть крыс выводили из эксперимента спустя 3 недели после перерезки, 6 животных (12 КС) – спустя 6 недель и еще 6 (КС) – спустя 12 недель с момента инициализации процесса. В этой серии экспериментов погибло 2-е животных (не вышло из наркоза).

Во второй модели, экспериментальный ОА моделировали путем внутрисуставного введения медицинского талька в суставную полость 15 животным (30 КС) [20], что обеспечивало у этих животных снижение лубрикативных свойств синовиальной жидкости. В сустав вводили 0,2 мл стерильного медицинского талька («АГАТ-МЕД», Россия) в соотношении с физиологическим раствором NaCl 1:5, что соответствовало полному объему суставной полости. В этой серии животных выводили из эксперимента через 3, 6, 12 недель. В этой серии экспериментов погибло одно животное (не вышло из

наркоза). При моделировании данной модели экспериментального остеоартроза значительные повреждения получали мягкие ткани с разрастанием соединительной и жировой ткани, но это было оставлено за рамками данной работы [20].

После того, как было проведено обоснование (п. 2.3) и выбор способа ограничить понижения лубрикативной функции синовиальной жидкости в той же модели была получена и применена ССБС (п. 2.4), обладающая возможностью повышения лубрикативных свойств. Состав смеси ССБС включала: сурфактант-ассоциированные белки (преимущественно гидрофильные изоформы SP-A, SP-D легочного сурфактанта) и фосфолипиды. В этой серии животным после моделирования экспериментального ОА 3 недели (контрольная группа 3+0) путем внутрисуставной инъекции вводили ССБС в концентрации 40мг/мл. Животных выводили из эксперимента через 6 (3 + 3) и 12 (3 + 9) недель после моделирования экспериментального ОА.

2.2. Морфологические методы исследования суставного хряща

Морфологическому исследованию подвергались суставные хрящи коленного сустава во всех сериях экспериментов. Иссечение коленных суставов осуществлялось с помощью хирургических инструментов, путем частичной препаровки с каждой стороны единым костно-мышечным блоком в объеме от дистальных эпифизов бедренной кости до проксимальных эпифизов большеберцовой кости. С латеральной стороны делали надрез до суставной полости разделения мягких тканей для доступа фиксирующего раствора 10%-го забуференного формалина (pH-7.4) или заливочного материала для получения 3D-реконструкции суставного хряща. Коленные суставы декальцинировали с помощью коммерческого препарата Cal-Ex[®] («Fisher Scientific, США) в течении 24 часов, после чего проводили через спирты восходящий плотности и производили стандартную методику заливки в парафиновые блоки. Срезы коленного сустава толщиной 5-7 мкм получали на санном микротоме MC-2.

Гистологические срезы суставного хряща коленного сустава окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином, для специфического выявления основного вещества хрящевого матрикса - сафранином О [177].

Фотосъемка сочеталась с количественным морфологическим исследованием и была проведена с помощью аппаратного комплекса «TourView» (США). Он включал в себя бинокулярный исследовательский микроскоп «Микомед-5» (Россия), цифровую камеру «TourCam» (США), компьютер с цветным принтером высокого разрешения и программным обеспечением «TourView», «ImageJ версия 1.48v» (США). Дополнительно фото-протоколирование микроскопических изменений производили с использованием настольной системы визуализации «EVOS FL» (цветная камера) (ThermoFisher Scientific, США). Все измерения проводили в двух препаратах от одного образца в пяти полях зрения, в итоге в каждую выборку были включены результаты от 50 до 60 измерений.

При создании 3D-реконструкций была использована технология высокоточного послойного сошлифовывания в сочетании с цифровой съемкой шлифов и программное обеспечение для создания виртуальной модели объекта-оригинала [7, 41].

Для получения 3D-реконструкции блоки замораживали на твердом диоксиде углерода при $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$, погружали их в специальный заливочный материал при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего подвергали циклам высокоточного торцевого фрезерования (сошлифовывания) с дискретным шагом 8 мкм и цифровой съемки поверхности камерой Canon 5D с объективом Canon EOS 5D, что соответствовало размеру пиксела 8×8 мкм. Полученные 2D-изображения, по 3000–5000 изображений разрешением 4368×2912 пкс в файлах формата .tiff для каждого объекта, после чего подвергали программной обработке для создания 3D-реконструкции с минимальными искажениями цветовых и геометрических параметров объекта-оригинала и создание RGB-профиля по каждому цветовому каналу.

Для оценки степени развития ОА использовали шкалу полуколичественной оценки Н. Mankin в модификации V.B. Kraus et al. [161]. Оценки по критериям

выставляли два исследователя по два препарата одного и того же случая каждый (16 оценок в выборке). Учитывали структуру поверхности хряща (0–8 баллов), структуру и плотность хрящевого матрикса в окраске сафранином О (0–6 баллов), плотность расположения хондроцитов и кластеризацию (0–3 баллов), целостность остеохондральной костной пластинки (0–1 баллов) и наличие остеофитов (0–9 баллов).

Морфометрическое исследование проводилось по общепринятым принципам системного количественного анализа. Анализу подвергали отдельно поверхностную, промежуточную и глубокую зоны суставного хряща коленного сустава крысы [1]. В качестве основных морфометрических критериев использовали следующие параметры: радиальную толщину хрящ (мкм.), показатель рельефа суставной поверхности (безразмерная величина - отношение длины криволинейного отрезка, соответствующего фактической границе суставного хряща, между точками на расстоянии 100 мкм друг от друга, к этому расстоянию), численную плотность хондроцитов всех зон суставного хряща (1/мм³), размер хондроцитов (мкм), ядерно-цитоплазматическое отношение (безразмерная величина – отношение площади ядра к цитоплазме), удельную яркость матрикса при окраске сафранином О (усл. ед.). Для выявления структурной неоднородности хрящевой ткани эти же показатели в каждом поле зрения определяли на участках хряща в рамке считывания шириной 100 мкм с шагом 30 мкм от условной точки старта до 1500-2400 мкм (всего 50-80 «шагов» рамки).

При количественном морфологическом исследовании 3D – реконструкций суставного хряща коленного сустава полученных с помощью высокоточного послойного сошлифовывания, использовались следующие параметры: радиальная толщина хряща (мкм.), показатель рельефа суставной поверхности, для анализа 3D-реконструкций служила средняя яркость матрикса, которую рассчитывали по формуле:

$$I = 0.299 \times R + 0.587 \times G + 0.114 \times B, (1)$$

где R, G и B – средние значения показателей цвета на участке матрикса

Для работы с изображениями, полученными с помощью высокоточного поступенчатого сошлифовывания, использовалась программа 3D-Biograph (Россия).

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием наборов фирмы «Dako» (Германия) и фирмы «Sigma» (США). Пероксидазные и алкалинфосфатазные реакции позволяли выявлять клетки при связывании вторичных поликлональных антител с моноклональными антителами к их антигенам. В работе определялись клетки, позитивные к Aggrecan C20 (SC-16493, «Santa Cruz Biotechnonogy», США) (маркеру синтетически активных хондроцитов, продуцирующих протеогликан хрящевого матрикса в суставном хряще), Lubricin E19 (SC 50079, «Santa Cruz Biotechnonogy», США) (маркеру синтетически активных хондроцитов, продуцирующих белки поверхностной зоны суставного хряща), Anti-MMP 9 (AV33090, «Sigma-Aldrich» США) (маркеру матриксной металлопротеиназы) и Anti-TIMP-1 (SAB4502971, «Sigma-Aldrich» США) (маркеру ингибитора матриксных металлопротеиназ). Для морфометрического исследования иммуногистохимических препаратов использовался компьютерный комплекс «TourView» (США). При моделировании повышенных нагрузок на сустав количественно оценивали объемную долю позитивных участков (%), индекс синтетической активности аггрекана, индекс экспрессии лубрицина (%). При моделировании изменения лубрикативных свойств синовиальной жидкости результат иммуногистохимической реакции на MMP-9 и TIMP-1 оценивали по проценту позитивно окрашенных клеток как индекс экспрессии (%) [83].

2.3 Разработка функциональной модели и обоснование способа воздействия на суставной хрящ

Для разработки базы данных структурных и функциональных свойств сигнальных молекул участвующих в процессе хондрогенеза в суставном хряще был осуществлен поиск из ресурсов из свободного доступа: PubMed, PubMedCentral, PDB и NCBI Proteins. Биоинформационный поиск осуществлялся

с учетом синонимических словосочетаний «chondrocyte receptor and cartilage remodeling» и их синонимических конструкторов. В ходе анализа было отобрано свыше 300 источников за 10-летний период.

Для создания группировки использовался Microsoft Office Access (США). В группировке были использованы критерии: адекватность, полнота и устойчивость признаков. В итоге был сформирован следующий перечень сведений для записи строки в базу данных: название рецептора (со всеми синонимами), принадлежность к семейству; лиганды связывания; вторичные мессенджеры и исполнительные внутриклеточные молекулы; доказанное участие в регуляции синтеза, распада хрящевого матрикса, дифференцировки, пролиферации и апоптоза хондроцитов. Участие рецептора в каждом из этих процессов, отмечалось отдельно. Нами были выбраны основные рецепторы: трансформирующего фактора роста бета (TGF β R), костные морфогенетические белки (BMPR), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1R), толл-лайк рецептор (TLR), фактор некроза опухоли (TNFR), рецептор интерлейкина 1 (IL-1R), рецептор к лептину (LRB), ангиотензиновый рецептор (ATR), CD44, рецептор простагландинов (E2/E4). Все вышеперечисленные рецепторы оказывают прямое или косвенное воздействие на катаболические или анаболические функции хондроцитов, за счет чего осуществляется ремоделирование хрящевой ткани.

Для поиска белковых последовательностей группы лубрицин/БПЗ участвующих в лубрикации суставной поверхности, использовались ключевые слова такие, как PRG4, БПЗ, CACR, HAPO, JCAP, MSF, bG174L6.2 (синонимичный ряд для белков семейства proteoglycan 4 взят в открытом ресурсе, а также выставлено ограничение по таксону *Rattus Norvegicus* [porgn:__txid9606]). После этого была проведена поисковая операция для изоформ белков сурфактанта SP-A и SP-D. В поисковой строке введено SFTP, SP COLEC, PSAP. Также введено видовое ограничение *Rattus Norvegicus* "[porgn:__txid9606].

На следующем этапе анализа при помощи программы blastp (США) определен уровень гомологичности аминокислотных последовательностей лубрицина/БПЗ суставной поверхности и легочного сурфактанта.

2.4 Получение и проверка in vitro субстанции с высокими лубрикативными свойствами

Субстанция, содержащая белки сурфактанта, основными компонентами которой являются: гидрофильная фракция SP-A, SP-D и гидрофобная фракция SP-B, SP-C [68, 84], получали с помощью отпечатка (мазки) легких с помощью шероховатой стеклянной палочки в зоне скопления альвеол, основываясь на их анатомии легких [35] и переноса в боратный буферный раствор pH-9.18. Далее подвергали центрифугированию при 500g в течении 10 мин на центрифуге SpeedTest (США), для избавления от клеточного дебриса, полученный супернатант разливался по пробиркам объемом 1.5 мл и помещался на хранение в морозильную камеру Liebherr GGv 5060 (Германия) при -20 C°.

Для отчистки ССБС от большего числа примесей применялся метод гель-хроматографии на колонке SEC 70 «BIO-RAD» (США) с использованием автоматизированной системы на модульной платформе для разделения и фракционирования сложной смеси биополимеров и макромолекул NGC Quest «BIO-RAD» (США). Колонка предварительно замачивалась в боратном буфере pH-9.18 за сутки до проведения эксперимента по выделению и отчистки ССБС. Исследуемый образец наносился в объеме 250 мкл на колонку, после чего проводилось концентрирование путем осаждения раствором холодного ацетона и последующим центрифугированием при 2500g в течение 5 мин. Дополнительно в состав раствора входило 2% смесь фосфолипидов в виде коммерческого препарата Verolec F-62 (E322) производства Emulgrain S.A. (Аргентина) [131]. Перед введением экспериментальной группе, ССБС растворяли в стерильном физиологическом растворе.

Для изучения физико-химических свойств ССБС использовалась тест система, включающая синовиальную жидкость пяти пациентов с остеоартрозом II степени, взятой непосредственно перед сеансами вискоапплиментарной терапии, а также их модельных смесей в соотношении 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 9. При изучении использовался стандартный набор методов для изучения биологических жидкостей, и определяли следующие параметры: плотность, сила поверхностного

натяжения, вязкость и сила трения скольжения. Вначале последовательность и необходимые параметры в устройствах для определения физико-химических свойств биологических жидкостей были тестированы на образцах полиэтиленгликоля.

Плотность определяли как отношение прироста массы (аналитические весы «Ohaus DV214CD», Германия) пластикового шприца при заборе в него строго 1 см³ ССБС к этому объему. Результат выражали г/см³, расчетная погрешность, с учетом паспортных характеристик изделий составила менее 2,0%. Для определения вязкости ССБС использовали ротационный вискозиметр DV-II+ (Brookfield, США) со специальным адаптером для образцов малого объема. Значения показателя выражали в мПа·с.

Для измерения коэффициента поверхностного натяжения σ использовали принцип капельного (сталагмометрического) метода. Для проведения измерений вначале из пластикового капилляра заданного внутреннего диаметра $D_j = 1$ мм под контролем видеосъемки цифровой камерой Nikon D3200 (Япония) последовательно фиксировали процесс образования и свободного падения трех капель биологической жидкости. Капли принимали в пластиковую мини-кювету известной массы, измеряли на торсионных весах прирост массы, после чего рассчитывали среднюю массу 1 капли (мг). В момент отрыва капли жидкости от нижнего конца вертикальной трубки ее вес $m_k g$ уравнивается силой поверхностного натяжения F , которая равна произведению σ на периметра шейки капли πD_j и препятствует ее отрыву.

$$m_k g = \pi D_j \sigma \quad (2).$$

Для повышения точности вводили поправочный коэффициент k_σ , определяемый как отношение референтного (табличного) значения σ для глицерина к значению, полученному на опытной установке (оказался равным 1,025). Таким образом, с учетом известных величин k_σ и внутреннего диаметра капилляра, итоговая формула для расчета σ (мН/м) приобретала вид:

$$\sigma = k_\sigma m_k g / \pi D_j = 3199 m_k \quad (3).$$

Для измерения вязкости биологических жидкостей использовали расчетную формулу, выведенную для сравнительного метода из закона Пуазейля.

$$\eta = \eta_{0pt} / \rho_0 t_0 \quad (4),$$

где ρ – значение плотности исследуемой жидкости, определенное ранее по формуле (2), t – среднее время образования капли (с), η_0 , ρ_0 и, t_0 – аналогичные показатели для эталонной жидкости (глицерина). После подстановки значений для эталонной жидкости итоговая расчетная формула для определения вязкости исследуемой биологической жидкости (Па · с) приобрела вид:

$$\eta = 0,689 \rho t \quad (5).$$

Коэффициент силы трения скольжения μ (безразмерная величина) определяли на горизонтальной поверхности путем фиксации максимального показания микродинамометра растяжения ДЭП1-1Д-0,1Р-1 (Пет-Вес, СПб, Россия) при начале движения эталонного груза массой 10 г и площадью основания 1 см² в условиях контакта «стекло – стекло» при полном смачивании исследуемой жидкостью. Эту величину (силу трения скольжения $F_{тр}$) относили к весу эталонного груза mg в Н:

$$\mu = F_{тр}/mg \quad (3)$$

Описанные методы исследования были использованы для характеристики физико-химических свойств полученной ССБС и образцов синовиальной жидкости.

2.5. Математическая обработка данных

Количественные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) с расчетом показателей, принятых для характеристики непараметрических выборок в медико-биологических исследованиях: медиана [1-

й квартиль, 3-й квартиль] и оценивали достоверность различий выборок [28]. Использовался корреляционный анализ для непараметрических выборок. Для анализа различий между выборками использовали непараметрический критерий Фридмана ($p < 0,01$).

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУСТАВНОГО ХРЯЩА В НОРМЕ И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА КОЛЕННЫЙ СУСТАВ

3.1. Морфофункциональная характеристика суставного хряща в интактном состоянии

Суставной хрящ коленного сустава крысы интактной группы имел гладкую суставную поверхность, очерченную остеохондральную костную пластинку, а также позволял идентифицировать три основных зоны суставного хряща – поверхностную, промежуточную и глубокую (рис. 1, рис 3).

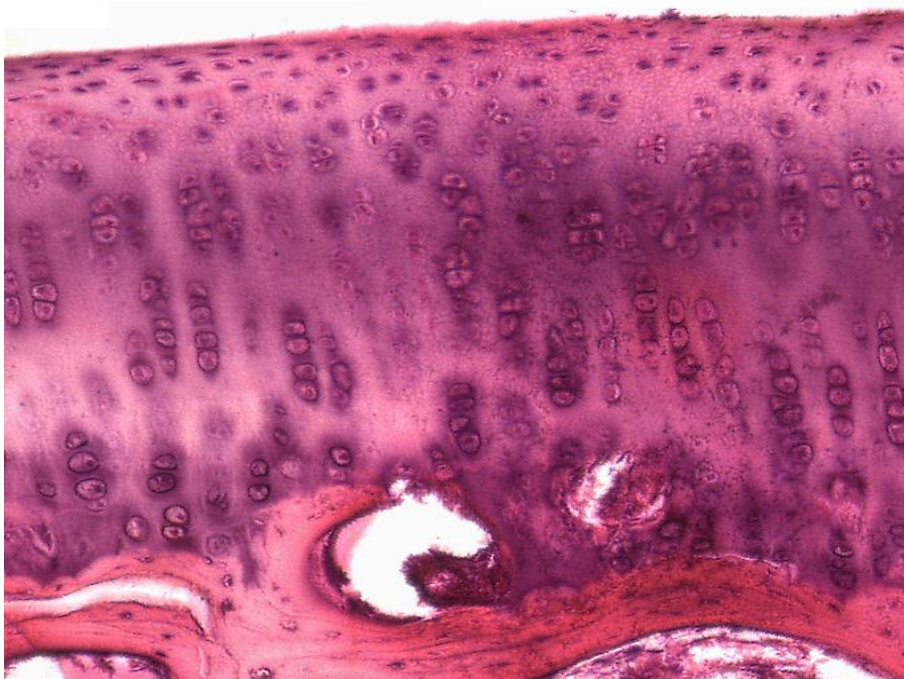


Рисунок 1. Интактный суставной хрящ нагружаемой области коленного сустава крысы, на гистологическом препарате, хорошо идентифицируется суставная поверхность, поверхностная и промежуточная, а также глубокая зоны суставного хряща. Также видно остеохондральную костную пластинку, окраска гематоксилином и эозином (x240).

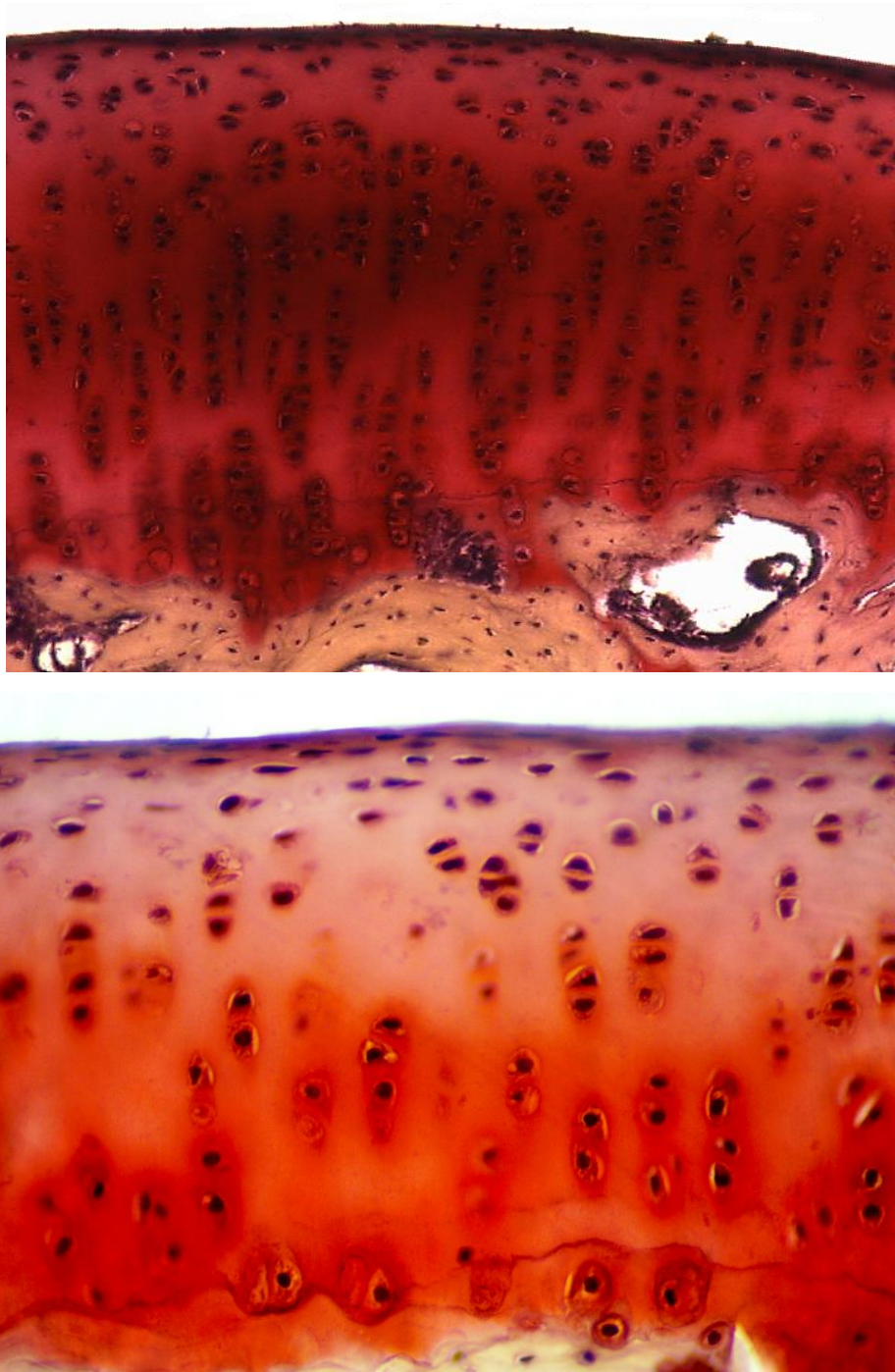


Рисунок 2. Интактный суставной хрящ нагружаемой области коленного сустава крысы, на гистологическом препарате, хорошо идентифицируется суставная поверхность, поверхностная и промежуточная, а также глубокая зоны суставного хряща. Также видно остеохондральную костную пластинку, окраска сафранином О (x240)

На полученных гистологических препаратах суставного хряща в окрасе сафранином О и гематоксилином и эозином, можно рассмотреть и провести условное разделение на нагружаемые и не нагружаемые участки. При окраске сафранином О (рис. 2), наблюдается значительное увеличение концентрации

компонентов хрящевого матрикса в промежуточной зоне (темно-красный окрас), по сравнению с поверхностной и глубокой зоной в области остеохондральной костной пластинки.

На микропрепаратах суставного хряща хондроциты поверхностной зоны располагались параллельно суставной поверхности, имели размер в пределах 10-15 мкм. Хондроциты имели шаровидную и овальную форму и имеют четко выраженное ядро (рис 3А, 4А). В промежуточной и глубокой зоне хондроциты имели округлую форму, изогенные группы хондроцитов, включали от 2 и более клеток. Хондроциты промежуточной и глубокой зоны значительно отличались от хондроцитов поверхностной зоны, имели более крупное и базофильное ядро, ядерно-цитоплазматическое отношение было выше, за счет увеличения цитоплазмы клетки. По полученным мифологическим признакам можно сказать, что в поверхностной зоне преобладают хондроциты III - типа, в промежуточной и глубокой зонах I и II-типа, (Рис. 3Б, 3В, 4Б, 4В).

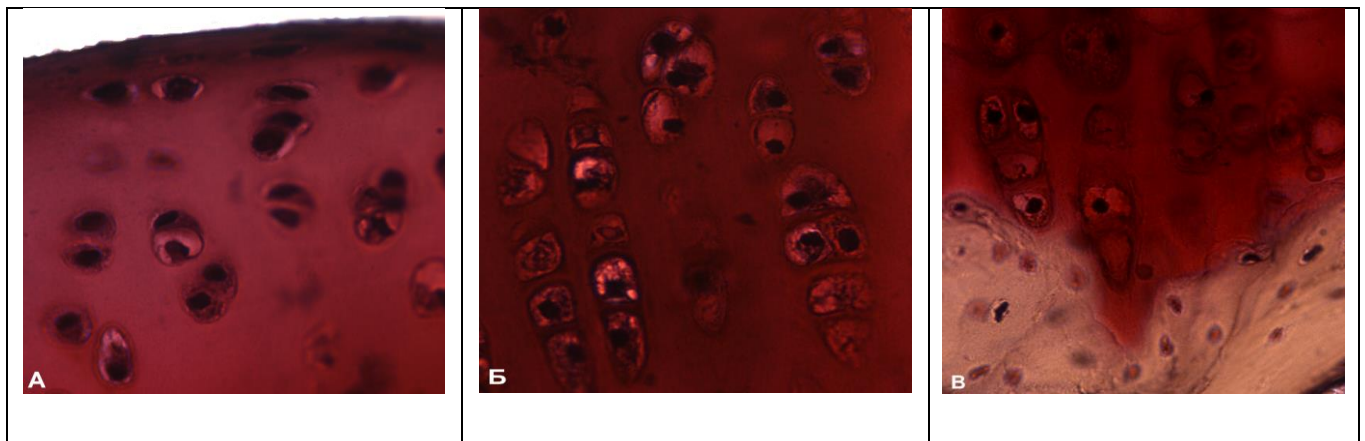


Рисунок 3 Интактный суставной хрящ нагружаемой области коленного сустава крысы: А – хондроциты суставной поверхности и поверхностной зоны, наблюдалось наличие хондроцитов III типа; Б - хондроциты промежуточной зоны, изогенные группы хондроцитов состоят из 3-4 клеток, представленные хондроцитами II типа; В - хондроциты глубокой зоны, представлены I типом хондроцитов, окраска сафранином О (x560)

Окраска гематоксилином и эозином позволила зафиксировать форму и численную плотность клеток на протяжении всего суставного хряща нагружаемых и не нагружаемых областей каждой зоны. Как показано на изображении гистологического препарата (рис. 1), количество клеток

увеличивается в промежуточной зоне нагружаемой области в сравнении с не нагружаемой областью.

