

Гістопатологія, морфометричні показники кісток, суглобового та епіфізарного хрящів при глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії в експерименті

В. В. Григоровський¹, А. В. Калашников¹, Є. Л. Кузів², Л. І. Апуховська³

¹ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», м. Київ, ²Військово-медичний клінічний центр Центрального регіону, м. Вінниця, Україна, ³Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, м. Київ

Ключові слова:
глюкокортикоїди,
суглобовий хрящ,
епіфізарний хрящ,
експеримент,
вітамін D, вітамін E.

Патологія. – 2018. –
Т. 15, № 2(43). –
С. 128–135

DOI:
10.14739/2310-1237.
2018.2.141415

E-mail:
va_grigorov@bigmir.net

Мета роботи – визначити параметри впливу вітамінів D та E на зміни показників структурно-функціонального стану суглобового (СХ) та епіфізарного (ЕХ) хрящів при глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії (ГІОХП) в експерименті.

Матеріали та методи. Серії (по 7 щурів): 1) інтактні; 2) преднізолон у дозі 5,0 мг/кг перорально щоденно; 3) преднізолон у поєднанні з вітаміном D 100 МО; 4) преднізолон у поєднанні з вітаміном D 100 МО та вітаміном E 0,6 мг. Тривалість спостереження – 30 діб. Показники: маса великогомілкової кістки, довжина та товщина стегнової кістки, товщина проксимальних СХ та ЕХ стегнової кістки на фронтальному зрізі, питома кількість хондроцитів (ХЦ) на одиницю площі зрізу, число великих ділянок хрящового матриксу в зрізах СХ та ЕХ.

Результати. Товщина СХ за ГІОХП знижується, а в умовах превентивного введення вітамінів D та E має тенденцію до нормалізації, хоча і не досягає значень серії інтактних тварин. Питома кількість ХЦ на одиницю площі зрізу та кількість великих ділянок матриксу за ГІОХП зростає. В серіях, де вводили вітамін D, спостерігали тенденцію до зниження параметрів обох показників; а в серії, де вводили обидва вітаміни, кількість великих ділянок матриксу залишається понаднормовою. Товщина ЕХ за ГІОХП знижується, незважаючи на превентивне застосування вітамінів. При ГІОХП збільшується також питома кількість ХЦ на одиницю площі ЕХ і кількість великих ділянок матриксу, проте в серії, де превентивно застосовували вітаміни D та E, визначена тенденція до нормалізації середніх параметрів цих показників. Це свідчить про стійкий характер впливу глюкокортикоїдів на хондроцити ЕХ та остеобласти зони окостеніння метафіза.

Висновки. Превентивне введення вітамінів D та E під час моделювання ГІОХП призводить до відновлення (або наближення до параметрів інтактних тварин) рівня більшості остеометричних показників, а також вносить позитивні зміни в гістоморфометричні показники СХ та ЕХ проксимального епіметафіза стегнової кістки.

Ключевые слова:
глюкокортикоиды,
суставной
хрящ, эпифизы,
эксперимент,
витамин D,
витамин E.

Патология. – 2018. –
Т. 15, № 2(43). –
С. 128–135

Гістопатологія, морфометричні показники кісток, суглобового та епіфізарного хрящів при глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії в експерименті

В. В. Григоровський, А. В. Калашников, Є. Л. Кузів, Л. І. Апуховська

Цель работы – определить параметры воздействия витаминов D и E на изменения показателей структурно-функционального состояния суставного (СХ) и эпифизарного (ЭХ) хрящей при глюкокортикоид-индуцированной остеохондропатии (ГИОХП) в эксперименте.

Материалы и методы. Серии (по 7 крыс): 1) интактные; 2) преднизолон в дозе 5,0 мг/кг перорально ежедневно; 3) преднизолон в сочетании с витамином D 100 МЕ; 4) преднизолон в сочетании с витамином D 100 МЕ и витамином E 0,6 мг. Длительность наблюдения – 30 суток. Показатели: масса большеберцовой кости, длина и толщина бедренной кости, толщина проксимальных СХ и ЭХ бедренной кости на фронтальном срезе, удельное количество хондроцитов (ХЦ) на единицу площади среза, число крупных участков хрящевого матрикса в срезах СХ и ЭХ.

Результаты. Толщина СХ при ГІОХП снижается, а в условиях превентивного введения витаминов D и E имеет тенденцию к нормализации, хотя и не достигает значений серии интактных животных. Удельное количество ХЦ на единицу площади среза и количество крупных участков матрикса при ГІОХП возрастает. В сериях, где вводили витамин D, отмечена тенденция к снижению параметров обоих показателей, а в серии, где вводили оба витамина, количество крупных участков матрикса остается выше, чем у интактных (норма). Толщина ЭХ при ГІОХП снижается, несмотря на превентивное применение витаминов. При ГІОХП увеличивается также удельное количество ХЦ на единицу площади ЭХ и количество крупных участков матрикса, однако в серии, где превентивно применяли витамины D и E, отмечена тенденция к нормализации средних параметров этих показателей. Это свидетельствует об устойчивом характере влияния глюкокортикоидов на хондроциты ЭХ и остеобласты зоны окостенения метафіза.

Выводы. Превентивное введение витаминов D и E при моделировании ГІОХП приводит к восстановлению (или приближению к параметрам интактных животных) уровня большинства остеометрических показателей, а также вносит положительные изменения в гистоморфометрические показатели СХ и ЭХ проксимального эпиметафіза бедренной кости.

Key words:
glucocorticoids,
articular cartilage,
epiphyses,
experiment,
vitamin D,
vitamin E.

Histopathology, morphometric indices of bones, articular and epiphyseal cartilages in experimental glucocorticoid-induced osteochondropathy

V. V. Hryhorovskiy, A. V. Kalashnykov, Ye. L. Kuziv, L. I. Apukhovska

Research objective – to define parameters of vitamins D and E influence on changes of articular (AC) and epiphyseal (EC) cartilage structural-functional condition indices in glucocorticoid-induced osteochondropathy (GIOCP) in experiment.

Materials and methods. Series (7 rats each): 1) intact; 2) prednisolone in a dose of 5,0 mg/kg per os daily; 3) prednisolone in combination with vitamin D 100 IU; 4) prednisolone in combination with vitamin D 100 IU and vitamin E of 0,6 mg. Observation during 30 days. Indicators: weight of tibia, length and thickness of femur, thickness of proximal femoral AC and EC on a frontal tissue section, specific chondrocyte (ChC) number per unit of the section area, number of large places of cartilage matrix in sections of AC and EC.

Results. The thickness of AC in GIOCP decreases, and in the conditions of vitamins D and E preventive administration tends to normalization though does not reach values of intact animals series. Specific ChC quantity per section area unit and large places of matrix quantity in GIOCP increase; in series where vitamin D was administrated, the tendency to decrease of parameters of both indices was observed, and in a series where both vitamins