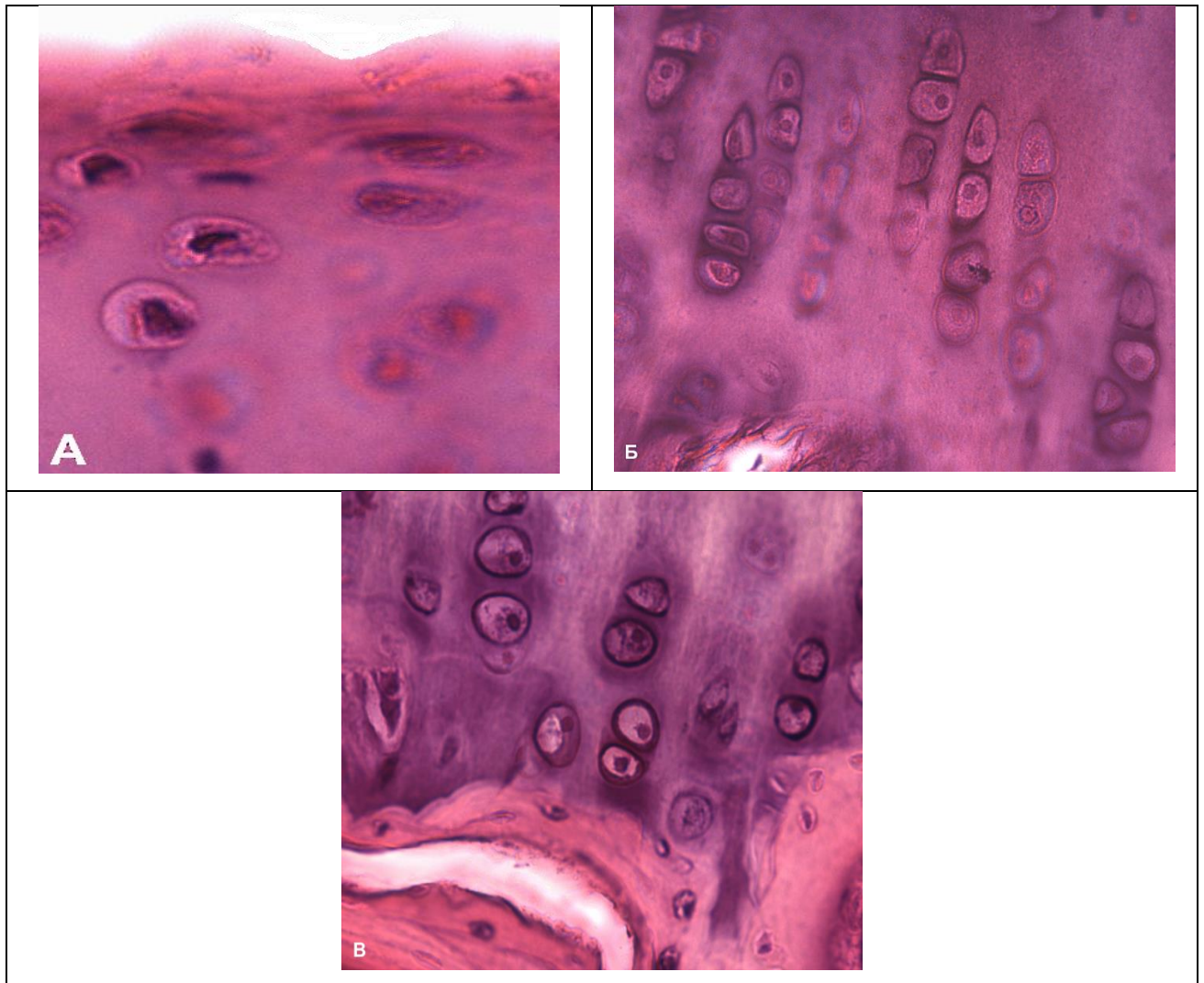


Рисунок 4 Интактный суставной хрящ нагружаемой области коленного сустава крысы: А – хондроциты суставной поверхности и поверхностной зоны, наблюдалось наличие хондроцитов III типа; Б - хондроциты промежуточной зоны, изогенные группы хондроцитов состоят из 3-4 клеток, представленные хондроцитами II типа, так же видны колонки хондроцитов; В - хондроциты глубокой зоны, представлены I типом хондроцитов. Окраска гематоксилином и эозином (x560)

Средняя радиальная толщина была заметно больше в нагружаемых областях (150-250 мкм) в сравнении с не нагружаемыми областями (80-110 мкм). Нагружаемые области хряща имели более высокую численную плотность хондроцитов в промежуточной зоне, а также удельная яркость хрящевого матрикса не были столь отчетливы. При сканировании выявлялась, прежде всего, неоднородность радиальной толщины хряща, более отчетливо выраженная в

нагружаемых областях сустава. Расстояние от достаточно гладкой суставной поверхности до костных балок оказалось весьма вариабельной величиной, варьирующей в поле зрения более чем в 2 раза (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрическая характеристика нагружаемых и не нагружаемых областей суставного хряща

Показатель	Нагружаемые области			Не нагружаемые области		
	Me	1-й кв.	3-й кв.	Me	1-й кв.	3-й кв.
Радиальная толщина хряща, мкм	185	170	202	90	82	95
Численная плотность хондроцитов в поверхностной зоне, 1/мм ³	495	273	680	429	261	615
Численная плотность хондроцитов в промежуточной зоне, 1/мм ³	837	545	1124	527	377	634
Численная плотность хондроцитов в глубокой зоне, 1/мм ³	1191	975	1538	1052	822	1230
Удельная яркость хрящевого матрикса, усл. ед.	1,84	1,63	1,96	1,71	1,51	1,82

В нагружаемых областях сустава при сканировании удельной яркости хрящевого матрикса и численной плотности хондроцитов в направлении, параллельном суставной поверхности, выявлялись неоднородные участки размерностью порядка 60–150 мкм, стоящие друг от друга на соразмерные расстояния. Прирост оптической плотности хрящевого матрикса внутри этих участков по амплитуде составлял от 10 до 25 % от плотности хрящевого матрикса между такими участками (рис. 5). В суставном хряще интактных крыс такие участки занимали от 25 до 40 % объема хряща (в нагружаемых областях) и имели на срезах форму неправильной трапеции, расширяющейся по направлению от остеохондральной костной пластинки к суставной поверхности. Всего на гистологических препаратах было идентифицировано 448 неоднородных участков, их вариационные ряды, основанные на выделении по варьированию каждого из этих признаков.

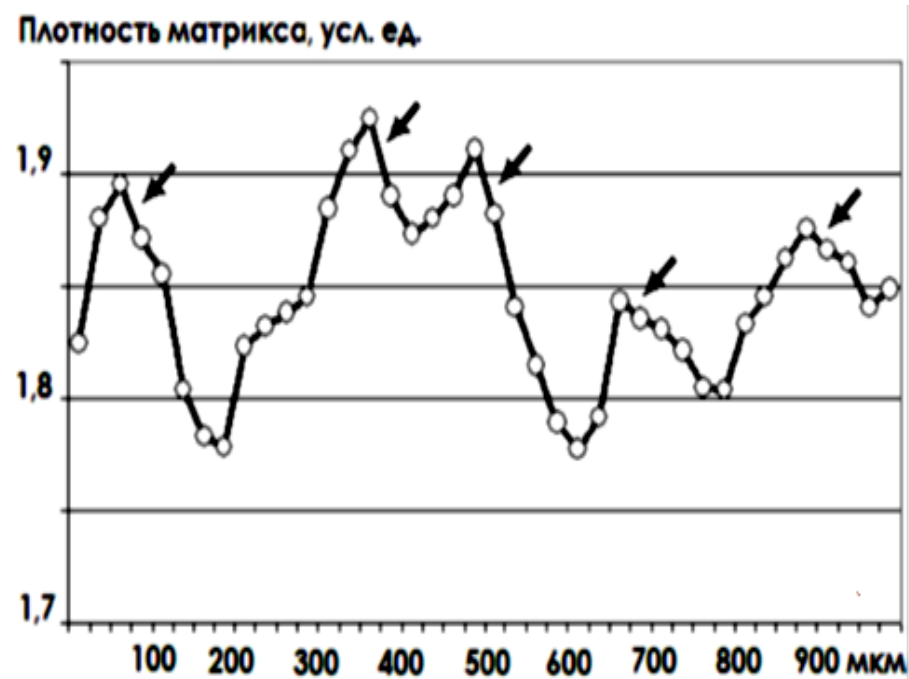


Рисунок 5. Кривая распределения оптической плотности хрящевого матрикса при сканировании параллельно суставной поверхности

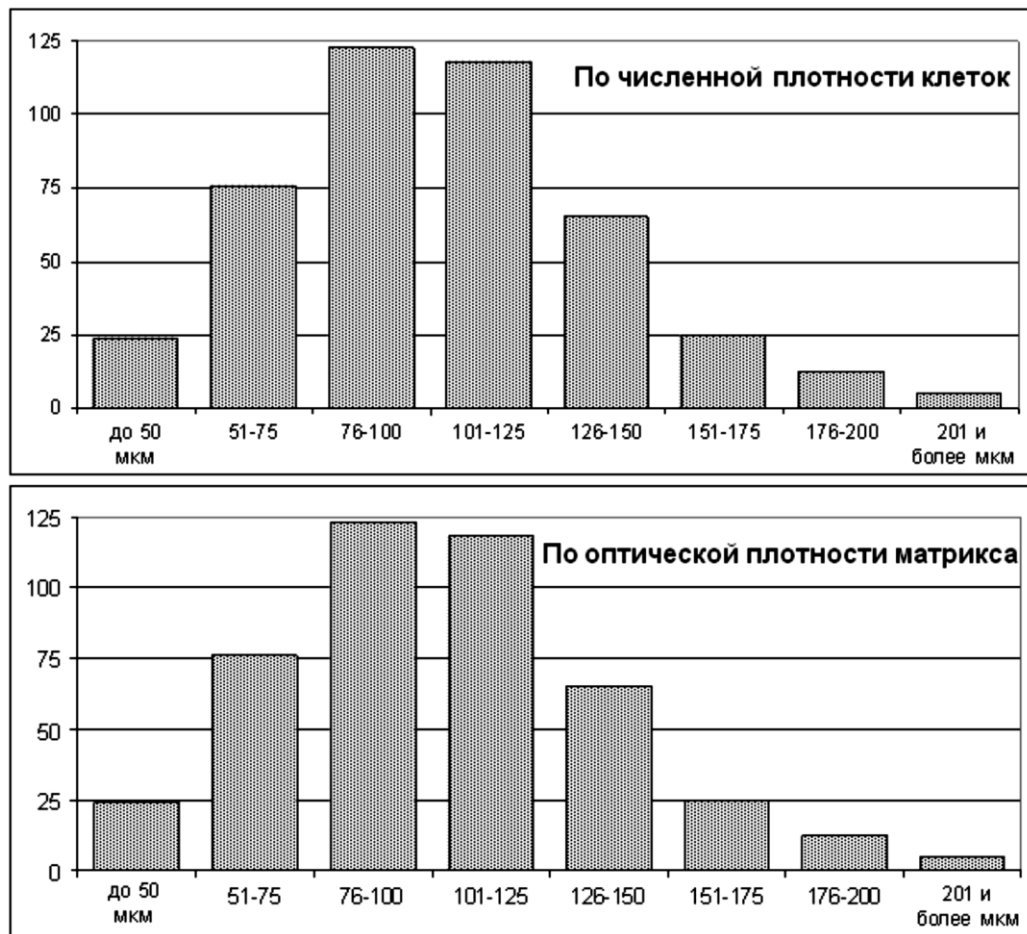


Рисунок. 6. Распределение неоднородности суставного хряща по величине поперечного размера на уровне промежуточной зоны хряща (мкм). По оси ординат — число неоднородных участков хрящевого матрикса

Как видно из графиков (Рис. 6), распределение было непараметрическим, с асимметрией влево, и цензурировано размерами клеток, поскольку невозможно существование участка менее 40 мкм в поперечнике. Измерения подтвердили постепенное увеличение поперечника неоднородных участков к наружной зоне хряща в 1,4-1,6 раза от размеров вблизи остеохондральной костной пластинки. Число хондроцитов в каждом участке, с учетом объема, варьировало в широких пределах (от 96 до 1600) с медианой возле 800. Это соответствовало нахождению в кластере сотен изогенных групп хондроцитов. От окружения такие участки отличались более плотным расположением клеток (в 1,6-1,3 раза) и более высокой оптической плотностью хрящевого матрикса (в 1,2-1,4 раза). Это свидетельствовало об их более высокой функциональной активности в отношении синтеза компонентов основного вещества хрящевого матрикса (рис. 6).

Таким образом, следующим шагом стала оценка синтетической активности хондроцитов в участках компонентов хрящевого матрикса промежуточной (агрекана) и поверхностной (лубрицина) зон. На полученных гистологических препаратах наблюдалась интенсивная экспрессия хондроцитами основного протеогликана хрящевого матрикса, наибольшая интенсивность синтеза наблюдалась в промежуточной зоне суставного хряща, помимо характерного наличия агрекана в основном веществе хрящевого матрикса, также наблюдалось концентрирование протеогликанов в интертерриториальном матриксе (табл. 3).

Таблица 3

Экспрессия агрекана и лубрицина в суставном хряще intactных животных

Показатель	Intactные животные		
	Me	1-й квартиль	3-й квартиль
Объемная доля агрекан- позитивных участков, %	64	59	70
Индекс синтетической активности агрекана, %	75	68	82
Объемная доля лубрицин- позитивных участков, %	28	24	34
Индекс синтетической активности лубрицина, %	45	40	53

Объемная доля агрекан-позитивных участков в промежуточной зоне хряща составляла около 64 %, внутри исследуемых неоднородных участков – более 80%. Индекс синтетической активности агрекана в промежуточной зоне хряща у интактных крыс составил 75 %, варьировался от 68 до 82%.

На полученных гистологических препаратах поверхностной зоны и в пределах суставной поверхности была видна экспрессия белка поверхностной зоны – лубрицина, на переходе между поверхностной и промежуточной зоной и по направлению к остеохондральной костной пластинке экспрессия лубрицина не была зафиксирована. Объемная доля лубрицин-позитивных участков в поверхностной зоне хряща была меньше агрекан-позитивной зоны – около 30 %, внутри неоднородных участков – до 50 %. Индекс синтетической активности в поверхностной зоне хряща у интактных крыс варьировался на уровне 45 % (табл. 3) (рисунок 7).

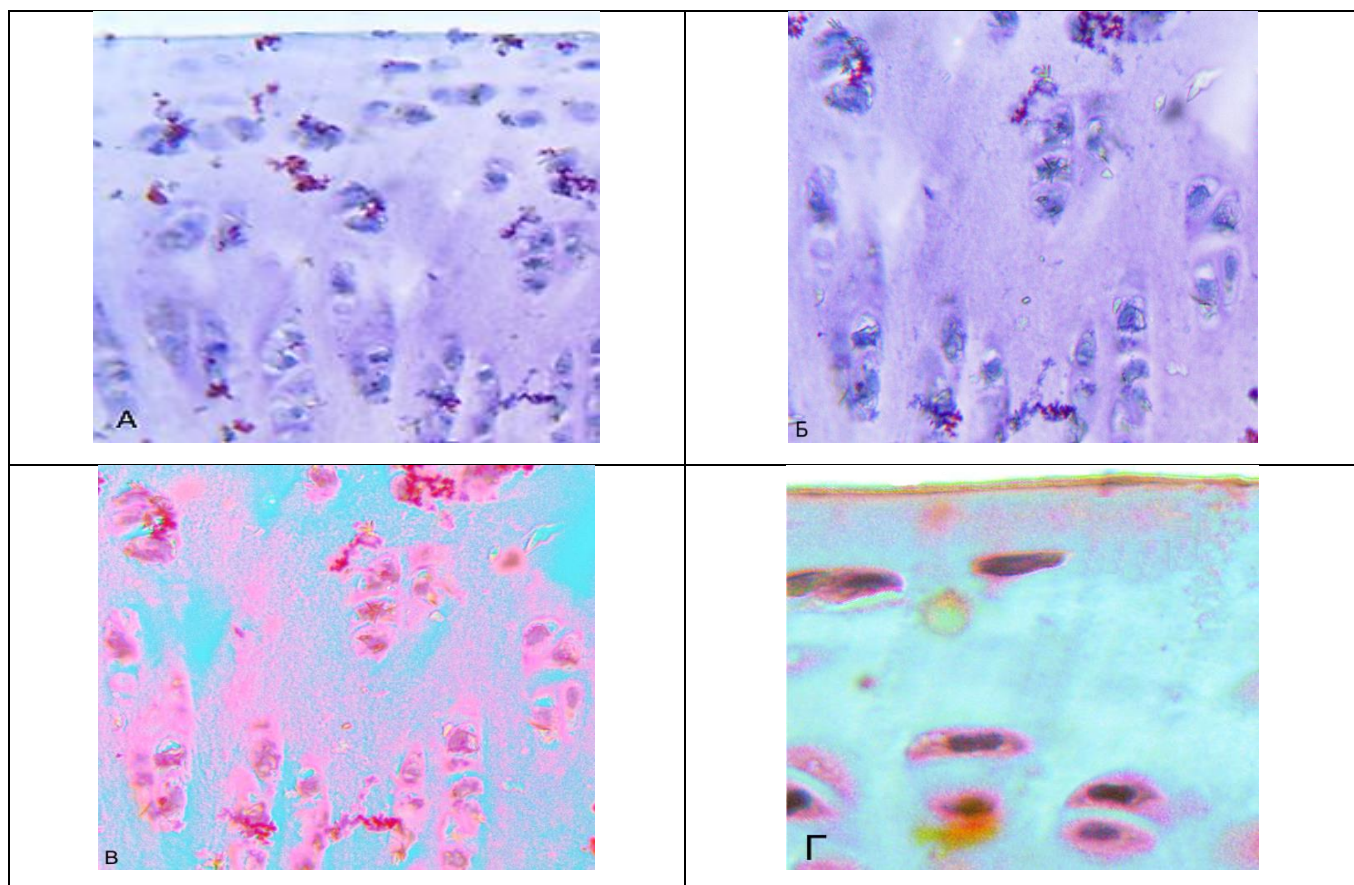


Рисунок 7. Интактный суставной хрящ коленного сустава крысы, иммуногистохимическая окраска А,Б, В - Агрекан (SC-16493) – протеогликан хрящевого матрикса суставного хряща; Г - Лубрицин (SC-50079) – белок поверхностной зоны суставного хряща. Подкраска гематоксилином Мэйра x240, x560.

Умеренное повышение синтетической активности хондроцитов в нагружаемых и незначительное снижение в ненагружаемых участках показало, что неоднородность участков характеризуется не только увеличенной плотностью хрящевого матрикса и численной плотностью хондроцитов. А также высокой синтетической активностью компонентов хрящевого матрикса.

Анализ 3D-реконструкций позволил провести оценку морфометрических показателей: толщина суставного хряща, рельеф суставной поверхности и среднюю/удельную яркость хрящевого матрикса. В результате анализа серийных изображений суставного хряща коленного сустава сохранялся натуральный цвет и форма всех тканевых структур. Разрешающая способность была достаточна для морфометрической и цветовой оценки суставного хряща (рис. 8).



Рисунок 8. Трехмерная реконструкция коленного сустава крысы: А – срез в сагиттальной плоскости и Б – срез в фронтальной плоскости у intactных животных, Сечение проведено в направлении от суставной поверхности к глубокой зоне большеберцовой кости. Хорошо видны все тканевые структуры, сохранен натуральный цвет объектов. Увеличение x10

Показатели морфометрии 3D-реконструкции суставного хряща интактных суставов крыс

Показатель	Интактные животные	
	Гистологический срез	3D-реконструкция
Рельеф суставной поверхности	1,08 [1,04 ÷ 1,16]	1,16 [1.05 ÷ 1.20]
Радиальная толщина хряща, мкм.	185 [170 ÷ 202]	232 [193 ÷ 270]
Удельная яркость матрикса хряща, усл. ед.	1,8 [1,6 ÷ 1,9]	-
Средняя яркость матрикса хряща, усл. ед.	-	73 [57 ÷ 88]

Анализ 3D-реконструкций позволил провести оценку морфометрических показателей: толщина суставного хряща, рельеф суставной поверхности и среднюю яркость хрящевой ткани (табл. 4). Полученные 3D-реконструкции в целом позволили получить показатели со сходной информативностью. Различия между показателями рельефа суставной поверхности гистологическим препаратом и 3D-реконструкцией составили приблизительно 10%.

При этом было отчетливо заметно, что радиальная толщина определяется несколько большей, чем на изображениях гистологических препаратов, что мы связываем с отсутствием деформаций и уменьшения блока в результате его фиксации формалином и декальцинации, показатель толщины гистологического среза был в 1.25 раза меньше чем в 3D-реконструкции. Единственным недостатком 3D-реконструкции было отсутствие возможности измерить показатель численной плотности хондроцитов в различных зонах суставного хряща.

3.2. Морфофункциональная характеристика суставного хряща в условиях повышенной механической нагрузки.

Перерезка крестообразных связок практически не сопровождалась изменениями радиальной толщины хряща в нагружаемых областях сустава – в большинстве случаев она варьировалась в среднем около значения 190 мкм с разбросом по квартилям от 160 до 230 мкм с заметным увеличением разброса значений к поздним срокам эксперимента. Полученные данные соответствуют использованной модели [150]. Результаты количественной морфометрии суставного хряща у крыс интактной и экспериментальной групп приведены в табл. 5.

Таблица №5

Морфологические параметры суставного хряща в условиях повышенной нагрузки в зависимости от сроков эксперимента

Показатель	Интактные животные	Сроки эксперимента		
		3 недель	6 недель	12 недель
Оценка по шкале V.B. Kraus [161], баллов	1 [0 ÷ 1]	1 [1 ÷ 3]	4 [1 ÷ 9]	8 [5 ÷ 11]
Рельеф суставной поверхности	1,08 [1,04 ÷ 1,16]	1,14 [1,06 ÷ 1,25]	1,23 [1,15 ÷ 1,30]	1,36 [1,22 ÷ 1,57]*
Радиальная толщина хряща, мкм	185 [170 ÷ 202]	190 [166 ÷ 210]	183 [168 ÷ 230]	190 [160 ÷ 227]
Численная плотность хондроцитов, 1/мм ³	860 [693 ÷ 1037]	974 [801 ÷ 1142]	1244 [980 ÷ 1468]*	920 [785 ÷ 1063]
Оптическая плотность хрящевого матрикса, усл. ед.	1,84 [1,63 ÷ 1,96]	1,74 [1,59 ÷ 1,86]	1,56 [1,48 ÷ 1,65]*	1,51 [1,43 ÷ 1,64]*

В результате оценки степени развития ОА по шкале V.B. Kraus суставной хрящ у интактных животных в большинстве случаев был оценен от 0 до 1 баллов.

На 3-й неделе оценки морфологических параметров ОА возрастали незначительно, также за счет оценки качества поверхности и плотности хрящевого матрикса (рис. 9). На 6-й неделе после ППКС были зафиксированы истинные фиссуры, а в глубокой и промежуточной зонах наблюдались участки, характеризующихся гиперцеллюлярностью. В большинстве суставов регистрировалось уменьшение плотности хрящевого матрикса различной интенсивности. На поздних сроках эксперимента наиболее часто степень ОА оценивалась на уровне от 5 до 11 баллов, к вышеописанным признакам прибавлялись факты обнаружения истинных кластеров, единичных остеофитов в глубокой зоне хряща, а также повреждений остеохондральной костной пластинки. Все это позволяло отнести обнаруженные изменения на 6-й неделе к минимальным, а к 12-й неделе – к умеренным признакам сформированного ОА.

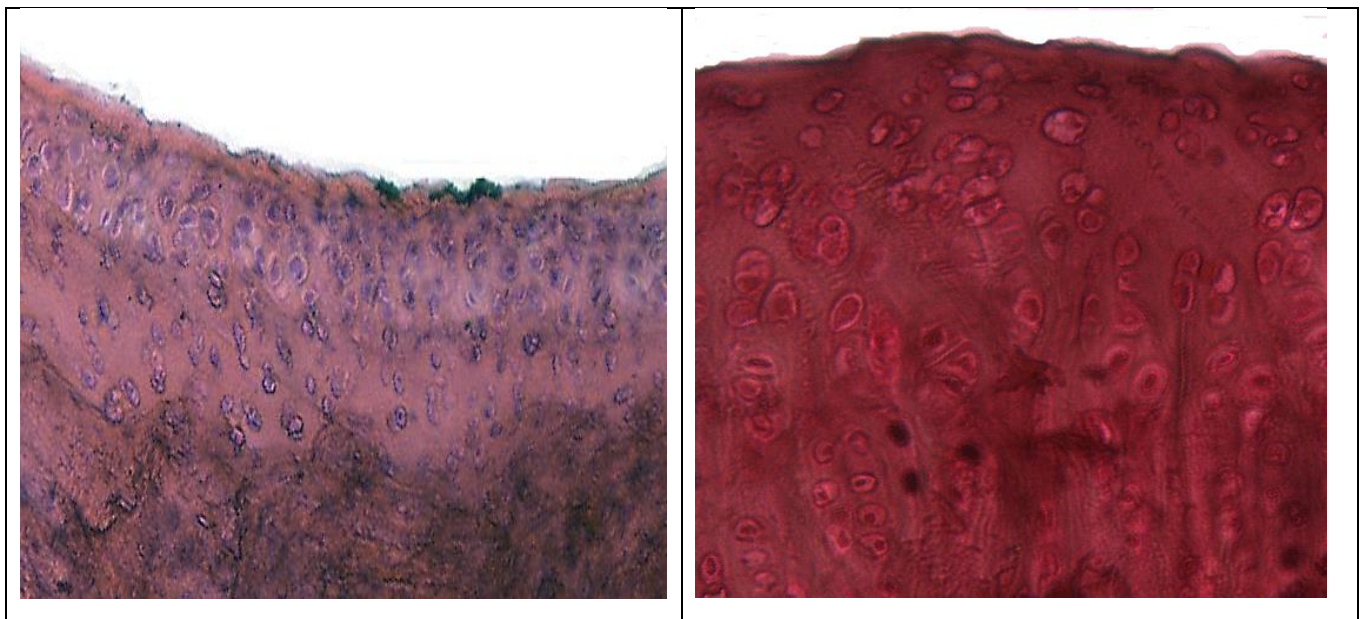


Рисунок 9. Дегенеративные изменения суставного хряща коленного сустава крысы: через 3 недели. Окраска гематоксилином и эозином (x240) и через 6 недель, окраска сафранином. О (x400).

Показатель рельефа суставной поверхности, отражающий степень ее регулярности, при измерении образцов тканей составил 1,08 в суставах интактных животных. По мере развития ОА величина этого показателя увеличивалась, превышая значения у интактных животных к 6-й неделе на 13,8 %, к 12 неделе – на 25,8 % ($p < 0,01$).

Численная плотность хондроцитов в промежуточной зоне хряща возрастала к 3-й неделе эксперимента в 1,13 раза, к 6-й неделе – 1,45 раза ($p < 0,01$), в последующем уменьшаясь практически до значений показателя у интактных животных

Удельная яркость хрящевого матрикса составляла в среднем 1,84 усл. ед., варьируясь по квартилям в пределах 20 %. По мере нарастания сроков эксперимента наблюдалось достоверное уменьшение средней оптической плотности хрящевого матрикса: к 6-й неделе после ППКС – в 1,18 раза, к 12-й неделе – в 1,22 раза ($p < 0,01$). ППКС, приводящая к развитию экспериментального ОА, сопровождалась изменениями неоднородных участков суставного хряща (Рис. 10).

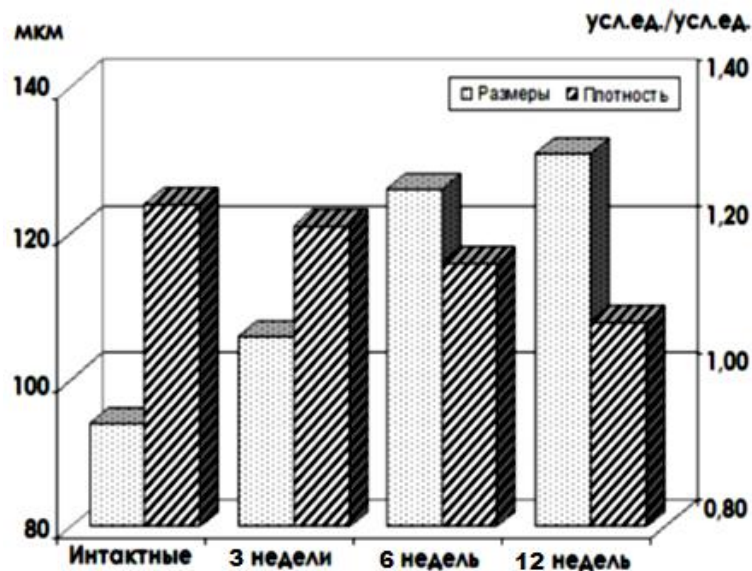


Рисунок 10. Изменения размеров и относительной плотности матрикса неоднородных участков суставного хряща крыс при экспериментальном остеоартрозе

Средние размеры неоднородных участков увеличивались по мере нарастания сроков эксперимента: к 3-й неделе – в 1,13 раза, к 6-й неделе на треть ($p < 0,01$), к 12 неделе – в 1,39 раза ($p < 0,01$) от величины аналогичного показателя у интактных животных. Параллельно регистрировалось падение относительной плотности хрящевого матрикса: если в неоднородных участках хряща у интактных крыс величина показателя составляла в среднем 1,25, то к 12-й неделе эксперимента – только 1,07.

Результаты полуколичественного определения синтетической активности хондроцитов промежуточной и поверхностной зонах суставного хряща приведены на рис. 11.

После ППКС существенной динамики показателя не прослеживалось, за исключением тенденции к незначительному снижению к 12-й неделе эксперимента.

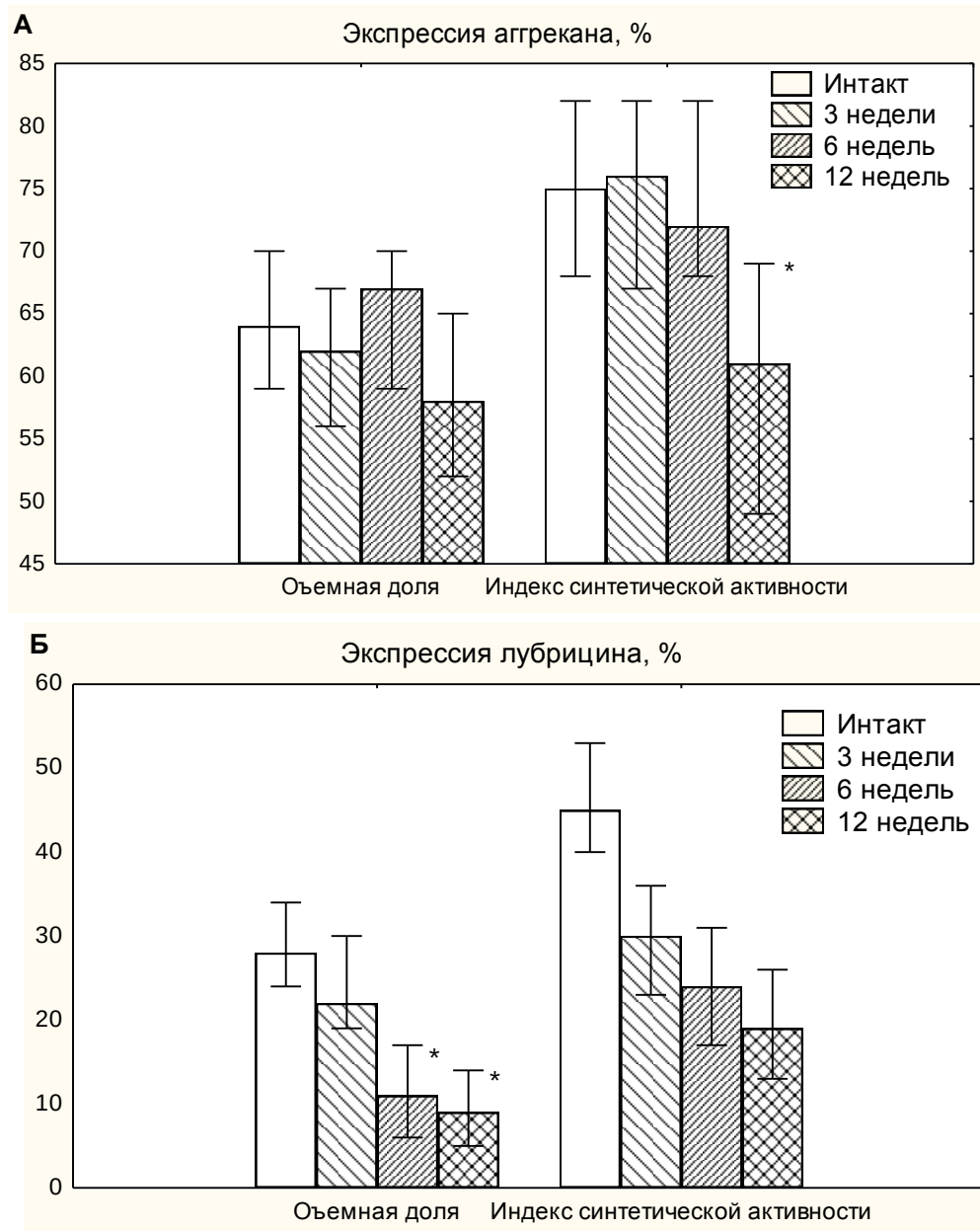


Рисунок 11. А – объемная доля позитивных участков и индекс синтетической активности агрекана в суставном хряще у интактных животных и при моделировании остеоартроза. Б - объемная доля позитивных участков и индекс синтетической активности лубрицина в поверхностной зоне суставного хряща у интактных животных и при моделировании экспериментального остеоартроза

При ППКС индекс синтетической активности агрекана начинал уменьшаться, начиная с 6-й недели, к 12-ой неделе он составлял 81.3% по сравнению со значения показателя у интактных животных.

Объемная доля лубрицин-позитивных участков в поверхностной зоне хряща к 3-й неделе эксперимента она уменьшалась в 1,26 раза, к 6-й неделе – в 2,54 раза ($p < 0,01$), к 12-й неделе – более чем в три раза ($p < 0,01$). Индекс синтетической активности лубрицина в поверхностной зоне хряща у крыс интактных животных варьировался на уровне 45 %, а по мере развития экспериментального ОА постепенно снижался, к 12-й неделе 42,1 % от величины показателя у интактных животных.

Суставной хрящ коленного сустава крыс после анализа с помощью световой микроскопии характеризуется неоднородным строением, в котором, можно выделить зоны: поверхностная, промежуточная, глубокая, но и полнослойные участки в виде колонок или полигональных усеченных пирамид, расширяющихся к суставной поверхности суставного хряща. Такие участки занимают около 1/3 объема хрящевого матрикса и для них более характерна высокая плотность хрящевого матрикса и численное количество хондроцитов. Развитие смоделированного ОА сопровождается изменениями в структурной организации хряща: в поверхностной и промежуточных зонах он становится более однородным и менее плотным, нарушается синтез БПЗ/лубрицина, а также протеогликанов (агрекана); в глубокой зоне формируются более крупные кластеры с характерной гиперклеточностью и неоднородностью плотности хрящевого матрикса.

3.3. Морфофункциональная характеристика суставного хряща в условиях снижения лубрикативных свойств синовиальной жидкости.

В результате снижения лубрикативных свойств синовиальной жидкости путем введения медицинского талька привело к структурным изменениям суставного хряща. Деструктивные изменения выявлялись достаточно равномерно

на протяжении всех сроков экспериментов. Нарушение структуры суставной поверхности протекало не так интенсивно, как при ППКС. Суставная поверхность была частично разрушена, особенно сильное разрушение было на 3-й неделе, к 6-й и 12-й неделе повреждения суставной поверхности были малозаметны. Хондроциты поверхностной зоны были овальной формы и располагались параллельно суставной поверхности в поверхностной зоне, но в связи с её разрушением, идентификация хондроцитов не представлялась возможной.

В промежуточной зоне на всех сроках эксперимента при окраске сафранином О была зафиксирована сильная кластеризация которую можно рассматривать как патологическую, или же, как физиологическую регенерацию суставного хряща, путем пролиферации и дифференцировки хондроцитов, для восполнения и усиления синтетической активности, в одной изогенной группе количество хондроцитов было в 2 раза больше чем у интактных животных. На отдельных участках суставного хряща при окраске гематоксилином и эозином были зафиксированы деструктивные изменения с пикнозом ядер хондроцитов и лизисом клеточных элементов. На некоторых участках межклеточное вещество было представлено гомогенной однородной массой лишенной частично или полностью клеточных элементов.

Получение изображения суставного хряща и его поверхности (Рис. 12) были подвергнуты анализу и в результате были полученные следующие морфофункциональные изменения суставной поверхности и хрящевого матрикса суставного хряща, представленные в табл. 7

Полученные результаты показывают, что показатель рельефа суставной поверхности, отражающий степень ее регулярности, при измерении образцов тканей варьировался в суставах интактных животных от 1,04 до 1,16 с медианой 1,08. По мере снижения лубрикативной функции синовиальной жидкости величина этого показателя уменьшалась, к 6-й неделе на 23,9 %, к 12 неделе – на 45,9 % ($p < 0,01$).

Численная плотность хондроцитов в поверхностной зоне хряща снижалась к 3-й неделе эксперимента в 1,13 раза, к 6-й неделе – 1,45 раза ($p < 0,01$), в

последующем уменьшаясь практически в 2 раза по сравнению со значением показателя у интактных животных.

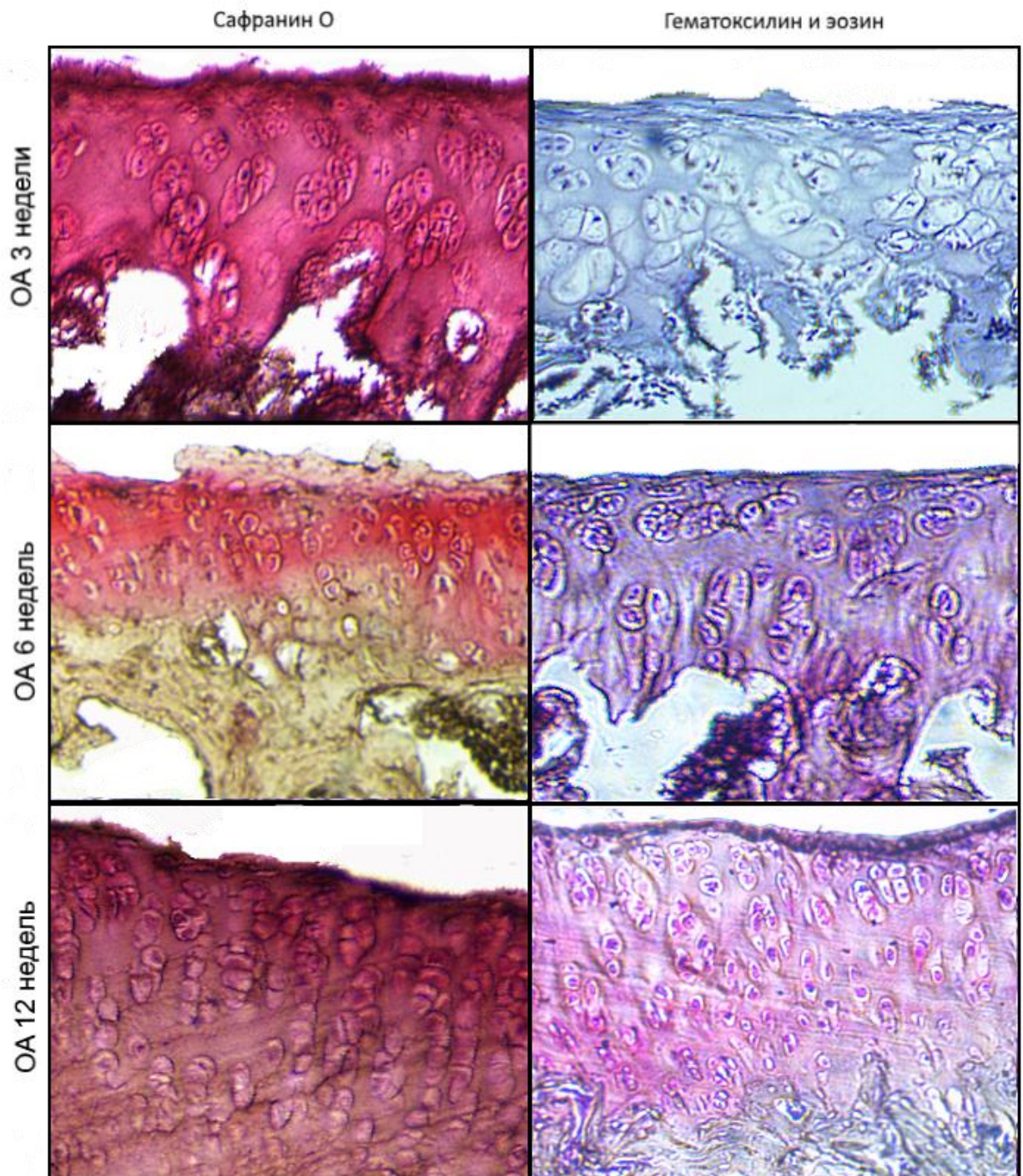


Рисунок. 12. Суставной хрящ коленного сустава крысы: суставной хрящ при экспериментальном ОА на 3 неделе, стирание суставной поверхности и повреждение поверхностной зоны; суставной хрящ при экспериментальном ОА на 6 неделе наблюдается истончение суставного хряща, значительное повреждение поверхностной зоны; суставной хрящ при экспериментальном ОА на 12 неделе незначительные повреждения суставной Окрашка гематоксилином и эозином (x240), окраска сафранином О (x240)

**Морфофункциональные изменения суставного хряща в условиях снижения
лубрикативных свойств синовиальной жидкости**

Показатель	Интактные животные	Сроки эксперимента		
		3 недели	6 недель	12 недель
		ОА		
Оценка по шкале V.B. Kraus [161], баллов	0 [0 ÷ 1]	5 [3 ÷ 8]	8 [5 ÷ 12]	9 [6 ÷ 14]
Рельеф суставной поверхности	1,02 [0,77÷1,05]	1,04 [0,81÷1,48]	1,13 [0,98÷1,38]	1,12 [0,97÷1,44]
Радиальная толщина хряща, мкм	185*# [170÷202]	104*# [84÷120]	115* [87÷151]	131* [97÷153]
Оптическая плотность хрящевого матрикса, усл. ед.	1,66 [1,62÷1,69]	1,68 [1,63÷1,72]	1,65 [1,59÷1,72]	1,45 [1,29÷1,53]
Численная плотность хондроцитов в поверхностной зоне, 1/мм ³	616 [550 ÷ 780]	456*# [337 ÷ 596]	238*# [178 ÷ 357]	178*# [139 ÷ 278]
Индекс синтетической активности ММП-9, %	0,38 [0,22÷0,59]	0,44# [0,38÷0,64]	0,59*# [0,39÷0,65]	2,01*# [1,87÷2,18]
Индекс синтетической активности ТИМП-1, %	1,95 [1,62÷2,69]	1,81# [1,53÷2,72]	1,55*# [1,44÷1,61]	1,06*# [0,99÷1,12]

В первой экспериментальной группе на гистологических срезах были видны небольшие дефекты суставной поверхности до промежуточной, реже – глубокой, зон хряща (рис. 12). Величина показателя рельефа суставной поверхности варьировала от 1,02 до 1,13 усл. ед., максимального значение наблюдалось на 6

неделе эксперимента. Радиальная толщина хряща уменьшалась в течение всего эксперимента, и имела минимальное значение на 3-й неделе, по сравнению с величиной в контрольной группе, к 6-й и 12-й неделе показатели выросли в 1,1 раза и 1,13 раза, соответственно ($p < 0,01$), по сравнению со значениями на 3-й неделе эксперимента (табл. 7).

Оптическая плотность матрикса в поверхностной и промежуточной зон хряща составила в среднем 1.66 усл. ед. у интактных животных и имела тенденцию к снижению по мере нарастания сроков эксперимента. На 6-й и 12-й неделе численная плотность клеток в поверхностной зоне значительно снижалась, в 2,5 раза и 3,5 раза, соответственно ($p < 0,01$), по сравнению с величиной показателя в контрольной группе (табл. 7).

В результате анализа морфологических параметров хондроцитов у интактных животных и на разных сроках эксперимента, не наблюдалось значительных изменений размеров хондроцитов, но к 12 неделям ядерно-цитоплазматическое отношение увеличилось почти в 3 раза по сравнению с тем же показателем у интактных животных. Это свидетельствовало, что хондроциты промежуточной зоны направлены на синтез компонентов хрящевого матрикса и снижение пролиферативной активности (табл. 8).

Таблица № 8

**Морфологические изменения параметров хондроцитов при
экспериментальном остеоартрозе**

Показатель	Интактные животные	Сроки эксперимента		
		3 недели	6 недель	12 недель
		ОА		
Размер хондроцитов в промежуточной зоне, мкм	30,2 [26,4 ÷ 33,97]	32,6 [23,9 ÷ 43,3]	27,24 [22,3 ÷ 35,8]	31,6 [25,9 ÷ 50,3]
Ядерно- цитоплазматическое отношение в хондроцитах промежуточной зоны	1,16 [0,89 ÷ 1,43]	1,62 [0,93 ÷ 2,51]	2,51 [1,23 ÷ 5,06]	3,61 [2,96 ÷ 7,32]

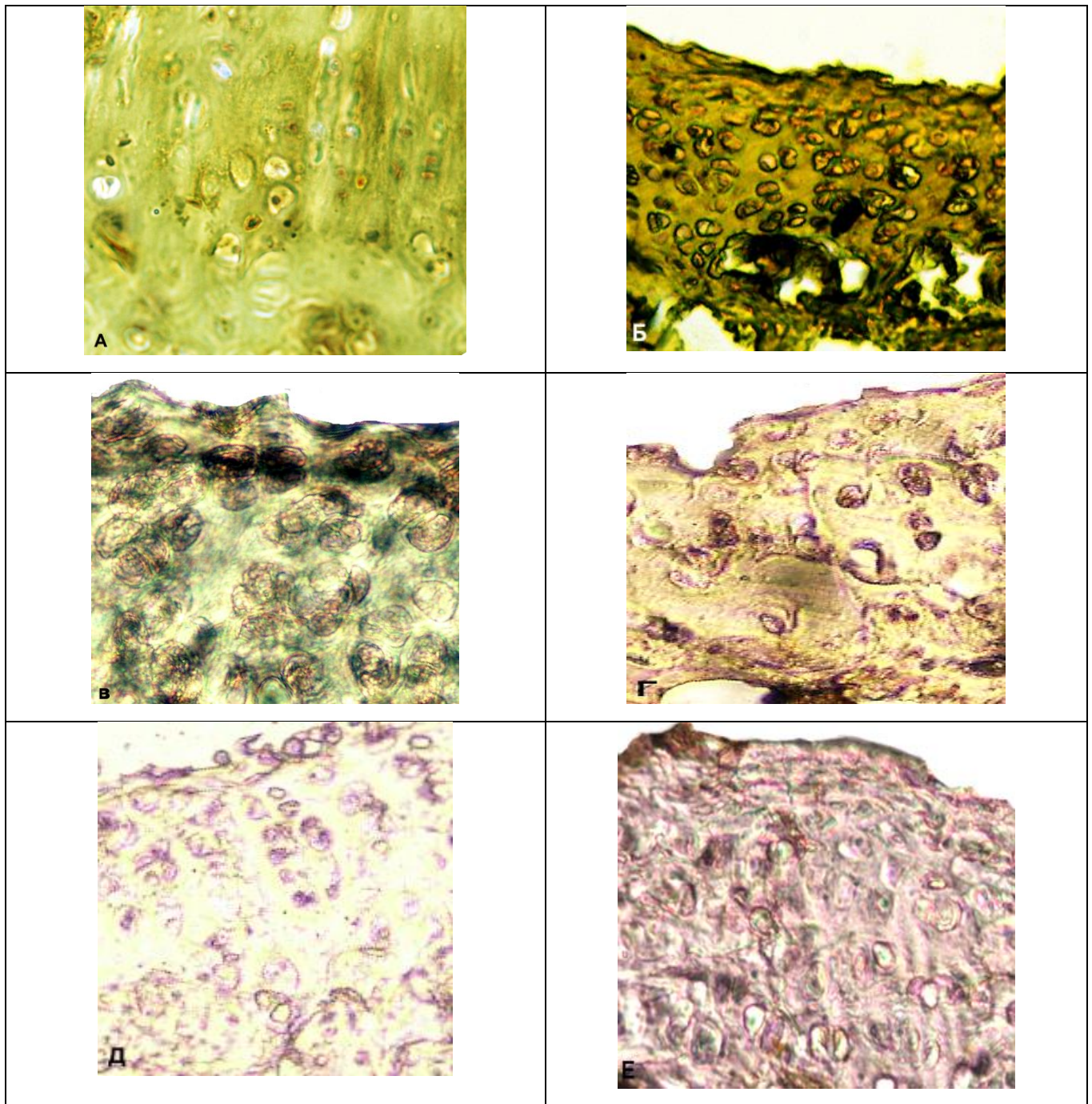


Рисунок 13. Экспрессия ММП-9 (AV33090) и ТИМП-1 (SAB4502971) в суставном хряще коленного сустава крысы: А – интактной суставной хрящ. Б – суставной хрящ через 3 недели после введения медицинского талька; В – суставной хрящ через 6 недель после введения медицинского талька; Г - суставной хрящ через 12 недель после введения медицинского талька; Экспрессия ТИМП-1 (SAB4502971) в суставном хряще коленного сустава крысы: Д – интактный суставной хрящ Е – суставной хрящ через 6 недель после введения медицинского талька; (x240, x560)

По мере развития ОА индекс экспрессии ММП-9 оказывался больше, превышая значения у интактных животных к 3-й неделе в 1,5 раза, к 12 неделе – в 5 раз ($p < 0,01$). В тоже время показатель индекса экспрессии ТИМП-1 был меньше величины в контрольной группе на всех сроках эксперимента и достигал минимального значения к 12-й неделе (табл. 7, рис. 13).

Таким образом, разрушение сопровождается стиранием суставной поверхности к поздним срокам эксперимента и происходит истончения суставного хряща. Иммуногистохимия гистологических препаратов показала усиление экспрессии ММП-9 в промежуточной и поверхностной зонах суставного хряща.

Анализ 3D-реконструкций суставного хряща суставного хряща коленного сустава сохранялся натуральный цвет и форма всех тканевых структур. Разрешающая способность была достаточна для морфометрической и цветовой оценки суставного хряща (рис. 14).

Анализ 3D-реконструкций позволил провести оценку морфометрических показателей: толщина суставного хряща, рельеф суставной поверхности и среднюю яркость хрящевой ткани (табл. 9)

Таблица 9

Морфометрические показатели суставного хряща у интактных и экспериментальных животных

Показатель	Интактные животные	Сроки эксперимента	
		6 недель	12 недель
		Остеоартроз	
Рельеф суставной поверхности	1.00 [0.94 ÷ 1.01]	1.07 [1.06 ÷ 1.09]	1.10 [1.05 ÷ 1.14]
Радиальная толщина хряща, мкм.	232 [193 ÷ 270]	170.12* [121 ÷ 237]	160# [110 ÷ 212]
Средняя яркость хрящевой ткани, усл. ед.	157 [151 ÷ 165]	39*# [30 ÷ 51]	61# [49 ÷ 68]

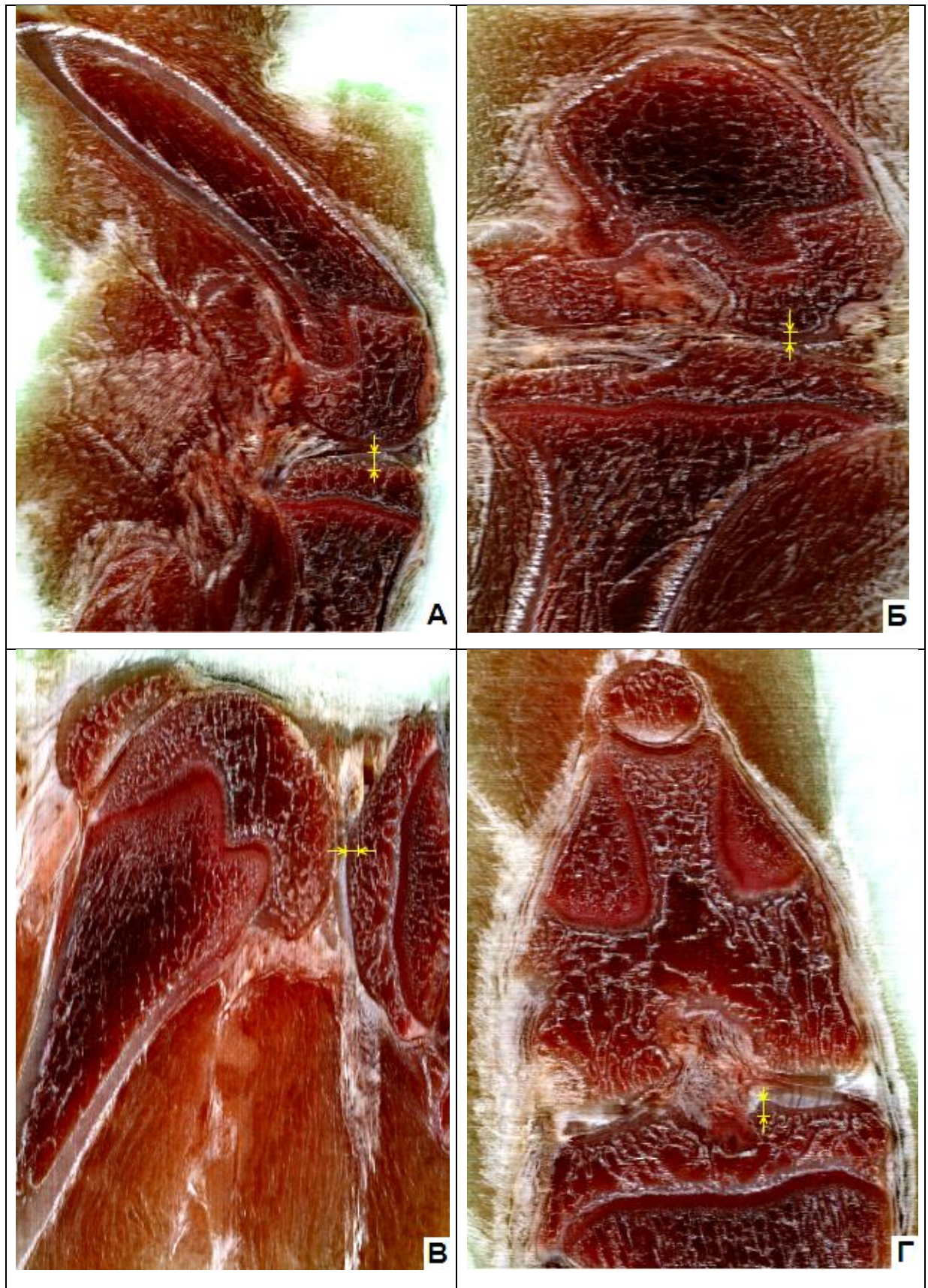


Рисунок 14. Трехмерная реконструкция коленного сустава крысы: А – срез в сагиттальной плоскости и Б – срез в фронтальной плоскости у интактных животных с экспериментальным ОА через 6 недель, В – срез в сагиттальной плоскости и Г – срез в фронтальной плоскости у животных с экспериментальным ОА через 12 недель. Сечение для получения RGB-профиля проведено в направлении от суставной поверхности к глубокой зоне большеберцовой кости. Увеличение x10

Рельеф суставной поверхности незначительно увеличился. Яркость хрящевого матрикса снизилась в 4 раза по сравнению с интактной группой, но к 12 неделям яркость увеличилась по сравнению с 6 неделями в 2 раза, это свидетельствует о том, что плотность структурных компонентов матрикса увеличилась.

Полученные результаты показали, что снижение лубрикативных свойств синовиальной жидкости привело к истончению суставного хряща по сравнению с интактным суставным хрящом, в период до 6 недель протекало интенсивное снижение, к 12 неделям достигло максимального значения по сравнению с интактной группой.

В результате полученные и проанализированные RGB-профили суставного хряща коленного сустава крысы представлены на (рисунке 15 А-Г).

При анализе RGB-профилей, видно, что цветовой компонент суставного хряща усиливается по направлению от суставной поверхности к глубокой зоне, как у интактных животных, так и с экспериментальным ОА. RGB-профиль также позволяет идентифицировать зоны суставного хряща: переход поверхностной зоны в промежуточную и переход из промежуточной в глубокую зону. Также на полученных профилях видно, что интенсивность пикселей R, G и B-каналов максимальна в суставном хряще у интактных животных, у животных с экспериментальным ОА интенсивность ниже в 1.5-2 раза, это может быть связано со снижением концентрации структурных компонентов хрящевого матрикса. Было зафиксировано, что самая высокая интенсивность RGB-профиля у интактных животных, но это связано с качеством и яркости исходных изображений, по сравнению с экспериментальными группами. На RGB-профиле экспериментальных групп зафиксировано, что к 12-й неделе интенсивность по R-компоненту возрастает в поверхностной зоне, а G и B-компоненты возрастают в промежуточной и глубокой зонах. Также на RGB-профилях видно, что к 12-й неделе средняя яркость возрастает, что говорит о снижении концентрации структурных компонентов хрящевого матрикса.

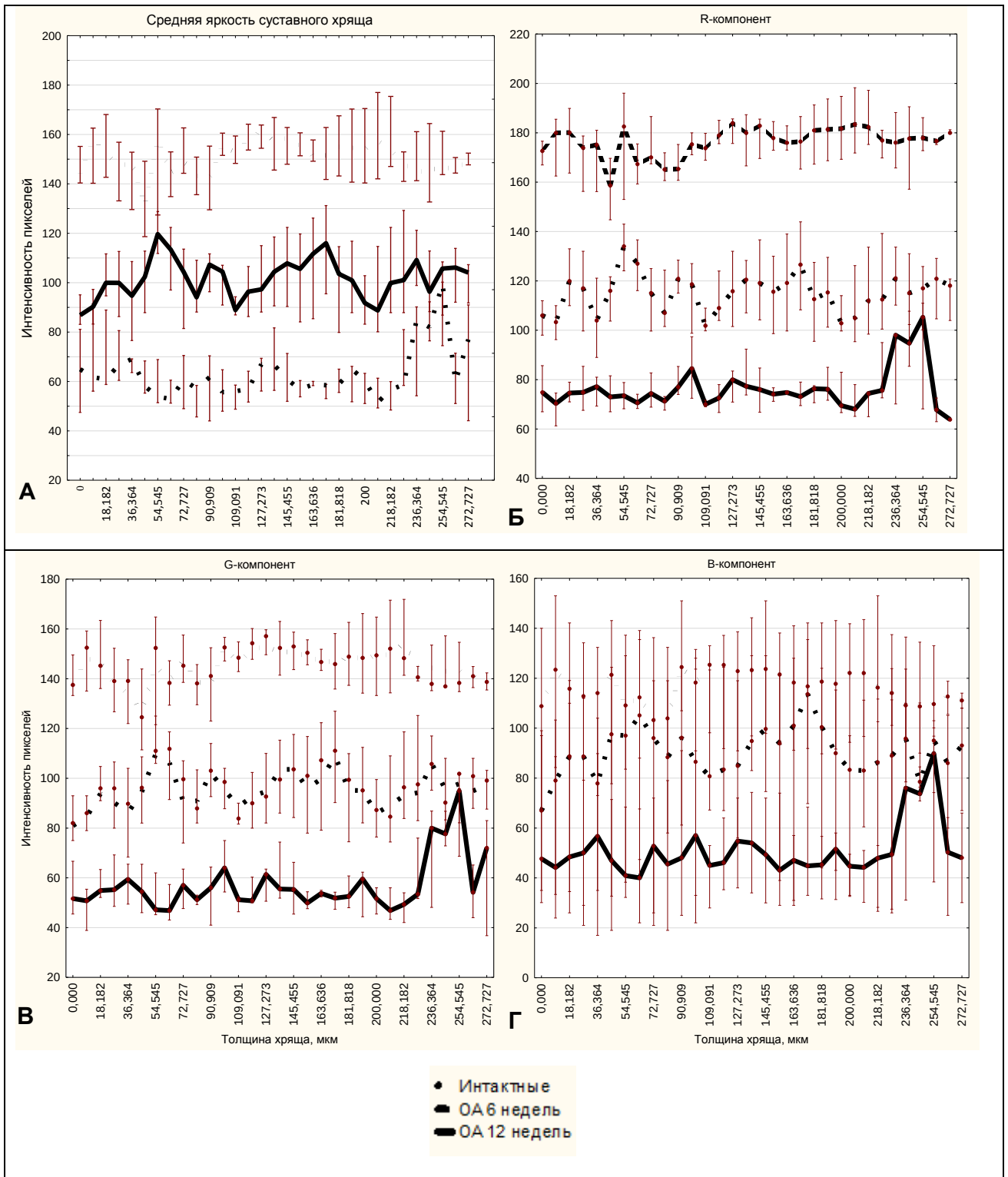


Рисунок. 15. RGB-профили: А-Общий профиль средней яркости суставного хряща, Б - профиль R-компонента суставного хряща, В- G-компонента суставного хряща, Г- B-компонента суставного хряща, Сечение для получения RGB-профиля проведено в направлении от суставной поверхности к глубокой зоне большеберцовой кости.

Полученные результаты оценки морфофункциональной характеристики суставного хряща показали, что в структуре матрикса можно выделить неоднородные участки, обладающие повышенной синтетической активностью как в интактном хряще, так и в результате повышенных механических нагрузок (модель перерезки передней крестообразной связки). Так и нарушение баланса экспрессии матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов хондроцитами. Также в результате моделирование механической нагрузки (внутрисуставное введение талька) деструкция суставной поверхности шла равномерно, но большее повреждение получали клеточные элементы хрящевого матрикса.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ И ОЦЕНКА ЛУБРИКАТИВНЫХ СВОЙСТВ СУБСТАНЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ БЕЛКИ СУРФАКТАНТА, IN VITRO

4.1 Разработка функциональной модели управления синтетической функции хондроцитов в суставном хряще

Для создания модели управления синтетической функцией хондроцитов, были выделенные и основные процессы, и рецепторы, участвующие в их регуляции. Изучения рецепторного аппарата и сигнальных молекул, которые участвуют в ремоделировании суставного хряща в норме. Их взаимодействие с лигандами приводило к активации одного из четырех процессов, связанных с ремоделированием: дифференцировки или апоптозу хондроцитов, синтеза компонентов хрящевого матрикса (коллагены II и X, агрекан) или ферментов их распада: металлопротеиназ (MMP), агрекиназ (ADAMTS) их ингибиторов (TIMP).

Описанная в результате группировка рецепторов хондроцитов и лигандов, запускающих ремоделирование суставного хряща использовалась для следующего этапа в создании функциональной модели при экспериментальном остеоартрозе и последующие ее обоснование (рис. 16).

Для создания функциональной модели был проведен дополнительный и более детальный анализ всех участников, описывающих процессы в суставном хряще. В результате было также сформировано четыре основных блока биологических процессов, представленных в табл. 10. Существующие управляющие механизмы (воздействия) на хондроцит в виде сигнальных молекул отражены в соответствующей правой колонке.

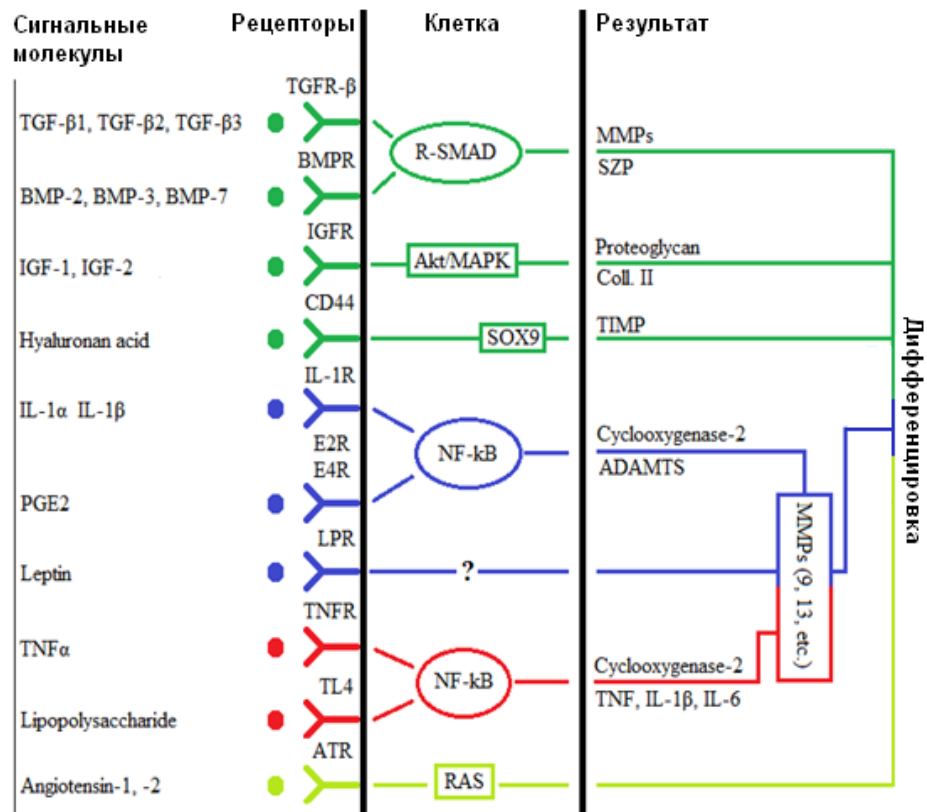


Рис. 16. Результат взаимодействия рецепторов хондроцитов со специфическими лигандами, воздействующих на ключевые функции в хрящевой ткани: ● – синтез хрящевого матрикса, ● – деградация хрящевого матрикса, ● – апоптоз, ● – дифференцировка.

Мы предполагаем, что описанные воздействия образуют некий набор различных индукторов ответных реакций хондроцитов, с тем отличием, что выбор ответа не является прерогативой хондроцита. В колонке расположенной посередине (Рецептор-Клетка) представлены рецепторы, взаимодействующие с их сигнальными молекулами, а следом представлены основные внутриклеточные переносчики сигнала. Результатом таких управляющих воздействий является синтез структурных компонентов хрящевого матрикса, экспрессия рецепторов и т. д. В конечном итоге, в крайней правой колонке (Результат) собраны и сгруппированы показатели текущего состояния суставного хряща. В исследованиях встречается большое количество различных сигнальных молекул, среди них были отобраны те, которые могут быть использованы, как маркеры, выраженные числовыми значениями. Среди достаточно большого количества

молекул, встречающихся в исследованиях, были отобраны маркеры, выражаемые числовыми значениями, В результате по совокупности которых можно сделать вывод о том, в каком состоянии на данный момент находится суставной хрящ: стабильности (норма), ремоделирования (физиологическая регенерация) или деградации (разрушение). По данным значениям индикаторов появилась возможность дать приблизительную оценку эффективности управления.

Таблица 10

**Процессы, сигнальные молекулы, ответные реакции хондроцитов
и маркеры состояний системы суставного хряща**

Сигнальные молекулы	Ответные реакции хондроцитов	Маркеры состояния системы
Пролиферация и дифференцировка хондроцитов		
Трансформирующий фактор роста (TGF-β) Инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) Костный морфогенетический белок - 7 (BMP-7)	Экспрессия PCNA и KI-67 Экспрессия рецептора CD-44 Экспрессия маркеров хондрогенеза COL2A1, COL10A1, RUNX2, SOX9	Численная плотность хондроцитов Объемная доля хондроцитов Среднее число клеток в изогенных группах хондроцитов
Апоптоз хондроцитов		
Фактор некроза опухоли (TNF-α) Интерлейкин-1 (IL-1α, IL-1β) Интерлейкин-6 (IL-6) Интерлейкин-8 (IL-8)	Синтез iNOS Синтез циклооксигеназы-2 (COX-2) Экспрессия TRAIL Экспрессия каспаз CASP-3, CASP-9	
Синтез хрящевого матрикса		Удельная прочность хряща Удельная яркость хрящевого матрикса Радиальная толщина хряща
Трансформирующий фактор роста TGF-β Инсулиноподобный фактор роста IGF-1 Костные морфогенетические белки BMP-2, BMP-7 Гиалуронат	Синтез и сульфатирование гиалуроната Синтез BMP-7 Синтез агреккана, коллагенов II и X Синтез TIMP-1, TIMP-3	
Резорбция хрящевого матрикса		
Факторы роста фибробластов (FGF-2/FGF-β, FGF-18)	Синтез металлопротеиназ (MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-13, ADAMTS-5)	

На основании полученных данных виртуального скрининга была построена функциональная модель (схема) суставного хряща. В центре схемы расположены – хондроциты, выполняющие основную роль функционировании суставного хряща. В верхней части расположены индикаторные показатели, на основании которых может быть использовано то или иное управляющее воздействие путем взаимодействия сигнальных молекул со своими рецепторами. Последние показаны пунктирными стрелками.

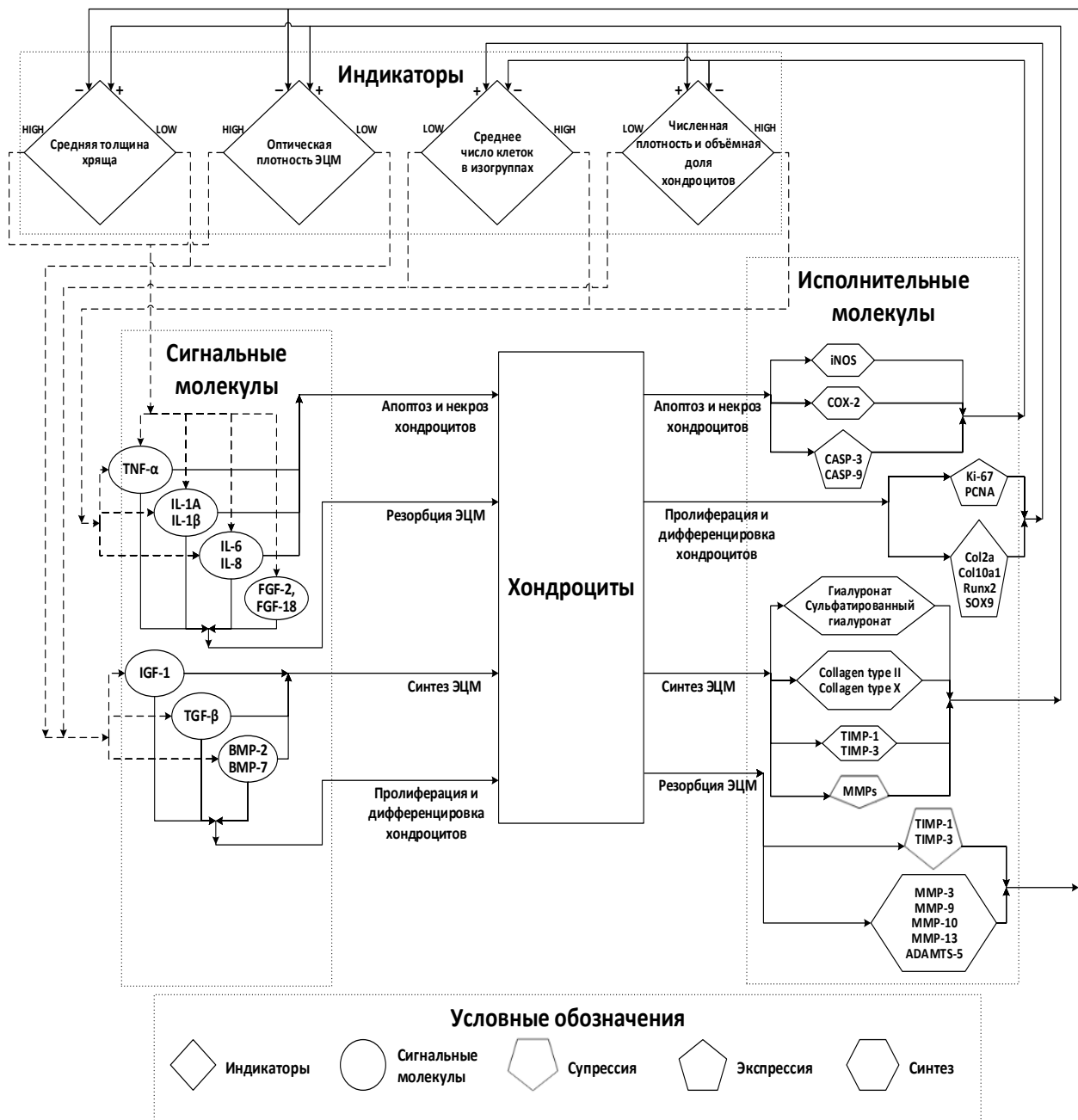


Рисунок. 17. Функциональная модель молекулярных взаимодействий в суставном хряще.

Как пример управляющего воздействия, можно представить увеличение концентрации какого-либо фактора в 10 раз. Управляющее воздействие может быть опосредованно через СЖ (экзогенные) так и быть синтезирован самими хондроцитами (эндогенными), в ответ на внешние физические факторы (рис. 17).

В правой части схемы расположены основные реакции хондроцитов на управляющие воздействие, а именно апоптоз или пролиферация хондроцитов, синтез или разрушение хрящевого матрикса. Как пример, можно рассмотреть пролиферацию – опосредована через взаимодействие BMP со своим рецептором, то есть через рецепторный аппарат, который запускает синтез молекул, являющиеся маркерами пролиферации - KI-67, PCNA, или структурных компонентов хрящевого матрикса (гиалуронат, коллаген, протеогликаны). Также может быть запущен процесс разрушения хрящевого матрикса, за счет какого-либо фактора, стимулирующего синтез матричных металлопротеиназ. Основным результатом становится численный показатель индикатора (расположенных в верхней части), таким образом, мы наблюдаем весь процесс управления в суставном хряще.

Восприятие хондроцитами сигнальных молекул на самом деле происходит опосредованно – через рецепторный аппарат. Поэтому интенсивность ответа системы зависит не только от концентрации молекул, но и от степени экспрессии необходимых рецепторов на мембране хондроцитов. Результат действия управляющих агентов на систему суставного хряща использовался для построения действующей функциональной модели, в которой было установлена связь между сигнальными молекулами, исполнительными молекулами и их влиянием на измеряемые индикаторные показатели. Соответствующая диаграмма представлена на рис. 18.

Отметим, что в хряще всегда присутствуют все рассматриваемые сигнальные и исполнительные молекулы. Поэтому состояние рассматриваемого органа и, соответственно, численные значения индикаторов, зависят в первую очередь от соотношения концентраций.

Процессы синтеза и распада хрящевого матрикса, пролиферации и апоптоз хондроцитов протекают одновременно – решающим является преобладание анаболических процессов над катаболическими, или наоборот. В связи с этим, на диаграмме у блоков, изображающих исполнительные молекулы, появилось два входа – «+» и «-». «Плюс» означает, что соответствующая сигнальная молекула вызывает синтез исполнительных молекул этого типа – следовательно, их влияние на систему возрастает. «Минус» же означает подавление синтеза, супрессию – влияние таких молекул будет снижаться, а исполняемые ими процессы замедляться.

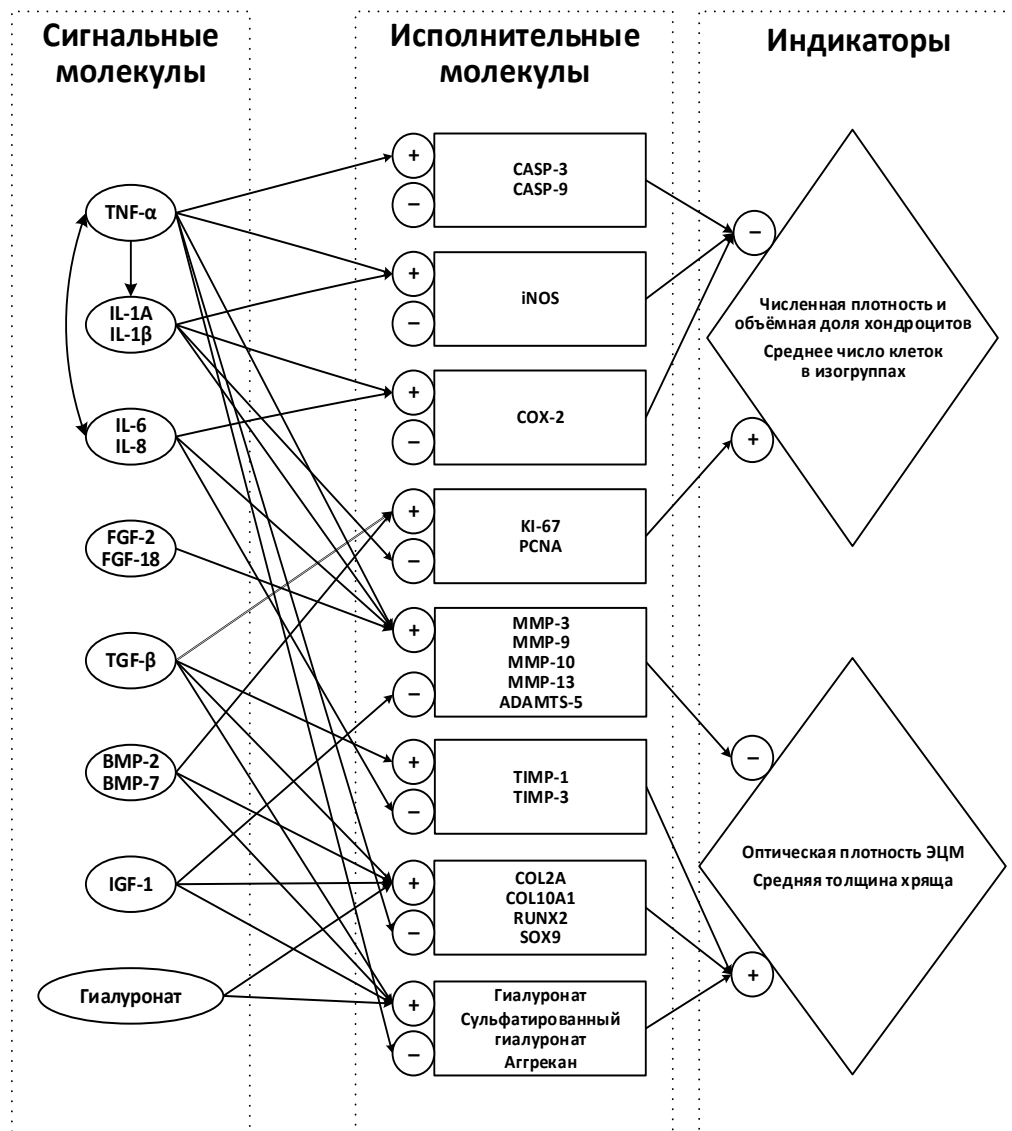


Рисунок 18. Диаграмма соответствия управляющих воздействий, результатов деятельности и индикаторов организационной системы суставного хряща.

Количество индикаторов на рис. 14 было уменьшено до двух – таким образом, получилось всего четыре возможных результата. Поскольку численные значения пока не рассматриваются, целесообразно свести количество входов к числу рассматриваемых биологических процессов, а их как раз четыре.

Описанные выше действия проделаны для демонстрации возможности представления суставного хряща в виде организационной системы и, как следствие, возможности применить существующие механизмы управления к процессу ремоделирования хрящевой ткани. Действительно, объектом управления в данном случае будет являться суставной хрящ, управляемый клетками хрящевой ткани - хондроцитами. Множество допустимых состояний системы определяется численными значениями индикаторов, множество управляющих воздействий – концентрациями сигнальных биомолекул в синовиальной жидкости, а множество допустимых результатов деятельности агентов составляют процессы синтеза, экспрессии и супрессии соответствующих молекул.

4.2 Поиск и обоснование аналогов биомолекул обладающих лубрикативными функциями

На основании разработанной функциональной модели суставного хряща был осуществлен поиск, анализ и оценка аналогов биомолекул с лубрикативными свойствами, способные выступать в роли управляющего фактора (в синовиальной жидкости) на ремоделировании суставного хряща. В результате были найдены гомологи белков двух семейств: *Proteoglycan4* и *Surfactant*. Изоформы семейства белков легочного сурфактанта и протеогликины PRG4 крысы были проверены на гомологичность для использования в качестве структурного модификатора синовиальной жидкости: В результате была обнаружена уникальная белковая последовательность, относящиеся ко всем основным белкам сурфактанта и их предикторам *proteoglycan 4 precursor* (NP_001257574.1). Аналогичные результаты были получены для изоформ белков сурфактанта A/D, представленные в табл. 11.

Таблица 11

Уникальные аминокислотных последовательности ряда белков сурфактанта человека, пригодные для анализа гомологичности

Описание	NCBI RefSeq
Pulmonary surfactant-associated protein A	P08427.3
Pulmonary surfactant-associated protein D	P35248.1
pulmonary surfactant-associated protein D precursor	NP_037010.1
PREDICTED: pulmonary surfactant-associated protein D isoform X1	XP_008769287.1
pulmonary surfactant-associated protein A isoform 1 precursor	NP_001257574.1
pulmonary surfactant-associated protein A isoform 2 precursor	NP_059025.2
pulmonary surfactant-associated protein A isoform 3 precursor	NP_001257576.1

Результатом следующего этапа анализа стало определение уровня гомологичности аминокислотных последовательностей лубрицин/БПЗ и сурфактанта (табл. 12). Полученный уровень гомологичности составил 50% с показателем достоверности e-value равный 6.1

Таблица 12

Результаты поиска гомологов среди белков группы лубрицин/БПЗ и белков сурфактанта

SP	NP_001099432.3
PRG4	
P08427.3	50%* e-value 6.0.
P35248.1	30%* e-value 3.0.
NP_037010.1	30%* e-value 3.0.
XP_008769287.1	30%* e-value 3.0.
NP_001257574.1	50%* e-value 6.1.
NP_059025.2	50%* e-value 6.1.
NP_001257576.1	50%* e-value 6.0.

Для того чтобы определить наиболее качественное (структурное), а значит и функциональное сходство между белками сурфактанта и лубрицином в организме *Rattus*, а также выбрать те из них, которые в максимальной степени подходят в качестве структурного компонента синовиальной жидкости

В результате биоинформационного анализа последовательностей были определены значимые различия в консервативных (то есть закрепленных в процессе эволюции) мотивах выбранных белков (рис. 19).

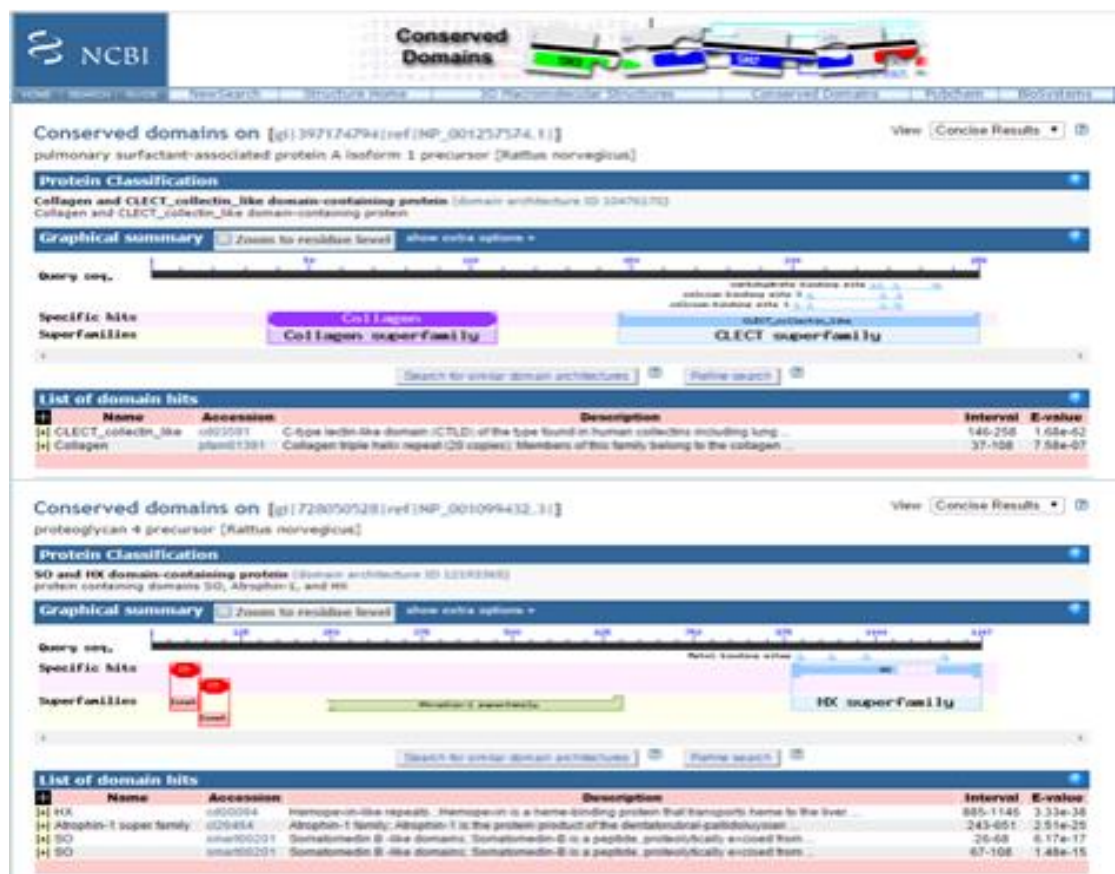


Рисунок 19. Доменная структура Pulmonary surfactant-associated protein A и PRG-4 в организме крысы. Программа NCBI Structure.

В конечном результате белок легочного сурфактанта Pulmonary surfactant-associated protein A является потенциальным модификатором для синовиальной жидкости с сохранение и улучшение лубрикативных свойств.

4.3 Анализ и оценка субстанции, содержащей сурфактантные белки в качестве лубриканта для синовиальной жидкости

Следующим этапом стала оценка *in vitro* лубрикативных свойств субстанции содержащей сурфактантные белки (ССБС). При анализе состава ССБС, по результатам определения, входили липиды (в основном – фосфолипиды), фракции белков массой 16-24 кД (куда входят субъединицы SP-B, SP-C) и массой 32-48 кД (включая SP-D и SP-A), небольшое количество примесных фракций белка, и минеральные соли. Количественные результаты определения состава лиофилизированной ССБС приведены на (табл. 13).

Таблица 13

Химический состав субстанции содержащей сурфактантные белки и коммерческого препарата сурфактант БЛ

Компоненты	Липиды		Белки			Соли
	Нейтральные липиды	Фосфолипиды	16-24 кД	32-58 кД	Другие	
ССБС	5,42	35,65	1,3	0,25	0,43	56,95
Коммерческий сурфактант БЛ	4.86	38.32	1.14	0.16	0.31	55.21

55,21% 4,86% 38,32% 1,14% 0,31% 0,16% ■ NL ■ PL ■ Pt 16-25 kDa ■ Pt 32-48 kDa ■ Pt Others ■ Salt	56,95% 5,42% 35,65% 1,30% 0,43% 0,25% ■ NL ■ PL ■ Pt 16-25 kDa ■ Pt 32-48 kDa ■ Pt Others ■ Salt
Сурфактант БЛ	ССБС

Количественный анализ выделенной ССБС, показал, что полученная смесь содержит больше нейтральных липидов на 10%, но при этом содержание фракции фосфолипидов снижено на 7% по сравнению с коммерческим препаратом Сурфактант ВЛ. Концентрация белков массой 16-24 кД была выше 12,3 % и массой 32-48 кД соответственно на 36% по сравнению с коммерческим препаратом Сурфактант ВЛ, содержание других примесных белков тоже была повышена на 27,9%. Такие различия могут быть связаны с различием в стадиях и качестве отчистки белков. Соли в ССБС и коммерческом препарате Сурфактант ВЛ не представляло значительных различий, и составил всего 3%.

Полученные результаты физических свойств синовиальной жидкости (тест-система) и ССБС (табл. 14, рис. 20), показали, что синовиальная жидкость обладает большей вязкостью, но при этом коэффициент силы трения и поверхностного натяжения меньше на 20-25%. Такие показатели обеспечиваются наличием основных компонентов, за счет которых синовиальная жидкость выполняет свои основные функции при движении суставных поверхностей.

Таблица 14

Физико-химические свойства субстанции содержащей сурфактантные белки, синовиальной жидкости и их смеси

Параметр	ССБС	СЖ	Соотношение ССБС : СЖ			
			1 : 9	1 : 4	1 : 2	1 : 1
Плотность , г/мл	1.01 [0.97÷1.04]	1.04 [1.01÷1.07]	0.96 [0.95÷0.97]	0.99 [0.97÷1,00]	1.02 [1.01÷1.03]	0.98 [0.98÷1.01]
Вязкость, мПа·с * 10 ⁻³	1,9 [1,6÷2,0]	2,5 [2,3÷2,8]	1,8 [1,8÷1,9]	1,4 [1,3÷1,5]	1,3 [1,3÷1,5]	1,2 [1,2÷1,3]
Коэффициент поверхностного натяжения , мН/м	80 [75÷86]	108 [102÷115]	97 [92÷10]	97 [93÷101]	103,9 [96÷108]	92 [82÷98]
Коэффициент трения скольжения, Н/м ²	0,13 [0,05÷0, 37]	0,12 [0,06÷0,24]	0,06 [0,04÷0, 09]	0,06 [0,03÷0, 08]	0,15 [0,08÷0, 26]	0,14 [0,07÷0,23]

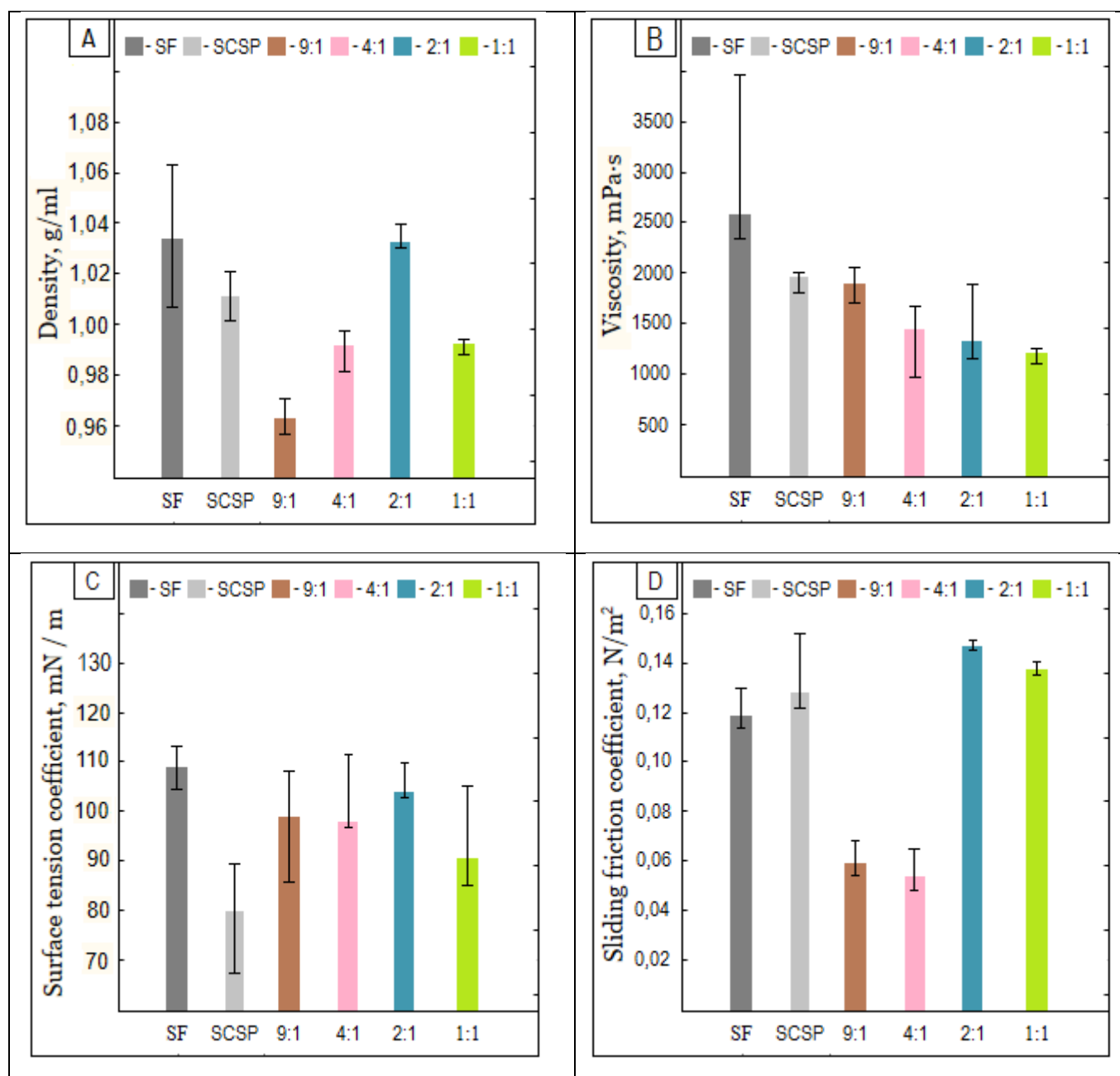


Рисунок 20. Физико-химические свойства ССБС (SCSP), и их смеси с синовиальной жидкостью (SF). А. плотность (density), г/мл. В. вязкость (viscosity), мПа·с. С. Коэффициент поверхностного натяжения (surface tension coefficient), мН/м. D. Коэффициент трения скольжения (sliding friction coefficient), Н/м².

Смешение ССБС и синовиальной жидкости в различных соотношениях показало, что в различных концентрациях тех или иных компонентов значительно изменяют свойства биологической жидкости. Наилучший результат был, достигнут при смешении 1:4. Показатель вязкости снизился на 45% по сравнению с синовиальной жидкостью, на такой результат может влиять оптимальное разведение ССБС синовиальной жидкости. Коэффициент поверхностного

натяжения снижался по мере добавления ССБС к синовиальной жидкости, данное снижение связано с наличием в составе ССБС белки сурфактанта SP-B и SP-C, максимальное снижение было зафиксировано, при соотношении 1:2. Обратная ситуация наблюдалась при соотношении 1:1 когда, коэффициент поверхностного натяжения вырос на 33% по сравнению с соотношением 1:2, на такой результат могло повлиять высокая концентрация фосфолипидов (табл. 14, рис. 20).

Коэффициент трения скольжения при добавлении ССБС к синовиальной жидкости уменьшался при соотношении 1:9 и 1:4, и начинал повышаться при 1:2 и 1:1, предположительно на коэффициент трения могут оказывать повышающаяся концентрация фосфолипидов, так как происходит прилипание скользящих поверхностей и их движение становится возможным только при увеличении силы, оказываемой на груз.

По полученным данным биоинформационного поиска и оценке физико-химических свойств ССБС *in vitro*, можно сказать, что ее можно использовать как аналог природного лубриканта для синовиальной жидкости.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ СУБСТАНЦИИ СОДЕРЖАЩЕЙ СУРФАКТАНТНЫЕ БЕЛКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОАРТРОЗЕ

5.1 Морфология суставного хряща при экспериментальном остеоартрозе в условиях повышения лубрикативных свойств синовиальной жидкости

На полученных гистологических препаратах суставного хряща в окраске сафранином О, можно было рассмотреть и провести условное разделение на нагружаемые и не нагружаемые участки. При окраске сафранином О, наблюдалось значительное увеличение концентрации компонентов хрящевого матрикса в промежуточной зоне, по сравнению с поверхностной и глубокой зоной в области остеохондральной костной пластинки. Окраска гематоксилином и эозином позволила зафиксировать форму и численную плотность клеток на протяжении всего суставного хряща нагружаемых и не нагружаемых областей каждой зоны. Как показано на изображении гистологического препарата суставного хряща коленного сустава крысы контрольной группы (экспериментальный ОА на 3 неделе) наблюдалось сильное изменение (нарушение) рельефа суставной поверхности, и частично разрушение поверхностной зоны, хорошо визуализировались поверхностная, промежуточная и глубокая зоны для дальнейшего морфометрического анализа. Численная плотность хондроцитов в поверхностной зоне была снижена, фиксировались единичные клетки, в промежуточной зоне, а в изогенных группах хондроцитов было по 5-8 клеток. Изогенные группы хондроцитов можно характеризовать как патологические (образование кластеров) (Рис.21).

На 6 и 12 неделе эксперимента после введения ССБС, было зафиксировано частичное сохранение гладкого рельефа суставной поверхности и поверхностной зоны. Оптическая плотность хрящевого матрикса была несколько снижена по

сравнению с контрольной группой, к 6 неделе за счет сохранения поверхностной зоны сохранялся показатель численной плотности поверхностной зоны, в промежуточной зоне изогенные группы хондроцитов включали в себя по 3-6 клеток с отсутствием признаков пикноза ядер хондроцитов (рис. 21, 22, 23).

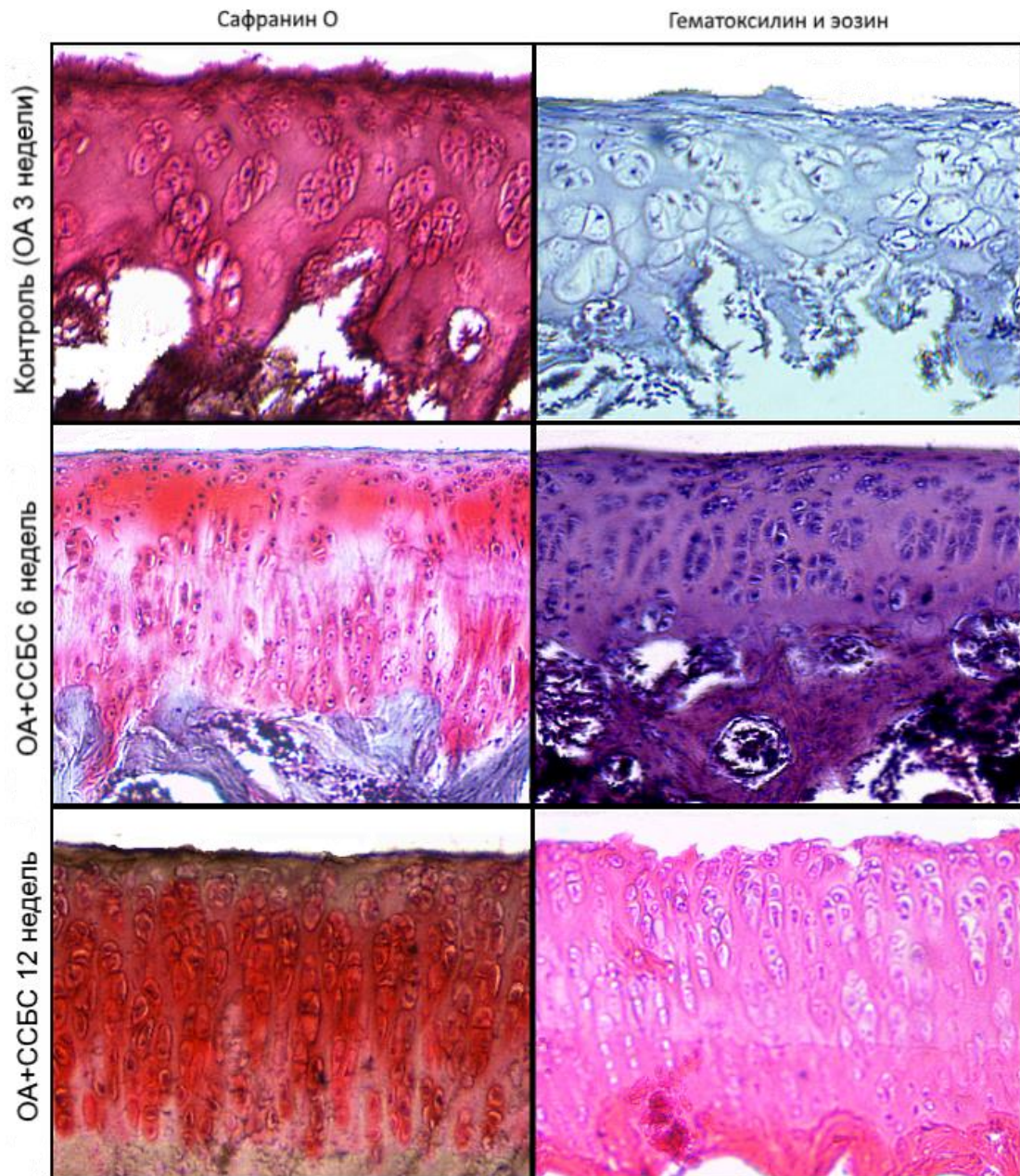


Рисунок. 21. Суставной хрящ коленного сустава крысы: Контрольная группа – суставной хрящ при экспериментальном ОА на 3 неделе, стирание суставной поверхности и повреждение поверхностной зоны; суставной хрящ после внутрисуставного введения ССБС через 6 недель, сохраняется гладкий рельеф суставной поверхности, а также структура поверхностной зоны; суставной хрящ после внутрисуставного введения ССБС через 12 недель незначительные повреждения суставной поверхности и поверхностной зоны. Окраска Сафранином О, Гематоксилином и эозином. Увеличение x240.

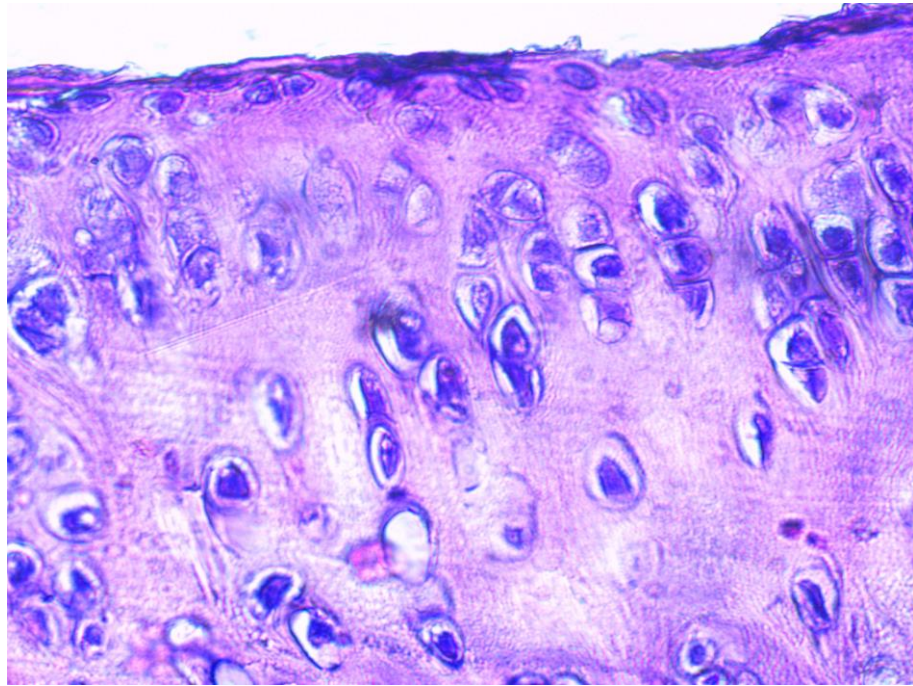


Рисунок 22 Суставной хрящ коленного сустава крысы после внутрисуставного введения ССБС через 3 недели после моделирования экспериментального остеоартроза Окраска гематоксилином и эозином (x560)

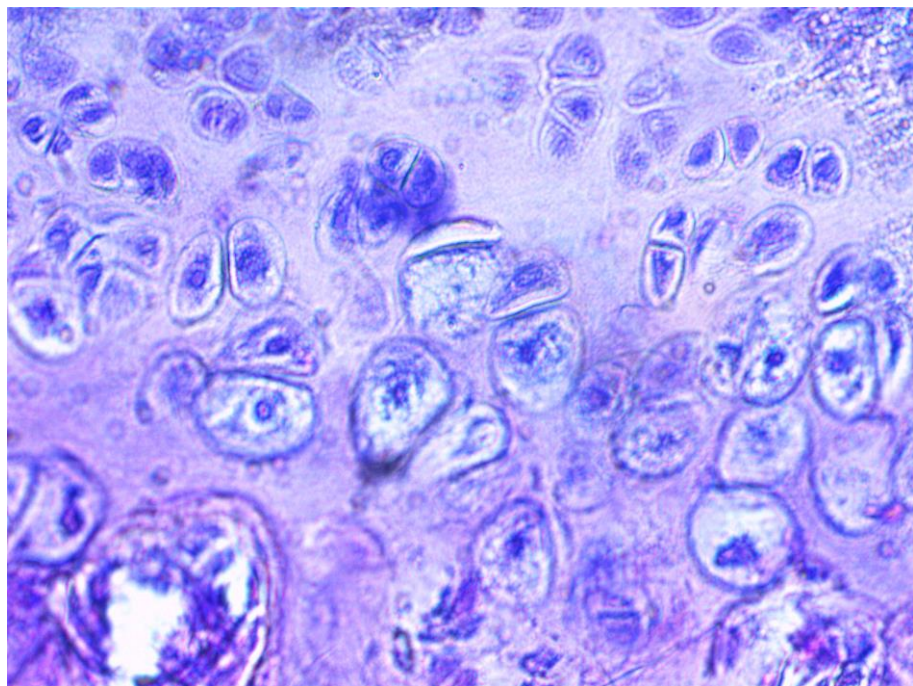


Рисунок 23 Суставной хрящ коленного сустава крысы после внутрисуставного введения ССБС через 3 недели после моделирования экспериментального остеоартроза Окраска гематоксилином и эозином (x560)

Величина рельефа суставной поверхности варьировала от 1,01 до 1,02 усл. ед. после введения ССБС, максимального значение наблюдалось в контрольной группе с экспериментальным ОА на 3 неделе. Радиальная толщина хряща имела

минимальное значение в контрольной группе и составляло 104 мкм, после внутрисуставного введения ССБС, показатель вырос в 1.5 раза на 6 и 12 неделе, по сравнению с величиной в контрольной группе ($p < 0,01$)

Таблица 15

Морфофункциональные изменения суставного хряща в условиях модификации синовиальной жидкости смесью белков сурфактанта

Показатель	Контроль (ОА 3 недели)	Сроки эксперимента (введение ССБС)	
		6 недель	12 недель
Рельеф суставной поверхности	1,04 [0,81÷1,48]	1,01 [0,97÷1,10]	1,02 [0,90÷1,07]
Радиальная толщина хряща, мкм	104*# [84÷120]	164* [110÷204]	153* [130÷212]
Оптическая плотность хрящевого матрикса, усл. ед.	1,68 [1,63÷1,72]	1,51 [1,44÷1,55]	1,50 [1,43÷1,53]
Численная плотность хондроцитов в поверхностной зоне, 1/мм ³	456*# [337 ÷ 596]	446* [417 ÷ 516]	447* [377 ÷ 526]
Индекс синтетической активности MMP-9, %	0,44# [0,38÷0,64]	0,19*# [0,15÷0,31]	0,21* [0,19÷0,29]
Индекс синтетической активности TIMP-1, %	1,81# [1,53÷2,72]	1,01*# [0,43÷1,55]	1,39*# [1,28÷1,75]

Оптическая плотность матрикса в поверхностной и промежуточной зон хряща в контрольной группе составила в среднем 1.68 усл. ед., после введения ССБС показатель имел тенденцию к снижению по мере нарастания сроков эксперимента. В контрольной группе и на 6-й и 12-й неделе численная плотность клеток в поверхностной зоне не изменилась.

В результате введения ССБС индекс экспрессии MMP-9 снижался по сравнению со значением в контрольной группе (ОА 3 недели) к 6 неделе в 2 раза

($p < 0,01$), и оставался на том же уровне на 12 неделе. В тоже время показатель индекса экспрессии TIMP-1 был меньше величины в контрольной группе на всех сроках эксперимента и достигал минимального значения к 6-й неделе, но повторно повышался к 12 неделе, но незначительно (табл. 15).

Введение ССБС сопровождалось относительным приростом индекса экспрессии MMP-9 к 6-й неделе в 3,0 раза, к 12-й неделе – в 9,5 раза ($p < 0,01$). Индекс экспрессии TIMP-1 оказывался на 6-й неделе ниже значения в 1-й группе в 2,0 раза, а в последующем оказывался достоверно выше аналогичного значения, но ниже, чем величина показателя в контрольной группе (табл. 15, рис 24, 25, 26, 27).

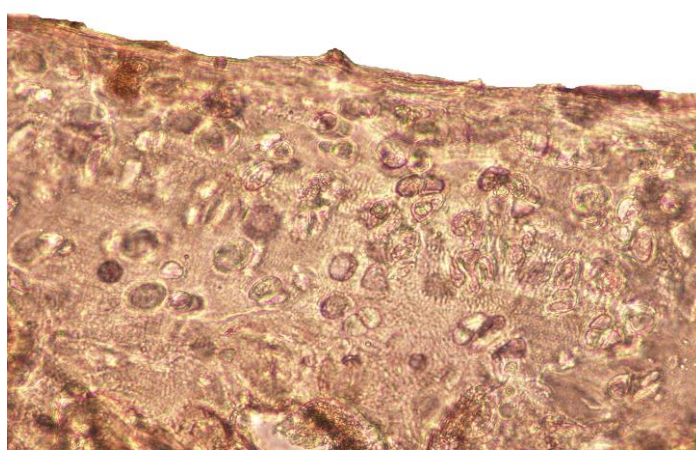


Рисунок 24. Экспрессия ММП-9 (AV33090) в суставном хряще коленного сустава крысы через 6 недель после введения ССБС после моделирования экспериментального остеоартроза (3+3) (x560)

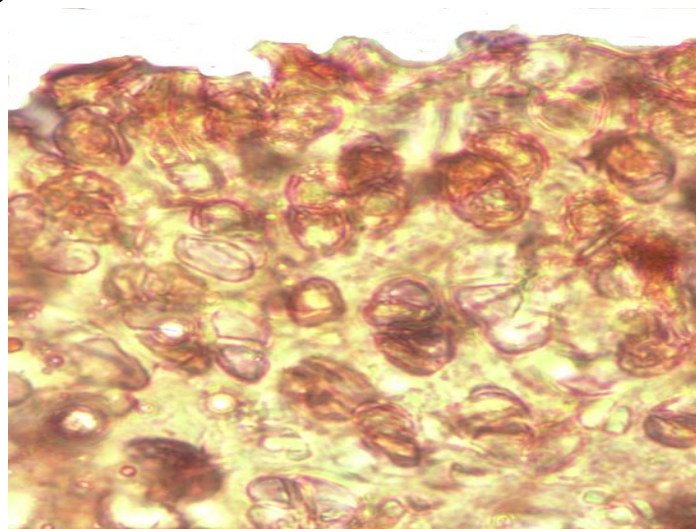


Рисунок 25. Экспрессия ММП-9 (AV33090) в суставном хряще коленного сустава крысы через 12 недель после введения ССБС после моделирования экспериментального остеоартроза (3+9) (x560)

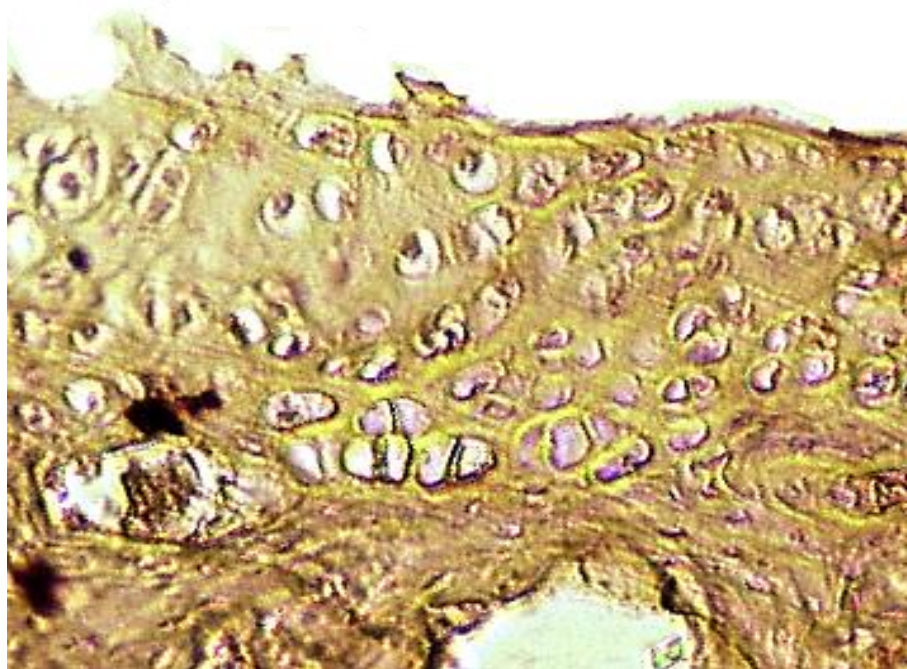


Рисунок 26. Экспрессия ТИМП-1 (SAB4502971) в суставном хряще коленного сустава крысы через 6 недель после введения ССБС после моделирования экспериментального остеоартроза (3+3) (x260)

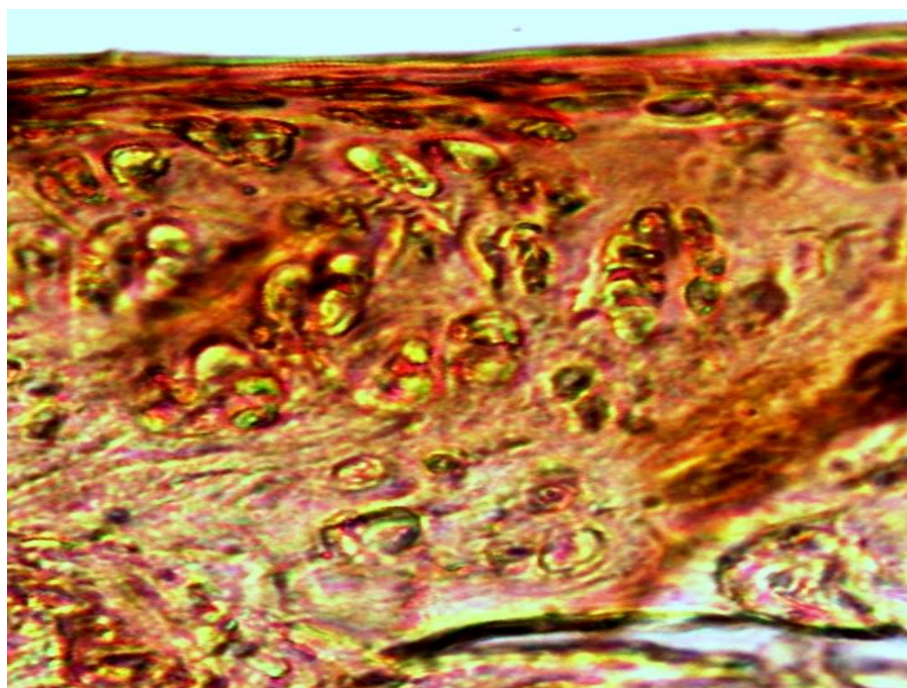


Рисунок 27. Экспрессия ТИМП-1 (SAB4502971) в суставном хряще коленного сустава крысы через 12 недель после введения ССБС после моделирования экспериментального остеоартроза (3+9) (x400)

Проведенные нами эксперименты по влиянию ССБС на суставной хрящ путем внутрисуставного введения показали следующие результаты.

В первой экспериментальной группе показатели рельефа суставной поверхности варьировала от 1,02 до 1,13 усл. ед., максимального значение наблюдалось на 6 неделе эксперимента (рис. 28А). Радиальная толщина хряща уменьшалась в течение всего эксперимента, и имела минимальное значение на 3-й неделе, по сравнению с величиной в контрольной группе, к 6-й и 12-й неделе показатели выросли в 1,1 раза и 1,13 раза, соответственно ($p < 0,01$), по сравнению со значениями на 3-й неделе эксперимента (рис. 28Б).

Оптическая плотность матрикса в поверхностной и промежуточной зон хряща составила в среднем 1.66 усл. ед. у интактных животных и имела тенденцию к снижению по мере нарастания сроков эксперимента (рис. 28В). На 6-й и 12-й неделе численная плотность клеток в поверхностной зоне значительно снижалась, в 2,5 раза и 3,5 раза, соответственно ($p < 0,01$), по сравнению с величиной показателя в контрольной группе (рис. 28Г).

По мере развития ОА индекс экспрессии MMP-9 оказывался больше, превышая значения в контрольной группе к 3-й неделе в 1,5 раза, к 12 неделе – в 5 раз ($p < 0,01$). В тоже время показатель индекса экспрессии TIMP-1 был меньше величины в контрольной группе на всех сроках эксперимента и достигал минимального значения к 12-й неделе (рис. 28Е, 28Д).

В экспериментальной группе, на фоне введения ССБС, величина рельеф поверхности оказывалась на 6-й и 12-й недели в 1,5 раза меньше, чем соответствующие значения в 1-й экспериментальной группе (рис. 28А). В противовес этому, радиальная толщина хряща оказывалась на этих сроках в 1,5 раза выше, по сравнению с величинами показателя в 1-й экспериментальной группой (рис. 28Б). Изменение показателя оптической плотности хрящевого матрикса было незначительно (рис. 28В).

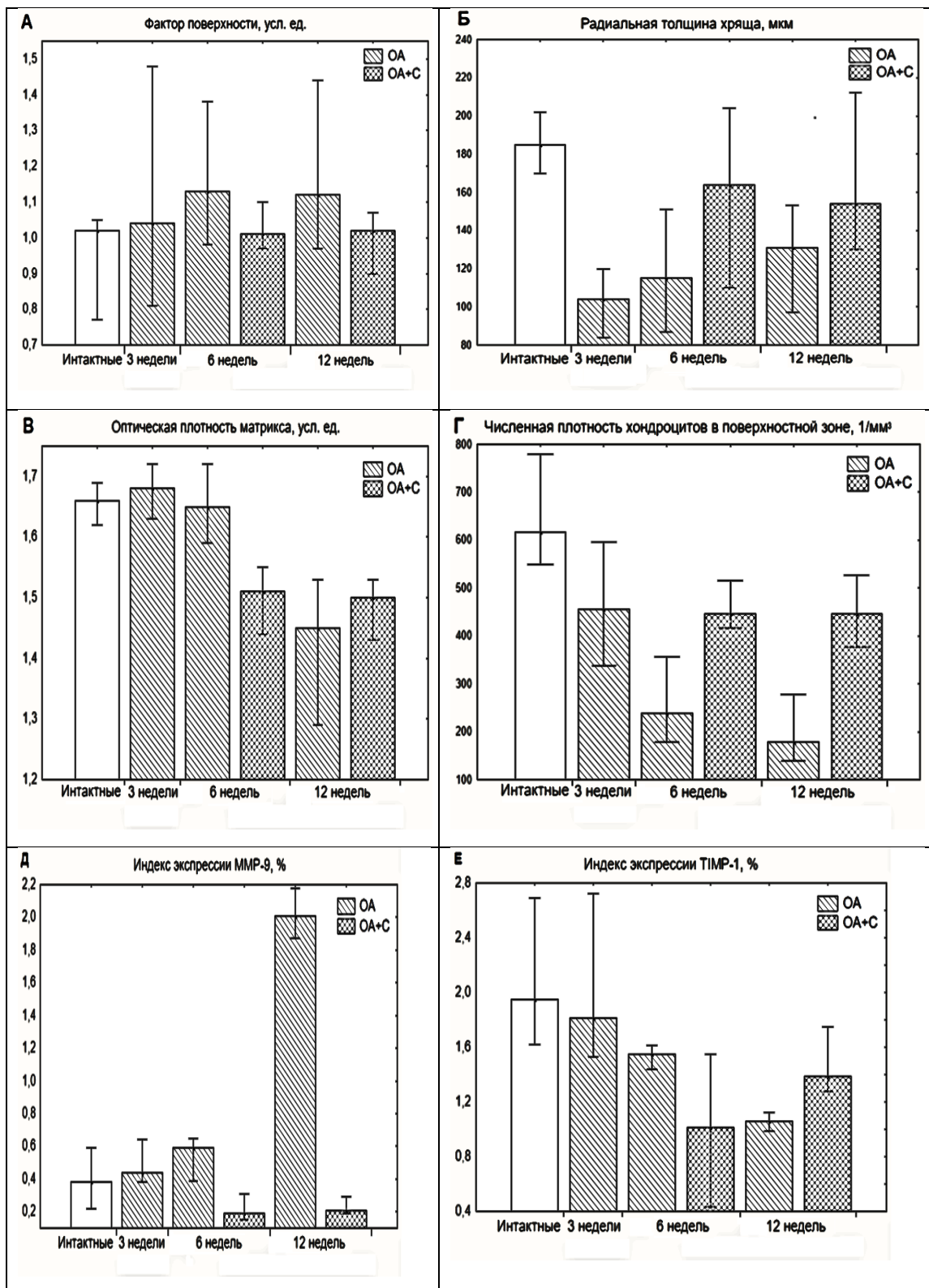


Рисунок 28. Морфологические и иммуногистохимические показатели суставного хряща у интактных животных а также при ОА и введения сурфактант-ассоциированных белков ОА+С: А – рельеф поверхности, Б – радиальная толщина хряща, В – Оптическая плотность матрикса, Г – численная плотность хондроцитов поверхностной зоны суставного хряща, Д – индекс экспрессии MMP-9 и Е – индекс экспрессии TIMP-1

На 6-й неделе и последующих сроках эксперимента было зафиксировано относительно более плотное расположение хондроцитов в поверхностной зоне и несколько более разреженное – в промежуточной зоне суставного хряща (рис. 28Г). Численная плотность хондроцитов на 6-й и 12-й неделях была выше в 1,87 и 2,5 раза во 2-й группе, в сравнении с первой ($p < 0,01$) (рис. 28А).

Введение сурфактант-ассоциированных белков сопровождалось относительным приростом индекса экспрессии ММР-9 к 6-й неделе в 3,0 раза, к 12-й неделе – в 9,5 раза ($p < 0,01$) (рис. 28Д). Индекс экспрессии ТИМР-1 оказывался на 6-й неделе ниже значения в 1-й группе в 2,0 раза, а в последующем оказывался достоверно выше аналогичного значения, но ниже, чем величина показателя в контрольной группе (рис. 28Е).

Таким образом, наблюдалось улучшение морфологических показателей суставного хряща суставного хряща после введения ССБС. Смещение в сторону анаболических процессов (повышение экспрессии ТИМП) позволило зафиксировать остановку разрушения хрящевого матрикса, что может свидетельствовать о запуске физиологической регенерации хрящевой ткани.

5.2 Морфофункциональная характеристика суставного хряща с помощью 3D-реконструкций при экспериментальном остеоартрозе в условиях повышения лубрикативных свойств синовиальной жидкости.

В результате анализа серийных изображений суставного хряща коленного сустава сохранялся натуральный цвет и форма всех тканевых структур. Разрешающая способность была достаточна для морфометрической и цветовой оценки суставного хряща (рис. 29).

Анализ 3D-реконструкций позволил провести оценку морфометрических показателей: толщина суставного хряща, рельеф суставной поверхности и среднюю яркость хрящевой ткани. Полученные результаты показали, что улучшение физико-химических свойств СЖ повлияло на лубрикативные свойства и это привело подавлению дегенеративного эффекта на суставную поверхность и суставной хрящ по сравнению с первой экспериментальной группой (3 глава): показатель радиальной толщины хряща увеличился на 5% к 6 неделе эксперимента в сравнении с показателем на 6 неделе при экспериментальном ОА (табл. 16 рис 29).

Таблица 16

Морфометрические показатели суставного хряща у интактных животных и после внутрисуставного введения ССБС при экспериментальном остеоартрозе

Показатель	Интактные животные	Сроки эксперимента	
		6 недель	12 недель
		Введение ССБС	
Рельеф суставной поверхности	1.00 [0.94 ÷ 1.01]	1,02 [0,97 ÷ 1,06]	1,06 [1,01 ÷ 1,14]
Радиальная толщина хряща, мкм.	232 [193 ÷ 270]	178 [160 ÷ 194]	172*# [115 ÷ 201]
Средняя яркость хрящевой ткани, усл. ед.	157 [151 ÷ 165]	106*# [99 ÷ 113]	57*# [56 ÷ 60]

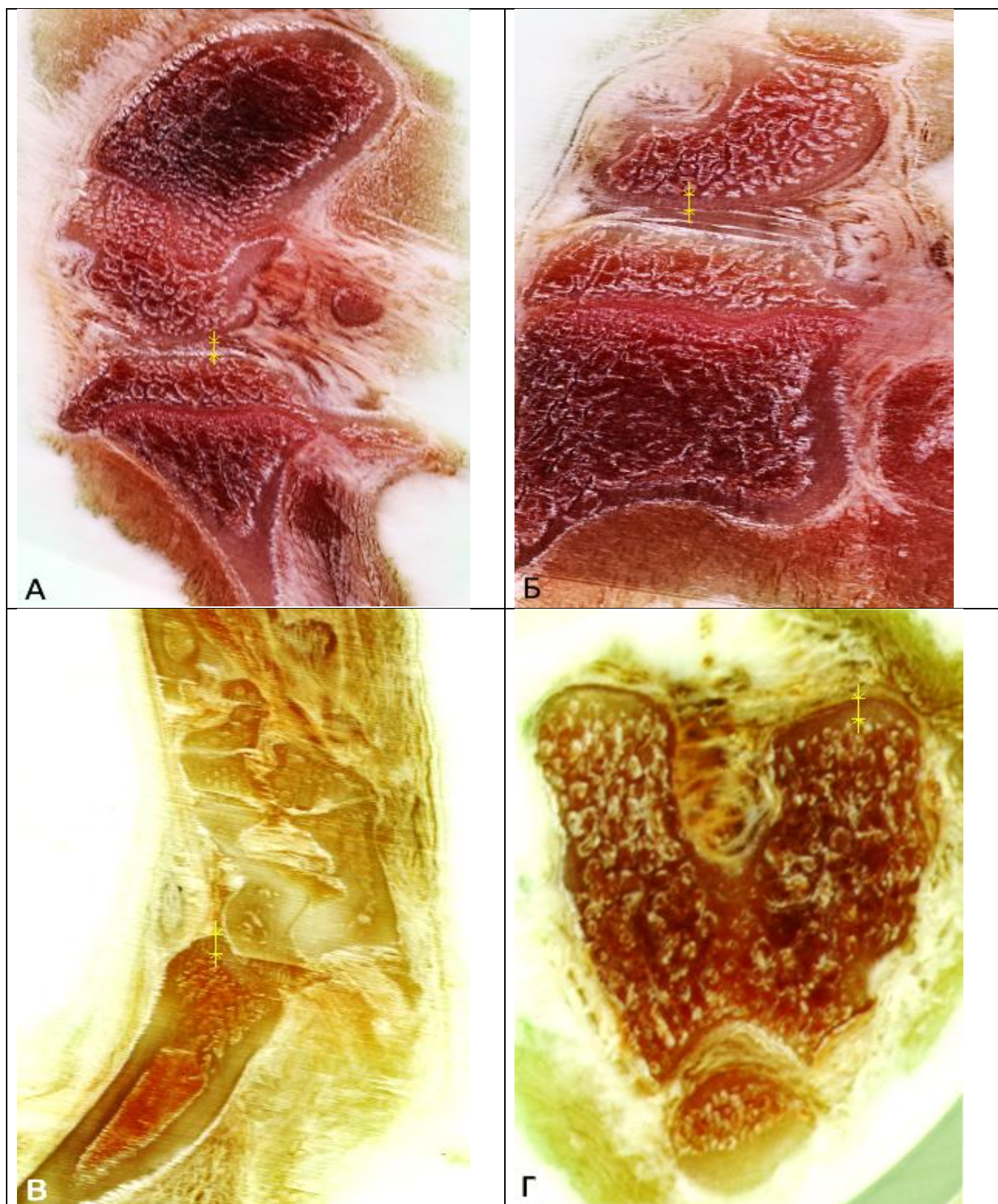


Рисунок 29. Трехмерная реконструкция коленного сустава крысы: А – срез в сагиттальной плоскости и Б – срез в фронтальной плоскости у животных с внутрисуставным введением ССБС при экспериментальном ОА через 6 недель, В – срез в сагиттальной плоскости и Г – срез в фронтальной плоскости у животных с внутрисуставным введением ССБС при экспериментальном ОА через 12 недель. Сечение для получения RGB-профиля проведено в направлении от суставной поверхности к глубокой зоне большеберцовой кости. Увеличение $\times 10$

На 12 неделе эксперимента различия в показателе радиальной толщины хряща уже составляли 6,7 % в сравнении на том же временном промежутке в первой экспериментальной группе.

Показатель рельефа суставной поверхности у интактных животных незначительно повышался по сравнению величиной на 6-й неделе и на 12 неделе после внутрисуставного введения ССБС показатель снизился почти в 2 раза в сравнении с первой экспериментальной группой. Средняя яркость хрящевой ткани повысилась на 6 неделе эксперимента почти в 2 раза по сравнению с тем же показателем на 6 неделе экспериментального ОА. К 12 неделе эксперимента после введение ССБС средняя яркость хрящевого матрикса снизилась и осталась на том же уровне что и при экспериментальном ОА (рис. 30).

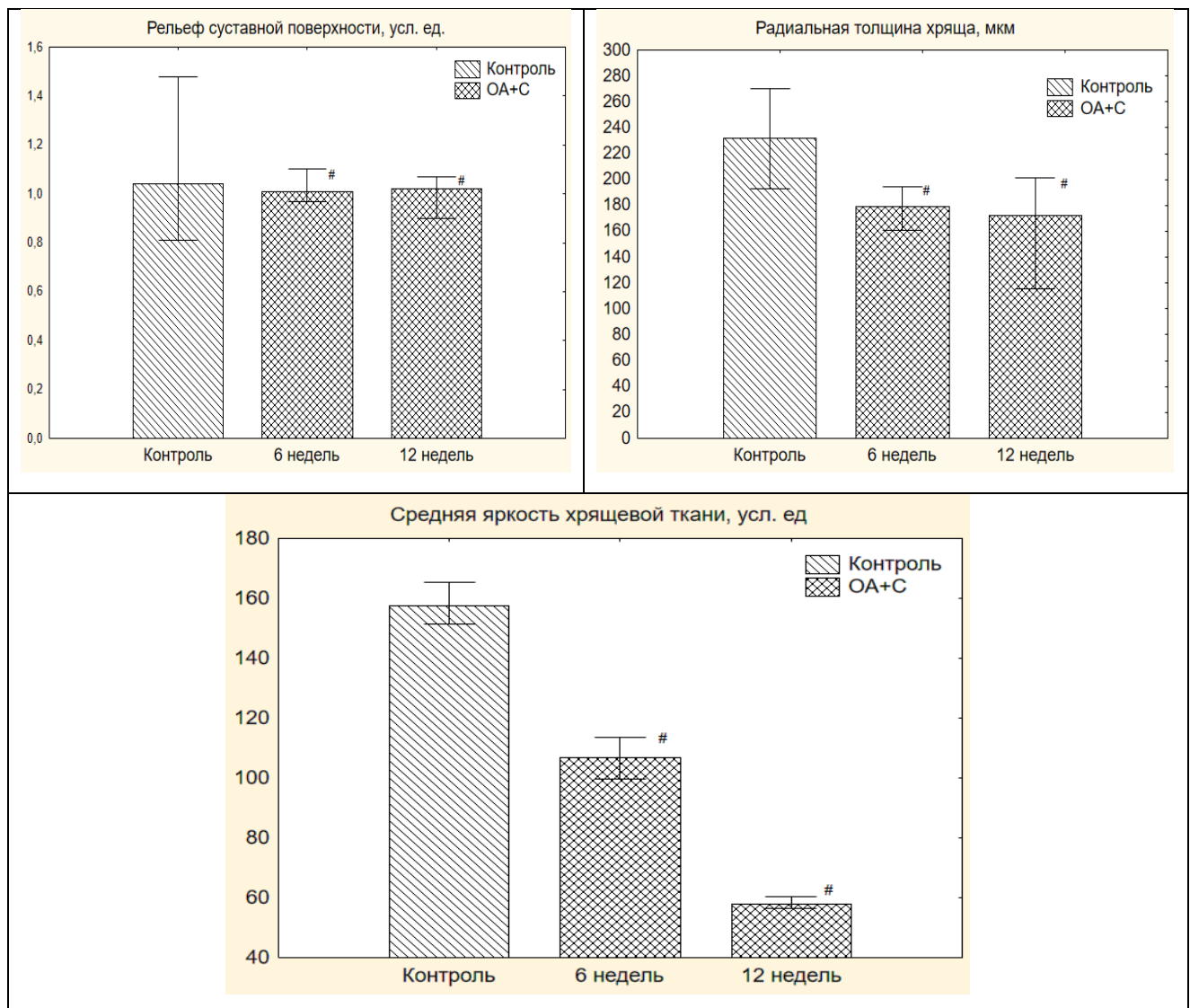


Рисунок 30. Изменение морфометрических показателей при анализе 3D-реконструкций суставного хряща.

В результате полученные и проанализированные RGB-профили суставного хряща коленного сустава крысы представлены на (рис. 31).

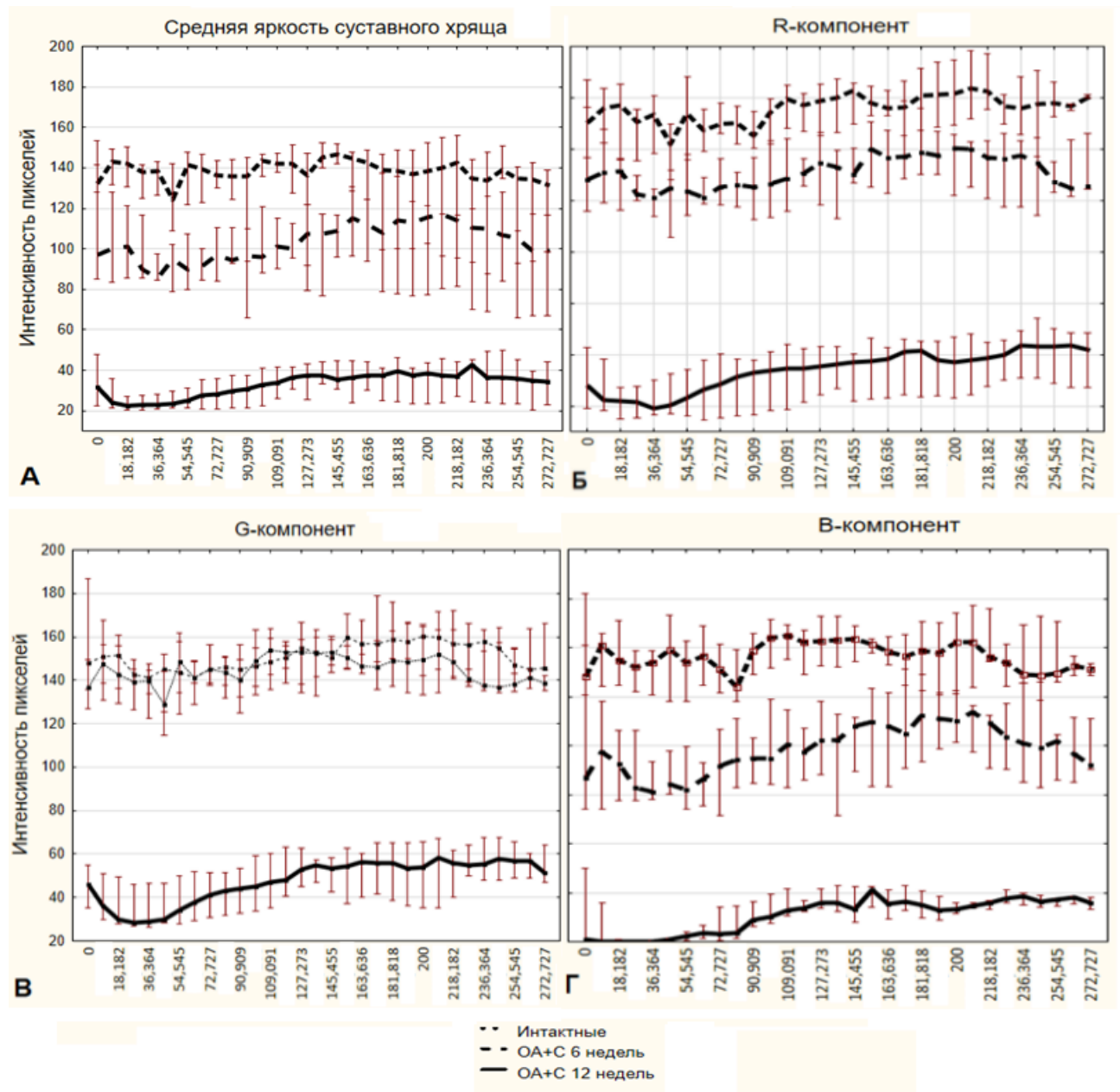


Рисунок 31. RGB-профили: А-Общий профиль средней яркости суставного хряща, Б- профиль R-компонента суставного хряща, В- G-компонента суставного хряща, Г- В-компонента суставного хряща после внутрисуставного введения ССБС, Сечение для получения RGB-профиля проведено в направлении от суставной поверхности к глубокой зоне большеберцовой кости

При анализе RGB-профилей, видно, что цветовой компонент суставного хряща усиливается по направлению от суставной поверхности к глубокой зоне, как у интактных животных, так и после введения ССБС. RGB-профиль также позволяет с большим трудом идентифицировать зоны суставного хряща: переход

поверхностной зоны в промежуточную и переход из промежуточной в глубокую зону. Также на полученных профилях видно, что интенсивность пикселей R, G и B-каналов максимальна в суставном хряще у интактных животных, у животных после введения ССБС на фоне экспериментального ОА интенсивность ниже в 1.5-2 раза на R-компоненте, а на G-компоненте почти одинаковый на 6 неделе, это может быть связано со снижением концентрации структурных компонентов хрящевого матрикса. На В-компонент приходятся минимальные значения, и в некоторых случаях равны 0 (зона суставной поверхности). Было зафиксировано, что самая высокая интенсивность RGB-профиля у интактных животных, но это связано с качеством и яркости исходных изображений, по сравнению с экспериментальными группами. На RGB-профиле экспериментальных групп зафиксировано, что к 6-й неделе интенсивность возрастает в поверхностной зоне, а G и B-компоненты возрастают в промежуточной и глубокой зонах. Важным отличием является то, что после внутрисуставного введения ССБС на фоне экспериментального ОА, интенсивность пикселей В-компонента очень сильно снизилась по сравнению с другими цветовыми компонентами. Также на RGB-профилях видно, что к 12-й неделе средняя яркость снижается, что говорит о снижении концентрации структурных компонентов хрящевого матрикса. Полученные результаты позволили дать оценку морфометрических и цветовых параметров суставного хряща коленного сустава крысы при внутрисуставном введении ССБС и модификации физико-химических свойств СЖ на фоне экспериментального ОА, с помощью 3D-реконструкции.

На 3D-реконструкциях во всех экспериментальных группах были зафиксированы изменения ключевых параметров суставного хряща.

В первой экспериментальной группе показатели рельефа суставной поверхности варьировала от 1,00 до 1,10 усл. ед., максимального значения наблюдалось на 12 неделе эксперимента (рис. 32А). Радиальная толщина хряща уменьшалась в течение всего эксперимента, и имела минимальное значение на 12-й неделе, по сравнению с величиной в у интактных животных, к 6-й и 12-й неделе

показатели снизились в 1,36 раза и 1,44 раза, соответственно ($p < 0,01$), по сравнению со значениями на интактными животными (рис. 32Б).

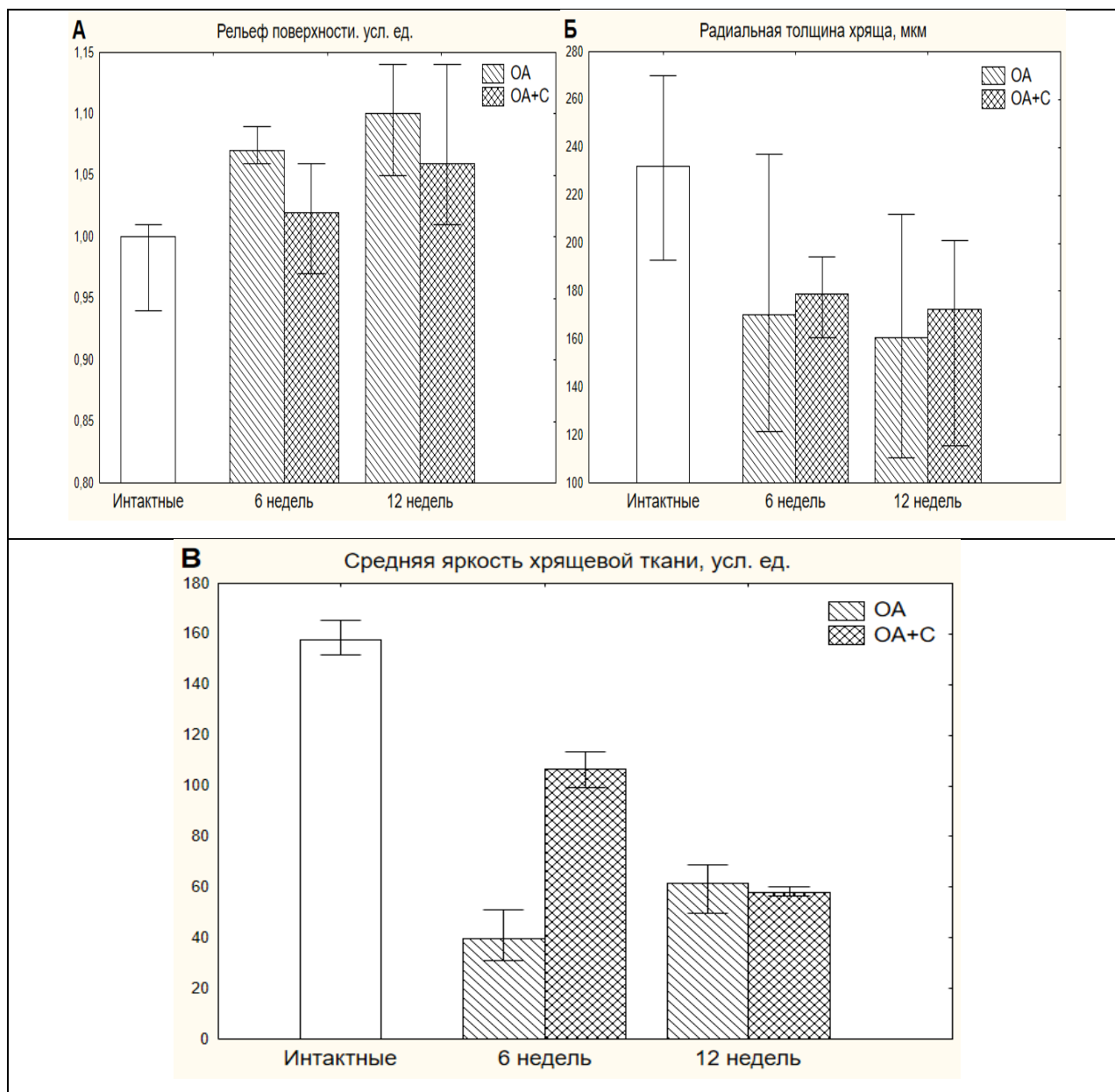


Рисунок 32. Морфологические и иммуногистохимические показатели суставного хряща у интактных животных а также при ОА и введения сурфактант-ассоциированных белков ОА+С: А – рельеф поверхности, Б – радиальная толщина хряща, В – средняя яркость хрящевой ткани.

Средняя яркость хрящевого матрикса составила в среднем 157.51 усл. ед. у интактных животных и имела тенденцию к снижению по мере нарастания сроков эксперимента (рис. 32В). На 6-й и 12-й неделе показатели сократились почти в 4 раза, а на 12 неделе показатель начал возрастать в 1.5 раза по сравнению с 6 неделя ($p < 0,01$), а в сравнении с интактной группой в 2.55 раза.

Во 2-й экспериментальной группе, на фоне введения ССБС, на 6-й и 12-й неделе наблюдалась тенденция к снижению величины рельефа суставной поверхности и составила в 1,5 раза, чем соответствующие значения в 1-й экспериментальной группе (рис. 32А). В противовес этому, радиальная толщина хряща на этих сроках почти не изменилось, по сравнению с величинами показателя в 1-й экспериментальной группой (рис. 32Б).

Изменение показателя средней яркости хрящевой ткани было значительно на 6 неделе эксперимента, который увеличился в 2.5 раза по сравнению с тем же показателем на 6 неделе в экспериментальной группе (рис. 32В). На 12 неделе значительных изменений зафиксировано не было.

Таким образом, после введения ССБС при экспериментальном ОА, почти все показатели стали возрастать (радиальная толщина хряща, средняя яркость хрящевой ткани, численная плотность хрящевой ткани, так же снизилась интенсивность пикноза ядер хондроцитов), часть показателей стали снижаться (показатель рельефа суставной поверхности, снижение экспрессии ММП-9) что свидетельствует о частичном восстановлении суставного хряща после моделирования экспериментального остеоартроза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные позволяют считать, что в суставном хряще в результате его естественной дифференцировки закладываются участки (микрокластеры), характеризующиеся более интенсивными процессами образования хрящевого матрикса. Их совокупность представляет собой своего рода объемный каркас внутри «гомогенного» суставного хряща. Мозаичное расположение и особенности трехмерного строения таких кластеров являются основой для понимания векторов сил, действующих в хряще при перераспределении статических и динамических нагрузок в процессе функционирования крупных суставов. Детальное изучение выявленного феномена предполагает раскрытие молекулярных особенностей хондроцитов и матрикса в составе микрокластеров, механизмов их возникновения, динамического регулирования и изменений при наиболее распространенных дегенеративных процессах в суставах. То есть можно сказать, что суставной хрящ коленного сустава крысы имеет на светооптическом уровне характерную неоднородность строения, заключающуюся в наличии мозаично расположенных участков (микрокластеров), отличающихся от окружения относительно более высокой плотностью расположения хондроцитов, структурой и оптической плотностью хрящевого матрикса. Микрокластеры занимают в нагружаемых областях до 40% объема суставного хряща, и могут быть описаны как полигональные усеченные пирамиды с поперечником сечения вблизи остеохондральной линии порядка 60-100 мкм и расширяющиеся к наружной зоне хряща до 100-150 мкм в поперечнике. Наличие микрокластеров следует учитывать при расчете векторов сил, опосредующих статические и динамические нагрузки на суставную поверхность, изучении механизмов динамического ремоделирования хряща и его изменений в процессе развития дегенеративных процессов в суставном хряще коленного сустава.

Полученные данные указывают в естественных условиях формируются участки с более высокой функциональной активностью в отношении синтеза

хрящевого матрикса. Как следствие, такие участки должны характеризоваться большей механической прочностью и высоким модулем упругости при механических нагрузках. Поскольку формирование и ремоделирование хряща происходят путем динамического изменения хондрального фенотипа, молекулярно-генетические механизмы, ответственные за варьирование фенотипа хондроцитов, безусловно, включаются в ответ на восприятие нагрузок в процессе механо- и хеморецепции непосредственно в самом хряще [98]. Фенотип хондроцитов, различающийся как между отдельными зонами хряща, так и, по результатам наших исследований, внутри неоднородных участков и между ними, происходит путем постоянной регуляции сигнальными молекулами и в ответ на механическую стимуляцию хондроцитов. Как итог, достигается равновесие катаболических и анаболических процессов в хрящевом матриксе [32, 67, 95]. Трехмерное строение неоднородных участков может быть использовано, как прототип для биомиметического моделирования хрящевого матрикса при создании скаффолдов в тканевой инженерии хряща, где в последнее время основное внимание уделяется именно трехмерной реконструкции строения и свойств хрящевого матрикса [29, 50, 79, 95].

Изучение выявленного феномена при экспериментальном ОА вызванным в результате ППКС. Развитие экспериментального ОА сопровождается изменениями неоднородных участков в организации хряща. В поверхностной и промежуточных зонах, он становится более однородным и менее плотным, Происходит нарушение синтеза лубрицина хондроцитами к поздним срокам эксперимента в поверхностной зоне, что может свидетельствовать о нарушении работы лубрикации суставной поверхности. В промежуточной зоне снижается экспрессия протеогликанов (аггрекана) (повышается на 3 неделе эксперимента и резко снижается на 6 и 12 неделе) в глубокой зоне формируются более крупные кластеры с характерной гиперцеллюлярностью и снижается плотность хрящевого матрикса, нарушаются структурные соотношения с подлежащей костью, появляются единичные остеофиты. Характер выявленных неоднородных участков в структуре суставного хряща в норме, так и при экспериментальном ОА нужно

учитывать при дальнейшем изучении механизмов ремоделирования суставного хряща в различных состояниях. А также как принцип создания тканеинженерных конструкций, учитывающий феномен неоднородности строения хрящевого матрикса и суставного хряща.

Полученные данные после введения медицинского талька указывают, прежде всего, на закономерный результат повреждения суставного хряща вследствие снижения лубрикативных свойств синовиальной жидкости, вызванных введением медицинского талька. В результате наблюдалось истончение и даже частичное разрушение поверхностной зоны суставного хряща, а также снижение численной плотности хондроцитов. Мы также подтвердили, что нарушение баланса между молекулами осуществляющих хондропротективную (TIMP-1) и резорбционную функции (MMP-9), помимо механического фактора, играет существенную роль в разрушении хрящевого матрикса при экспериментальном ОА [85]. Важно, что если моделирование ОА вызывает характерное изменение баланса этих соединений (возрастание экспрессии MMP-9 и супрессия TIMP-1), то использование сурфактант-ассоциированных белков сопровождается коррекцией этого дисбаланса и восстановлением высокой экспрессии TIMP.

Результаты используемых моделей соответствовали полученным результатам и были явные различия между повреждениями суставного хряща при перерезке передней крестообразной связки и введением медицинского талька в суставную полость. Как и предполагалось, происходило закономерное разрушение суставной поверхности, максимальное разрушение было зафиксировано на 12 неделе после ППКС, это соответствовало нашим предположениям, так как при ППКС происходило значительное смещение с нагружаемых областей суставного хряща на ненагружаемые, что показало большое значение рельефа поверхности. При этом мы фиксировали, что радиальная толщина хряща была значительно выше (в 1.5 раза) на 12 неделе (Рисунок 22Б), чем в модели введения талька. Это закономерно, так как при смещении в суставе ненагружаемые области получают большее повреждение, чем нагружаемые (становясь менее нагружаемыми), а при введении талька происходило

равномерное интенсивное стирание суставной поверхности и разрушение поверхностной зоны, когда при ППКС значительные нагрузки испытывала промежуточная зона суставного хряща. Оптическая плотность матрикса оставалась на одном уровне на каждом сроке эксперимента, что свидетельствует о повреждении и утрате хрящевого матрикса суставного хряща.

Методы и технологии виртуальной реконструкции и новые методы анализа биологических объектов становятся актуальными и необходимыми для дальнейшего движения в биологии [10, 12, 16, 39, 46, 93, 136, 143]. Основные методы, которые используются в современной практике, основаны на анализе изображений полученных с помощью магнитно-резонансной томографии или микрорентгенографии, но они не могут дать достоверных изображений, которые можно было бы использовать для качественного количественного анализа [105]. В нашей работе впервые представлен и описан метод послойного наложения суставного хряща коленного сустава крысы в норме и при физических нагрузках (экспериментальный ОА путем введения медицинского талька). В результате получены 3D-реконструкции суставов, лишенные пространственных и цветовых искажений и позволили получить и сравнить с гистологическими препаратами, как правильные анатомические сечения в заданных плоскостях, так и нормали к поверхностям для точных линейных измерений. Описанные нами количественные показатели, характеризующие структуру суставного хряща в норме отличались от тех же количественных показателей на гистологических изображениях. Основное отличие (преимущество 3D реконструкции) заключалась в полной цветопередаче и отсутствие структурных нарушений вследствие фиксации коленных суставов крысы в формалине. Это позволила выбрать данный метод для дальнейшего использования в изучении суставного хряща коленного сустава крысы при повышенных физических нагрузках.

Разработанная функциональная модель синтетической функции хондроцитов суставного хряща наглядно демонстрирует возможности модели в виде системы «суставной хрящ – синовиальная жидкость» и, как следствие, возможности применить существующие механизмы управления к процессу

ремоделирования хрящевой ткани, как в норме, так и при экспериментальном ОА, через синовиальную жидкость. Объектом управления в данном случае будет выступать суставной хрящ и синовиальная жидкость коленного сустава крысы, а агентами – хондроциты (клетки хрящевой ткани). В данной модели не были учтены клетки синовиальной оболочки, это связано с тем, что масштаб модели увеличивается многократно, а, следовательно, и сама трудность ее представления в виде функциональной модели, так и математической. Численные значения индикаторов определяют возможные допустимые состояния системы, большое количество факторов (сигнальных молекул), в роли управляющих воздействий, различные концентрации в синовиальной жидкости, а множество допустимых результатов деятельности хондроцитов составляют процессы синтеза, экспрессии и супрессии соответствующих молекул. Следующим шагом станет установление численных зависимостей между управляющими воздействиями, реакциями хондроцитов и наблюдаемыми значениями индикаторов. Учитывая достаточно высокую сложность управления в суставном хряще, связанного не только с его строением, но и путями транспорта факторов управления, был использован преимущественно статистический метод.

В связи с этим в данной работе представлены результаты виртуального скрининга последних исследований, связанных с процессами на молекулярном уровне в суставном хряще. Построена функциональная модель объединяющая основную часть компонентов в единую систему управления. Это позволяет говорить о возможности применения данной модели в управлении и прогнозе развития суставного хряща. Таким образом, сделан ещё один важный шаг к построению математической модели и с возможностью количественного прогнозирования ремоделирования хрящевой ткани как в нормальном состоянии так и при разрушении хрящевой ткани.

На основании функциональной модели, был выбран путь воздействия на суставной хрящ через изменение физико-химических свойств синовиальной жидкости и запуск процессов ремоделирования хрящевой ткани при экспериментальном ОА (снижение лубрикативных свойств СЖ путем

внутрисуставного введения медицинского талька). Нами была выбрана ССБС в качестве модификатора физико-химических свойств СЖ, так как особенностью протеин-содержащих бионических лубрикантов является возможность обеспечения так называемой граничной смазки, то есть смазки, эффективной при высоких давлениях и минимальном слое смазывающей субстанции [27, 58, 120, 125].

Так, в синовиальном суставе за гидродинамическую смазку при умеренных давлениях и наличии достаточного слоя синовиальной жидкости между суставными поверхностями отвечает гиалуроновая кислота, а при непосредственном контакте хрящей и высоком давлении контакта – специфический гликопротеин лубрицин массой 227 кД [85, 123, 140]. Аналогичные механизмы требуются в условиях поддержания эластичности альвеол, что обеспечивается сурфактантной системой легких, белки которой имеют высокую степень гомологичности с лубрицином, прежде всего за счет наличия фрагмента муцинового домена [92].

Как было описано выше взаимодействие коллагеновых хвостов гидрофильной фракции белков сурфактанта SP-A и SP-D (у гидрофобной фракции SP-B и SP-C этот домен отсутствует) с комплексом кальретикулин/CD91 регулирует каскад воспалительных реакций путем индуцирования макропиноцитоза апоптотических клеток [89, 119]. На самом деле, будучи гомологами, все 4 изоформы сурфактанта образуют схожую химическую структуру, а помимо коллагенового региона содержат N-(амино) терминальный регион, стержневой альфа-спиральный пептид, C-(карбокси-) терминальный фрагмент. Именно наличие лектинового домена типа-C, ингибируют активность NF-kb [154, 172], а следовательно подавляют синтез фосфолипазы A2 [69] в СЖ которая увеличивает количество архидоновой кислоты, а также регулирует экспрессию провоспалительных цитокинов, которые в свою очередь регулируют активность матриксных металлопротеиназ (стромелизина, коллагеназы) [145]. Это свидетельствует о противовоспалительных эффектах этих молекул, лубрикации

суставного хряща коленного сустава при высоких физических нагрузках и дегенеративных процессах (ОА).

Основываясь на этом, мы, используя функциональную модель и выбранный модификатор лубрикативных свойств СЖ, можем предсказать, что если белки сурфактанта подавляют синтез провоспалительных цитокинов, то это напрямую будет сказываться на функционировании хондроцитов, а именно снижение синтеза и активности матриксных металлопротеинз (ММП-9), что приводит к сохранению прочности и морфофункциональных свойств хрящевого матрикса суставного хряща.

Новая технология выделения ССБС может быть с успехом масштабирована на получение продукта из легких сельскохозяйственных животных с сохранением возможности использовать оставшийся субпродукт как сырье для восстановительной медицины суставов или других биотехнологий. Полученный продукт имеет состав, обладающий основными свойствами для смазочного композита. Основными компонентами ССБС являются сурфактант-ассоциированные белки и фосфолипиды. Физико-химические свойства соответствуют характеристикам природного лубриканта – синовиальной жидкости суставного хряща. Поэтому данный продукт может быть тестирован в качестве потенциального компонента протезов синовиальной жидкости и других продуктов биомедицинского назначения.

Данные, полученные нами при изучении ССБС, свидетельствуют о том, что содержание сурфактант-ассоциированных белков в комплексе с фосфолипидами позволяет получить биологическую жидкость обладающая высокими показателями коэффициентов силы поверхностного натяжения и трения скольжения, при это обладая пониженной вязкостью. Что в свою очередь может позволить использовать ССБС как улучшенную смазочную композицию.

Выявленные физико-химические характеристики полученной ССБС, (в различных разведениях с СЖ человека), сопоставимы по своим значениям с характеристиками препаратов, в настоящее время использующихся в качестве протезов синовиальной жидкости при заболеваниях суставов [81, 150]. Одним из

преимуществ ССБС является наличие функционально активной ассоциации фосфолипидов и протеинов, которая является, по современным представлениям, необходимой для поддержания не только трибологических, но и сигнальных противовоспалительных свойств естественных смазок организма [51, 62]. Вышеперечисленные белки сурфактанта и их ассоциации с фосфолипидами, безусловно, выполняют функцию снижения поверхностного натяжения и коэффициента трения скольжения, а также снижают активность провоспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ.

По полученным результатам мы можем утверждать, что введение ССБС при экспериментальном ОА, вызванным введением медицинского талька, приводит к сохранению рельефа поверхности, а также сохраняет её лубрикативные свойства предотвращая дальнейшей повреждения как мы видим после морфологического анализа гистологических срезов и 3D-реконструкций. Показатель средней яркости хрящевой ткани и а также оптическая плотность, не дают точного представления о состоянии хрящевой ткани, в связи с тем что на данный показатель влияет большое количество факторов, начиная от стадии фиксации и сроков хранения материала вплоть до его степени и времени окраски. Но в целом можно дать предварительную морфологическую характеристику по данному показателю.

Данные, полученные нами в исследовании по введению ССБС в суставную полость в условиях экспериментального ОА коленного сустава, показали определенную эффективность, а также возможность использования подобной смеси для разработки препаратов, способствующих защите суставного хряща от хронического повреждения. Безусловно, для дальнейшего изучения влияния смеси белков сурфактанта на суставной хрящ требует дополнительных исследований, особенно в отношении влияния на морфологические показатели хондроцитов, а также специфических маркеров апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток в каждой зоне суставного хряща.

Таким образом, при моделировании остеоартроза, путем введения талька возникают структурные изменения суставной поверхности в виде выраженных

механических повреждений (частичное разрушение поверхностной зоны), сопровождающихся уменьшением оптической плотности хрящевого матрикса и численной плотности хондроцитов в поверхностной зоне. Увеличение экспрессии MMP-9 и снижение экспрессии TIMP-1 свидетельствует о разрушении хрящевого матрикса суставного хряща.

Результаты введения ССБС в роли хондропротектора на фоне моделирования ОА сопровождается снижением выраженности разрушения поверхностной зоны суставного хряща, улучшением показателей хрящевого матрикса и пропорциональным уменьшением соотношения выраженности экспрессии MMP-9 и TIMP-1. Полученные данные в дальнейшем можно будет использовать для тканевой инженерии суставного хряща и восстановительной медицины.

Морфометрия суставного хряща коленного сустава крысы при экспериментальном ОА и его лечении ССБС с использованием 3D-реконструкции на основе техники высокоточного сошлифовывания позволяет избежать дополнительных пространственных и цветовых искажений. Это позволяет дать более качественную оценку показателей, характеризующие структурные изменения хрящевой и костной ткани при моделировании ОА. Полученные результаты можно будет использовать для создания физиолого-математических моделей, а также для технологий восстановления тканей путем 3D-принтинга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование функциональных свойств хондроцитов и морфологии суставного хряща коленного сустава крысы в норме и при моделировании физических нагрузок с помощью перерезки передней крестообразной связки и введения медицинского талька, позволило проанализировать результаты исследования и позволяет подвести следующие итоги в виде **ВЫВОДОВ**:

1. В суставном хряще коленного сустава выявлена неоднородность структуры хрящевого матрикса в виде особых участков, обладающих более высокой плотностью хрящевого матрикса и повышенной численностью хондроцитов как в нагружаемых областях так и не в нагружаемых областях.

2. При моделировании повышенной механической нагрузки на суставной хрящ коленного сустава в результате перерезки передней крестообразной связки на 12-ой неделе неоднородные участки в хрящевом матриксе имеют в среднем в 1.5 раза больший размер и плотность хрящевого матрикса, в сравнении с величинами аналогичных показателей у интактных животных. На 12-й неделе эксперимента показатель синтетической активности хондроцитов составил 42.2% для аггрекана и 81.3% для лубрицина от значения показателей у интактными животными.

3. При моделировании снижения лубрикативных свойств синовиальной жидкости в результате внутрисуставного введения медицинского талька в суставном хряще наблюдалась равномерная деструкция суставной поверхности и поверхностной зоны, с разрушением клеточных структур на всех сроках эксперимента. На 12-ой неделе показатель активности синтеза матриксных металлопротеиназ в среднем составил в 5 раза больше, а показатель активности синтеза их ингибиторов составил в 2 раза меньше, по сравнению с величинами аналогичных показателей у интактных животных.

4. Разработанная функциональная модель управления синтетической функцией хондроцитов детально описывает управляющие воздействия, пути их передачи с помощью «лиганд-рецептор» и предсказывает ответные реакции хондроцитов при ремоделировании суставного хряща.

5. Новая технология выделения субстанции, содержащей белки сурфактанта, позволяет получить исследуемую смесь, очищенную от примесей. Исследование физико-химических свойств *in vitro* показало, что при соотношении 1:4 (синовиальная жидкость : субстанция, содержащая белки сурфактанта) достигаются оптимальные условия для использования субстанции, содержащей белки сурфактанта для коррекции лубрикативных свойств синовиальной жидкости, за счет снижения вязкости - 45%, силы поверхностного натяжения и коэффициента трения скольжения.

6. Внутрисуставное введение субстанции, содержащей белки сурфактанта, после моделирования экспериментального остеоартроза (модель с введением медицинского талька) показало: уменьшение выраженных повреждений суставной поверхности на 6 и 12 неделе. На 12 неделе эксперимента экспрессия ингибиторов матриксных металлопротеиназ в промежуточной зоне суставного хряща составила в среднем в 1.25 раза выше величины этого же показателя при экспериментальном остеоартрозе.

Таким образом, результаты введения сурфактант-ассоциированных белков в роли хондропротекторов на фоне моделирования ОА сопровождается снижением выраженности разрушения поверхностной зоны, улучшением показателей хрящевого матрикса и хондроцитов, что свидетельствует о положительном ремоделировании суставного хряща. Полученные данные в дальнейшем можно будет использовать для тканевой инженерии суставного хряща и восстановительной медицины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ССБС – субстанция содержащая белки сурфактанта

БПЗ – белки поверхностной зоны

ОА – остеоартроз

СЖ – синовиальная жидкость

ММП - матриксные металлопротеиназы

ППКС - перерезка передней крестообразной связки

ТИМП – тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ

ГК – гиалуроновая кислота

TGF β - трансформирующий фактор роста бета

BMP – костный морфогенетический белок

IGF – инсулиноподобный фактор роста

TLR – толл-лайк рецептор

TNF – фактор некроза опухоли

ИЛ-1 – интерлейкин 1

LRB – лептиновый рецептор

ATR - ангиотензиновый рецептор

E2/E4 – рецептор простагландинов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. -М.: Медицина, 2002. – 239 с.
2. Александров Ю.М. Диагностика деформаций в области тиббиофemorального сустава (обзор лит.) // Ю.М. Александров, Г.В. Дьячкова // Гений ортопедии. – 2012. – № 1. – С. 146-152.
3. Анников В.В. Биохимический состав синовиальной жидкости в норме и при остеоартрозах / В.В. Анников, Ю.В. Пигарева // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 4. – С. 136-139.
4. Басок Ю.Б. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины в лечении дефектов хрящевой ткани суставов / Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 102-122.
5. Беляева Е.А. Локальная инъекционная терапия при воспалительных заболеваниях суставов и околосуставных тканей // Е.А. Беляева Клиническая медицина и фармакология. – 2015. – № 2. – С. 23-40.
6. Божокин М.С. Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща (аналитический обзор литературы) / М.С. Божокин, С.А. Божкова, Г.И. Нетылько // Травматология и ортопедия России. – 2016. – № 3(81). – С. 122-134.
7. Возможности полноцветной трехмерной реконструкции биологических объектов методом послойного наложения: коленный

сустав крысы / А.А.Терпиловский [и др.] // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки. – 2015. - №4. – С. 9-19.

8. Воробьев А.А. Новые анатомо-функциональные характеристики нижних конечностей человека / А.А. Воробьев, А.А. Колмаков, С.А. Безбородов [и др.]// Вестник ВолгГМУ. – 2013. - №2. – С. 20-24.

9. Головач И.Ю. Посттравматический остеоартрит: воспалительные, клеточные и биомеханические механизмы прогрессирования заболевания // И.Ю. Головач, И.М. Заирный, И.П. // Семенов Травма. – 2016. – Т.16, № 1. – С. 99-105.

10. Гуничева Н.В. Особенности магнитно-резонансной томографии суставов нижних конечностей у пациентов разных возрастных групп / Н.В. Гуничева, Т.А. Ахадов, В.Н. Шубкин // Сиб. мед. обозрение. – 2010. – Т. 66, № 6. – С. 59-62.

11. Доценко Т.Г. Исследование синовиальной жидкости - клиническая значимость полученных результатов Т.Г. Доценко, Г.И. Шлыкова, О.В. Теплякова // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. – Т. 61. № 8. – С. 478-484.

12. Железнов Л.М. Возможности современной виртуальной анатомии и ее роль в педагогическом процессе / Л.М. Железнов // Журнал Анатомии и гистопатологии. – 2017 Том 6, № 5. – С. – 14а

13. Инновационные технологии в восстановлении тиббиофemorального сустава при его повреждениях и заболеваниях / Д.А.Маланин [и др.] // Вестник Волгоградского гос. мед. ун-та. – 2009. – №2(30). – С. 7-13.

14. Использование методов биомеханики в оценке состояния и коррекции патологии опорно-двигательной системы / Ромакина Н.А. [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2015. – Т. 11, № 3. – С. 310-316.

15. Кабалык М.А. Физические свойства и особенности организации суставного хряща при остеоартрозе / М.А. Кабалык / Дневник казанской медицинской школы. – 2016. – № 4(14). – С. 40-43.

16. Кинзерский А. Ю. Ультразвуковое исследование при травмах и заболеваниях коленного сустава [Текст] : практическое руководство / А. Ю. Кинзерский. - Челябинск : Челябинская гос. мед. акад. – 2010. – С. 40

17. Клинико-биомеханическое обоснование внутрисуставной инъекционной терапии пациентов с гонартрозом / Н.В. Загородний [и др.] // Стационарозамещающие технологии: Амбулаторная хирургия. – 2015. – № 1-2. – С. 55-60.

18. Клинико-биомеханическое обоснование внутрисуставной инъекционной терапии пациентов с гонартрозом / Н.В. Загородний [и др.] // Клиническая практика. – 2015. – №1(21). – С. 35-41.

19. Копелев П.В. Оценка жизнеспособности хондроцитов кролика при культивировании на полилактидных скаффолдах, предназначенных для тканевой инженерии хрящевой ткани / П.В. Копелев, Ю.А. Нащекина, С.А. Александрова // Бюллетень инновационных технологий. – 2017. – Т. 1, № 2 (2). – С. 31-35.

20. Котельников Г. П., Ларцев Ю. В., Махова А. Н. Сравнительная оценка структурных изменений тканей сустава при

различных моделях экспериментального артроза / Г. П. Котельников, Ю. В. Ларцев, А. Н. Махова // Казанский медицинский журнал. – 2006. – № 1. – С. 31–35

21. Котельников Г.П. Мозаичная хондропластика полнослойных дефектов суставных поверхностей тибioфemорального сустава при его деструктивно-дистроических поражениях / Г.П. Котельников // Новости Хирургии. – 2016 – Том. 24 № 5. – С. – 473-481

22. Котельников Г.П. Особенности регнеративных процессов при пластике костно-хрящевых дефектов комбинированными траснплантантами на основе аутологичных и аллогенных культур клеток из реберной хрящевой ткани / Г.П. Котельников / Морфология. – 2014 – Т.146 №4. – С. 47-52

23. Лукашенко Л.В. Сурфактантное состояние синовиальной жидкости у больных гонартрозом / Л.В. Лукашенко // Травма. – 2013. – Т. 14. № 3. – С. 78–81.

24. Маланин Д.А., Писарев В.Б., Новочадов В.В. Восстановление повреждений хряща в коленном суставе. – Волгоград: Волгоградское научное издательство. – 2010. – 518 с.

25. Матвеева Е.Л. Изменение электролитного состава синовиальной жидкости у больных остеоартрозом тибioфemорального сустава на разных стадиях заболевания / Е.Л. Матвеева, А.Г. Гасанова, Е.С. Спиркина, О.К. Чегуров Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 191.

26. Мустафин Р.Н. Молекулярные механизмы развития остеоартроза / Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова // Лечебное дело. – 2015. – № 3. – С. 86-92.

27. Новиков Д. А. Теория управления организационными системами. 3-е изд., испр. и дополн. – М.: Издательство физико-математической литературы, 2012. – 604 с.

28. Новиков Д.А., Новочадов В.В. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (типовые случаи) – Волгоград: Издательство ВолГМУ, – 2005. – 84 с.

29. Новочадов В.В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща (обзор литературы) / В.В. Новочадов // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11: Естественные науки. – 2013. – №1. – С. 19-28.

30. Новые критерии в оценке эффективности лечения больных гонартрозом / А.С. Канаев [и др.] // Лечащий врач. – 2014. – № 12. – С. 64.

31. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в лечении пациентов с гонартрозом III стадии / Д.А. Маланин [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2014. – № 3. – С. 52-59.

32. Особенности метаболизма протеогликанов из разных топографических зон тиббиофemorального сустава у больных остеоартрозом: вариабельность фенотипа хондроцитов / Т. В. Русова [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2013. – Т. 33, № 5. – С. 78–86.

33. Особенности структурной реорганизации суставного хряща и синовиальной оболочки тиббиофemorального сустава / А.А. Еманов [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12-7. – С. 1228-1232.

34. Перестройка суставного хряща при замещении его дефекта биокompозитным материалом / В.Б. Богатов [и др.] // Морфология. – 2015. – Т.147. №1. – С. 63-69.

35. Петренко В.М. Анатомия легких у белой крысы / В.М. Петренко // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 10 (часть 3) – С. 414-417

36. Поворознюк В.В. Инновационный препарат «гиалгель» для лечения пациентов с остеоартрозом суставов II-III степени / В.В. Поворознюк, Т.В. Орлик, С.В. Козицкая // Поликлиника. – 2016. – № 1-1. – С. 72-73.

37. Русова Т.В. Рост суставного хряща: изменения функциональных пулов и состава протеогликанов хряща коленного сустава мини-свиней в онтогенезе / Т.В. Русова, А.А. Воропаева, В.С. Баитов // Сибирский научный медицинский журнал. – 2016. – Т.36, № 6. – С. 29-34.

38. Русова Т.В. Структура гликозаминогликанов суставного хряща у больных остеоартрозом: влияние топографии тибioфеморального сустава / Т.В. Русова, В.С. Баитов // Сибирский научный медицинский журнал. – 2012 – Т. 32, № 2. – С. 54-60

39. Сенча А.Н. Ультразвуковая диагностика. Коленный сустав / А.Н. Сенча, Д.В. Беляев, П.А. Чижов. – М. : Видар : Видар-М, 2012. – 193 с.

40. Синтез агрекана и коллагена II типа in vitro хондроцитами из разных зон коленного сустава больных гонартрозом / Щелкунова Е.И. [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 212.

41. Способ создания виртуальной модели биологического объекта и устройство для его осуществления: пат. 2418316 РФ / А. А. Терпиловский, А. Л. Кузьмин, Р. А. Лукашкина. Опубл. 10.05.2011. С 24.

42. Страхов М.А. Современные тенденции использования средств, замещающих синовиальную жидкость, на основе связанной гиалуроновой кислоты в лечении пациентов с травмами и заболеваниями опорно-двигательного аппарата / М.А. Страхов, А.В. Скороглядов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2013. – № 4. – С. 85–91

43. Структурно-функциональные особенности хрящевой ткани тибioфemорального сустава при остеоартрозе / Т.В. Русова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №5. – С. 337.

44. Структуры синовиальной жидкости в оценке эффективности тотального эндопротезирования коленного сустава Акимов Н.П [и др.] // Врач. – 2015. – № 5. – С. 19-21.

45. Теплякова О.В. Исследование синовиальной жидкости - значение в практике ревматолога / О.В. Теплякова, Г.И. Шлыкова, Т.В. Доценко // Вестник Челябинской областной клинической больницы. – 2016. – № 3(33). – С. 84.

46. Трехмерная реконструкция тибioфemорального сустава крысы методом послойного наложения: новые возможности анализа / В.В. Новочадов [и др.] // Труды Международной научной конференции СРТ2014. Институт физико-технической информатики. – 2015. – С. 161-166.

47. Хитров Н.А. Варианты локальной терапии остеоартроза / Н.А. Хитров // Фарматека. – 2015. – № 16(309). – С. 10-16.

48. Хитров Н.А. Современные возможности имплантатов синовиальной жидкости при остеоартрозе / Н.А. Хитров // Русский медицинский журнал. – 2014. – Т. 22. №7. – С. 499-502.

49. Цветкова Е.А., Кадолич Ж.В., Арастович Т.В. Тенденции в изучении свойств и функций синовиальной жидкости сустава / Е.А. Цветкова, Ж.В. Кадолич, Т.В. Арастович // Известия Гомельского государственного университета им. Ф. Скорины. – 2016. – № 6 (99). – С. 47-53.

50. Четина Е.В. Механизмы эмбриогенеза при остеоартрозе: роль дифференцировки хондроцитов в резорбции суставного хряща / Е. В. Четина // Научно-практическая ревматология. – 2010. – № 3. – С. 65–77.

51. A lipidomic study of phospholipid classes and species in human synovial fluid / Kosinska M.K. [et al.] // Arthritis Rheum. – 2013. – Vol. 65, №9. – P. 2323-2333.

52. A prospective multi-centre, open study of the safety and efficacy of hylan G-F 20 (Synvisc) in patients with symptomatic ankle (talo-crural) osteoarthritis / Witteveen A.G. [et al.] // Foot Ankle Surg. – 2008. – Vol. 14, №3. – P. 145–152.

53. A randomised, double-blind, controlled trial comparing two intra-articular hyaluronic acid preparations differing by their molecular weight in symptomatic knee osteoarthritis / F. Berenbaum [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2012. – Vol. 71, №9. – P. 1454–1460.

54. A review of the combination of experimental measurements and fibril-reinforced modeling for investigation of articular cartilage and

chondrocyte response to loading comput / P. Julkunen [et al.] // Math Methods Med. – 2013. –doi 10.1155/2013/326150

55. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease / Hui A.Y. [et al.] // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. – 2012. – Vol. 4, №1. – P. 15–37.

56. A comprehensive molecularinteraction map for rheumatoid arthritis / Gang W. [et al.] // PLOS ONE. – 2010. – Vol 5, № 4. – pone.0010137.

57. Activating types 1 and 2 angiotensin II receptors modulate the hypertrophic differentiation of chondrocytes / I. Tsukamoto [et al.] // FEBS Open Bio. – 2013. № 3. – P. 279–284.

58. Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints / Greene G.W. [et al.]. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2011. – Vol.108 № 13, – P. 5255–5259.

59. Advanced glycation end products induce peroxisome proliferator-activated receptor γ down-regulation-related inflammatory signals in human chondrocytes via toll-like receptor-4 and receptor for advanced glycation end products. / Y.J. Chen [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol.8 № 6. – e66611.

60. Albro M.B. Shearing of Synovial Fluid Activates Latent TGF- β / M.B. Albro, A.D. Cigan, R.J. Nims //Osteoarthritis Cartil. – 2012. – Vol. 20, №11. – P. 1374–1382.

61. An ex vivo human cartilage repair model to evaluate the potency of a cartilage cell transplant / C. Bartz [et al.] // J. Transl. Med. – 2016. – № 14. P. 317.

62. Andrades J.A. Induction of superficial zone protein (BPI3)/lubricin/PRG 4 in muscle-derived mesenchymal stem/progenitor cells

by transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein-7 / J.A. Andrades, S.C. Motaung, P. Jiménez-Palomo // *Arthritis Res. The.* – 2012. – Vol. 14, № 2. – R72

63. Antonov D.A. Molecular mechanisms of the lubricating function of the synovial fluid control / D.A. Antonov // *Eur. J. Mol. Biotech.* – 2013. – Vol. 1, №2. – P. 48-57.

64. Articular cartilage tissue engineering: the role of signaling molecules / H. Kwon [et al.] // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – Vol. 73 № 6. – P. 1173–1194.

65. Atomic force microscope investigation of the boundary-lubricant layer in articular cartilage / S.M. Chan [et al.] // *Osteoarthritis Cartil.* – 2010. – Vol. 18, №7. – P. 956-963.

66. Bader D.L. Biomechanical influence of cartilage homeostasis in health and disease. / D.L. Bader, D.M. Salter, T.T. Chowdhury // *Arthritis.* – 2011. – e979032. doi: 10.1155/2011/979032.

67. Bhosale A.M. Articular cartilage: structure, injuries and review of management / A.M. Bhosale, J.B. Richardson // *Br. Med. Bull.* – 2008. – V. 87. – P. 77–95.

68. Blanco O. Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat respiratory distress syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant / O. Blanco, J. Pérez-Gil // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 568, № 1-3. – P. 1-15.

69. Boilard E. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis / E. Boilard [et al.] // *EMBO Mol. Med.* – 2010. – Vol. 2, №5. – P. 72-1 87.

70. Bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair / C. R. Fellows [et al.] // *Front Genet.* – 2016. – №7. – P. 213.
71. Boundary mode lubrication of articular cartilage by recombinant human lubricin / Gleghorn J.P. [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 2009. – Vol. 27, №6. – P. 771–777.
72. Britta J.H. Driessen Cellular reprogramming for clinical cartilage repair / J.H. Britta Driessen, C. Logie, L. A. Vonk // *Cell Biol Toxicol.* – 2017. – Vol. 33 № 4. – P. 329–349.
73. Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin Macroscopic and histological assessments // D. Kazemi [et al.] / *Bone Joint Res.* – 2017. – Vol. 6 № 2. – P. 98–107.
74. Cell deformation behavior in mechanically loaded rabbit articular cartilage 4 weeks after anterior cruciate ligament transection. / Turunen S.M. [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2013. – Vol. 21 № 3. – P. 505-513.
75. Chan S.M. Dependence of nanoscale friction and adhesion properties of articular cartilage on contact load / S.M. Chan [et al.] // *J. Biomech.* – 2011. – Vol. 44. – P. 1340-1349.
76. Chawla K. Molecular resurfacing of cartilage with proteoglycan 4 / K. Chawla [et al.] // *Acta Biomater.* - 2010. – Vol. 6, №9. – P. 3388-3394.
77. Chubinskaya S. OP-1/BMP-7 in cartilage repair / S. Chubinskaya, M. Hurtig, D.-C. Rueger // *Int. Orthop.* – 2007. – Vol. 31. – P. 773–781.
78. Co-expression and co-localization of cartilage glycoproteins CHI3L1 and lubricin in osteoarthritic cartilage: morphological, immunohistochemical and gene expression profiles. / M.A. Szychlińska [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17 № 3. – P. 359.

79. Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering / J. A. M. Steele [et al.] // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 10, № 5. – P. 2065–2075.

80. Cucchiarini M. Basic science of osteoarthritis / M. Cucchiarini [et al.] // *J Exp Orthop.* – 2016. – Vol.3 №1. P. – 22.

81. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis / W. Zhang [et al.] // *Citation: Bone Research.* – 2016. – Vol. 13 № 1. – P. 5040

82. Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes / A. I. Tsuchida [et al.] // *Arthritis Res Ther.* – 2014. – Vol.16 № 5. – P. 441.

83. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry / D.J. Dabbs // 3rd edition. – Elsevier. – 2010. – P. 952

84. Delivery and performance of surfactant replacement therapies to treat pulmonary disorders. / N. El-Gendy [et al.] // *Therapeutic delivery.* – 2013. – Vol.4 № 8. – P. 951–980

85. Different phenotype of chondrocytes in articular cartilage: mapping, possible mechanisms, and impact to implant healing. / Novochadov V.V. [et al.] // *Eur. J. Mol. Biotech.* Vol 2, №4, pp. 210-222.

86. Differential effect of molecular mass hyaluronan on lipopolysaccharide-induced damage in chondrocytes / Campo G.M. [et al.] // *Innate Immun.* – 2010. – Vol. 16. – P. 48–63.

87. Effect of hyaluronic acid in symptomatic hip osteoarthritis: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial / P. Richette [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60, №3. – P. 824–830.

88. Effects of equine joint injury on boundary lubrication of articular cartilage by synovial fluid: role of hyaluronan / J.M. Antonacci [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64, №9. – P. 2917–2926.
89. Elnashar M. Biopolymers. / M. Elnashar // Croatia: SCIYO publishing house. – 2010. – P. 257–264.
90. Epidemiology and burden of osteoarthritis/A. Litwic [et al.] // *Br. Med. Bull.* – 2013. – Vol. 105. – P. 185-199
91. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis / Liming Q. [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2017. – Vol. 13 № 1. – P. 63–68.
92. Fathi-Azarbayjani A. Surface tension in human pathophysiology and its application as a medical diagnostic tool. / A. Fathi-Azarbayjani, A. Jouyban // *Bioimpacts.* – 2015. – Vol 5, № 1. – P. 29–44.
93. Fortier high-resolution methods for diagnosing cartilage damage in vivo / Kira D. [et al.] // *Cartilage.* – 2016. Vol. 7 № 1. – P. 39–51.
94. Garcia-Rodriguez J.A. Intra-articular knee injections. Procedures and assessments video series / J.A. Garcia-Rodriguez // *Can. Fam. Physician.* – 2013. – Vol. 59, №4. – R377.
95. Goldring M.B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis / M.B. Goldring // *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* – 2012. – Vol.4, №4. – P. 269-285.
96. Han L. Nanomechanics of the cartilage extracellular matrix / L. Han, A.J. Grodzinsky, C. Ortiz // *Annu. Rev. Mater. Res.* – 2011. – Vol. 41. – P. 133–168.

97. High Quality of Infant Chondrocytes in Comparison with Adult Chondrocytes for Cartilage Tissue Engineering / F. Mortazavi [et al.] // World J. Plast Surg. – 2017. – Vol. 6, № 2. – P. 183–189.

98. Hubmacher D. The biology of the extracellular matrix: novel insights / D. Hubmacher, S. S. Apte // Curr. Opin. Rheumatol. – 2013. – Vol. 25. № 1. – P. 65–70.

99. Hunter D.J. Pharmacologic therapy for osteoarthritis – the era of disease modification / D.J. Hunter // Nat. Rev. Rheumatol. – 2011. – Vol. 7, №1. – P. 13-22.

100. Hyaluronan and phospholipid association in biolubrication / Wang M. [et al.] // Biomacromolecules. – 2013. – Vol. 14, №12. – P. 4198-4206.

101. Hyaluronic acid and phospholipid interactions useful for repaired articular cartilage surfaces—a mini review toward tribological surgical adjuvants / Stanislaw J. [et al.] // Colloid Polym Sci. – 2017. – Vol. 295 № 3. – P. 403–412.

102. Identification of a Prg4-positive articular cartilage progenitor cell population / E. Kozhemyakina [et al.] // Arthritis Rheumatol. – 2015. Vol.67 № 5. – P. 1261–1273.

103. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling / Y. Mori [et al.] // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289, №. 14. – P. 10192–10200.

104. IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway / Y. Wang [et al.] // J. Bone Mineral Res. – 2011. – Vol. 26, №7. – P. 1437–1446.

105. Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering / Appel A.A. [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34, 28. – P.6615–6630

106. In vitro expansion affects the response of chondrocytes to mechanical stimulation. / R.H. Das, [et al.] // *Osteoarthritis Cartil.* – 2008. – Vol. 16, № 3. – P. 385-391.

107. Increased friction coefficient and superficial zone protein expression in patients with advanced osteoarthritis / C.P. Neu [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62, №9. – P. 2680-2687.

108. Induction of CD44 cleavage in articular chondrocytes / N. Takahashi [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62, №. 5. – P. 1338–1348.

109. Intakhab-Alam N.Y. Urocortin protects chondrocytes from NO-induced apoptosis: a future therapy for osteoarthritis? / N. Y. Intekhab-Alam, O. B. White, S. J. Getting // *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol. 4. – e717

110. Interactive cytokine regulation of synoviocyte lubricant secretion / M.E. Blewis [et al.] // *Tissue Eng. Part A.* – 2010. – Vol. 16. – P. 1329-1335.

111. Intra-articular hyaluronic acid injection versus oral non-steroidal anti-inflammatory drug for the treatment of knee osteoarthritis: a multi-center, randomized, open-label, non-inferiority trial / Ishijima M. [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2014. – Vol. 16, №1. - R18.

112. Iwakura T., Sakata R., Reddi A.H. Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein in synovial explants with TGF- β 1 and BMP-7 / T.cIwakura, R.Sakata, A.H. Reddi // *Tissue Eng. Part A.* – 2013. – Vol. 19, №23-24. – P. 2638-2644.

113. Jones A.R., Chen S., Chai D.H., et al. Modulation of lubricin biosynthesis and tissue surface properties following cartilage mechanical injury / Jones A.R. [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60 (1). - P. 133–142.

114. Katta J. Chondroitin sulphate: an effective joint lubricant? / Katta J. [et al.] // *Osteoarthritis Cartil.* – 2009. – Vol. 17 (8). – P. 1001-1008.

115. Lee S.Y. Mesenchymal progenitor cells derived from synovium and infrapatellar fat pad as a source for superficial zone cartilage tissue engineering: analysis of superficial zone protein/lubricin expression / S.Y. Lee, T. Nakagawa, A.H. Reddi // *Tissue Eng Part A.* - 2010. – Vol. 16, №1. - P. 317-325.

116. Liposomes act as effective biolubricants for friction reduction in human synovial joints / Sivan S. [et al.] // *Langmuir.* – 2010. – №26. – P. 1107-1116.

117. Loeser R. F. Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage / R. F. Loeser // *Matr. Biol.* – 2014. – Vol. 39. – P. 11–16.

118. Loss of cartilage structure, stiffness, and frictional properties in mice lacking PRG4 / Coles J.M. [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62. – P. 1666-1674.

119. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-mediated endocytic clearance of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-4: Functional differences of non-catalytic domains of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in LRP1 binding / Yamamoto K. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. - №10. – P. 1- 28.

120. Lu K.W. Kinematic viscosity of therapeutic pulmonary surfactants with added polymers. / K.W. Lu, J. Pérez-Gil, H.W. Taeusch // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – № 1788(3). – P. 632–637.

121. Lubricin is expressed in chondrocytes derived from osteoarthritic cartilage encapsulated in poly (ethylene glycol) diacrylate scaffold / G. Musumeci [et al.] // *Eur. J. Histochem*. – 2011. – Vol. 55, №3. – e31.

122. Lubricin/proteoglycan 4 increases in both experimental and naturally occurring equine osteoarthritis / H.L. Reesink [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2017 – Vol 25 № 1. – P. 128–137.

123. Ludwig T.E. Cartilage boundary lubrication synergism is mediated by hyaluronan concentration and PRG4 concentration and structure. / T.E. Ludwig, M.M. Hunter, T.A. Schmidt // *BMC Musculoskelet Disord*. – 2015. – Vol. 16, № 386. – doi: 10.1186/s12891-015-0842-5

124. McMahon L.A. Biomechanics and mechanobiology in osteochondral tissues: review / L.A. McMahon, F.J. O'Brien, P.J. Prendergast // *Regen. Med*. – 2008. – Vol. 3, №5. – P. 743-759.

125. McNary S.M. Engineering lubrication in articular cartilage. / S.M. McNary, K.A. Athanasiou, A.H. Reddi // *Tissue Engineering Part B Reviews*. – 2012. – Vol. 18 № 2. – P. 88-100

126. Metabolic response of human osteoarthritic cartilage to biochemically characterized collagen hydrolysates / S. Schadow, [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2017. – №18(1). – P. 207

127. Modulation of Superficial Zone Protein/Lubricin/PRG4 by Kartogenin and Transforming Growth Factor- β 1 in Surface Zone Chondrocytes in Bovine Articular Cartilage / K. Miyatake // *Cartilage*. – 2016. – Vol. 7 № 4. P. – 388–397.

128. Montaseri A. IGF-1 and PDGF-bb suppress IL-1 β -Induced cartilage degradation through down-regulation of NF- κ B signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway / A. Montaseri, F. Busch // PLoS One. – 2011. Vol. 6, № 12. – e28663.

129. Moutos F.T. Functional properties of cell-seeded three-dimensionally woven poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for cartilage tissue engineering / F.T. Moutos, F. Guilak // Tissue Eng Part A. – 2010. – Vol. 16. – P. 1291-1301.

130. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases / G. Murphy // Genome Biology. – 2011. – Vol. 12. – P. 233

131. Nakahara H. Pulmonary surfactant model systems catch the specific interaction of an amphiphilic peptide with anionic phospholipids / H. Nakahara, S. Lee, O. Shibata // Biophys. J. – 2009. – Vol. 96, № 4. – P. 1415–1429

132. Novochadov V.V. Growth factor technologies in cartilage tissue engineering (review) / V.V. Novochadov // Eur. J. Mol. Biotech. – 2013. – №1. – P. 28-37.

133. Ohba S. Leptin receptor JAK2/STAT3 signaling modulates expression of frizzled receptors in articular chondrocytes / S. Ohba, T.M. Lanigan, B.J. Roessler // Osteoarthritis Cartilage. – 2010. Vol. 18, № 12. – P. 1620–1629.

134. Papathanasiou I. Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/ β -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes / I. Papathanasiou, K.N. Malizos, A.Tsezou // Arthritis Res Ther. – 2012. Vol. 14, № 2. – R82.

135. Park T.S. Arthroscopic resection of the distal clavicle in osteoarthritis of the acromioclavicular joint / T.S. Park, K.W. Lee // Indian J. Orthop. – 2016. – Vol. 50 № 4. – P. 379-383.

136. Paunipagar B. K. Imaging of articular cartilage / B. K Paunipagar, D.D. Rasalkar // Indian J Radiol Imaging. – 2014. – Vol. 24 № 3. P. – 237–248.

137. PGE2 and its cognate ep receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis / L. Xin, M. Ellman, H.-J. Im // Arthritis Rheum. – 2009. – Vol. 60, № 2. – P. 513–523.

138. Prevention of cartilage degeneration and restoration of chondroprotection by lubricin tribosupplementation in the rat following anterior cruciate ligament transection / B.C. Flingeming [et al.] // Arthritis Rheum. - 2010. – Vol. 62 (8). - P. 2382-2391.

139. Prevention of cartilage degeneration and restoration of chondroprotection by Lubricin tribosupplementation in the rat following ACL transection / G.D. Jay [et al.] // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62, №8. – P. 2382-2391.

140. Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin. / C.R. Flannery, [et al.] // Arthritis Rheum. – 2009. – Vol. 60 № 4. – P. 840-847.

141. Protective effect of low dose intra-articular cadmium on inflammation and joint destruction in arthritis / P. Bonaventura, [et al.] // Sci Rep. – 2017. –№ 7. – P. 2415.

142. Protective effect of Shenmai injection on knee articular cartilage of osteoarthritic rabbits and IL-1 β -stimulated human chondrocytes / Y. Nan [et al.] // Exp Ther Med. – 2017. – Vol. 13 № 6. – P. 3013–3020

143. Raman spectroscopy reveals new insights into the zonal organization of native and tissue-engineered articular cartilage / M. S. Bergholt [et al.] // ACS Cent Sci. – 2016. – Vol. 2 № 12, – P. 885–895

144. Reaction-diffusion-delay model for EPO/TNF- α interaction in articular cartilage lesion abatement / J. M. Graham [et al.] // Biol. Direct. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. 7–9.

145. Regulation of matrixmetalloproteinase-3 and matrixmetalloproteinase-13 by SUMO-2/3 through the transcription factor NF- κ B / S. Frank [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2013. – Vol. 72, №11. – P. 1874-1881.

146. Regulation of the friction coefficient of articular cartilage by TGF-beta1 and IL-1beta / G. DuRaine [et al.] // J. Orthop. Res. – 2009. – Vol. 27, №2. – P. 249-256.

147. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis / M. Kapoor [et al.] // Nat. Rev. Rheumatol. – 2011. – Vol. 7, №1. – P. 33–42.

148. Sarker M. Lung surfactant protein A (SP-A) interactions with model lung surfactant lipids and an SP-B fragment / M. Sarker, D. Jackman , V. Booth // Biochemistry. – 2011. – Vol. 50, №22. – P. 4867–4876.

149. Schmidt T.A. Differential regulation of proteoglycan 4 metabolism in cartilage by IL-1 α , IGF-I, and TGF- β 1/ T.A. Schmidt [et al.] // Osteoarthritis Cartil. – 2008. – Vol. 16, №1. – P. 90-97.

150. Shen J. Recent progress in osteoarthritis research. / J. Shen D. Chen J. // *Am. Acad. Orthop. Surg.* – 2014. – № 22(7). – P. 467–468.

151. Single, intra-articular treatment with 6 ml hylan G-F 20 in patients with symptomatic primary osteoarthritis of the knee: a randomised, multicentre, double-blind, placebo controlled trial / X. Chevalier [et al.] // *Ann Rheum Dis.* – 2010. – Vol. 69, №1. – P. 113–119.

152. Smith A.M. Development of a synovial fluid analogue with bio-relevant rheology for wear testing of orthopaedic implants / A.M. Smith [et al.] // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* – 2013. – Vol. 18, №32C. – P. 177-184.

153. Supporting biomaterials for articular cartilage repair / D. F. Duarte Campos [et al.] // *Cartilage.* – 2012. – Vol. 3 № 3. – P. 205–221

154. Surfactant protein (SP)-A suppresses preterm delivery and inflammation via TLR2 / V. Agrawal [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, №5. – e63990.

155. Susan R. Localization of extracellular matrix receptors on the chondrocyte primary cilium / R. Susan // *J. Histochem. Cytochem.* – 2006. – Vol. 54, № 9. – P. 1005–1014.

156. Synthesis and characterization of a lubricin mimic (mlub) to reduce friction and adhesion on the articular cartilage surface / A. Lawrence [et al.] // *Biomaterials.* – 2016. – № 73. – P. 42–50.

157. Tan A.R. Concise review: mesenchymal stem cells for functional cartilage tissue engineering: taking cues from chondrocyte- based constructs stem cells / A. R. Tan, T. Clark // *Transl Med.* – 2017. – Vol. 6 № 4. – P. 1295–1303.

158. The impact of anterior cruciate ligament injury on lubricin metabolism and the effect of inhibiting tumor necrosis factor alpha on chondroprotection in an animal model / K.A. Elsaid [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60. – P. 2997–3006.

159. The Mechanobiology of Articular Cartilage: Bearing the Burden of Osteoarthritis J. Sanchez-Adams [et al.] // *Curr Rheumatol Rep.* – 2014. – Vol. 16 № 10. P. – 451.

160. The minor collagens in articular cartilage / L.Yunyun [et al.] // *Protein Cell.* – 2017. – Vol. 8 № 8, – P. 560–572.

161. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the *Guinea Pig* / V.B. Kraus, [et al.] // *Osteoarthritis Cartil.* – 2010. – Vol. 18, № 3. – P. 35-52.

162. The role of cyclooxygenase-2, interleukin-1 β and fibroblast growth factor-2 in the activation of matrix metalloproteinase-1 in sheared-chondrocytes and articular cartilage / P.-P. Guan [et al.] // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – e10412.

163. The role of the synovium in repairing cartilage defects / A. Miyamoto [et al.] // *Knee Surg. Sports. Traumatol. Arthrosc.* – 2007 – 15 - P. 1083-1093

164. The single-molecule mechanics of the latent TGF- β 1 complex / L. Buscemi [et al.] // *Curr Biol.* – 2011. – Vol 21, № 24. – P. 2046–2054.

165. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review / A. Goldberg [et al.] // *J Orthop Surg Res.* – 2017. – № 12. – P. 39.

166. Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis / Bannuru R.R. [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 61. – P. 1704-1711.

167. Tiku M.L. Cartilage regeneration for treatment of osteoarthritis: a paradigm for nonsurgical intervention. / M.L. Tiku, H.E. Sabaawy // *Ther. Adv. Musculoskelet Dis.* – 2015. – Vol. 7 № 3. – P. 76–87.

168. Toll-like receptors and chondrocytes: the lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7 / K. Bobacz, [et al.] // *Arthritis & Rheumatism.* – 2007. – Vol. 56, № 6. – P. 1880–1893.

169. Transthyretin deposition in articular cartilage: a novel mechanism in the pathogenesis of osteoarthritis / Y. Akasaki [et al.] // *Arthritis Rheumatol.* – 2015. – Vol. 67 № 8. – P. 2097–2107.

170. Treatment of persistent shoulder pain with sodium hyaluronate: a randomized, controlled trial. A multicenter study / T. Blaine [et al.] // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 2008. – Vol. 90, №5. – P. 970–979.

171. Trigkilidas D. The effectiveness of hyaluronic acid intra-articular injections in managing osteoarthritic knee pain / D. Trigkilidas, A. Anand // *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* – 2013. – Vol. 95, №8. – P. 545-551.

172. Varki A. Essentials of Glycobiology. / A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko // Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2009. – №2. – Chapter 25.

173. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis / A.W. Rutjes [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 2012. – Vol. 157. – P. 180–191.

174. Wang J. Mechanomics: an emerging field between biology and biomechanics / J. Wang et al. // *Protein Cell*. – 2014. – V. 5. № 7. – P. 518–31.

175. Wang P. Prostaglandin E₂ induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- κ B activation / P. Wang, F. Zhu, K. Konstantopoulos // *Cell Physiol*. – 2010. Vol. 298, № 6. – P. 1445–1456.

176. Wei L. Comparison of differential biomarkers of osteoarthritis with and without posttraumatic injury in the Hartley guinea pig model / L. Wei [et al.] // *J. Orthop. Res*. – 2010. – Vol. 28. – P. 900-906.

177. Y. H. An *A Handbook of histology methods for bone and cartilage* / Y. H. An, K. L. Martin (eds.). – N.Y. : Humana Press. – 2003. – 587 p.

178. Z. Zhuang Kaempferol alleviates the Interleukin-1 β -Induced Inflammation in Rat Osteoarthritis Chondrocytes via Suppression of NF- κ B // Z. Zhengling, Y. Guangqun, H. Bin // *Med Sci Monit*. – 2017. – № 23. – P: 3925–3931.

179. Characterization and localization of citrullinated proteoglycan aggrecan in human articular cartilage / T. T. Glant, [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol 1 № 3. – e0150784.

180. Zhen G. Targeting TGF β signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis / G. Zhen, X. Cao // *Trends Pharmacol Sci*. – 2014 – Vol. 35, №. 5. – P. 227–236.

181. Zohreh I. strategic design and fabrication of engineered scaffolds for articular cartilage repair. / I. Zohreh, C. Xiongbiao, K. William // *J. Funct.Biomater*. – 2012. – Vol. 3 № 4. – P. 799–838.

182. β -catenin, cartilage, and osteoarthritis / Q. Wu, [et al.] // Ann. N.-Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1192, №. 1. – P. 344–350.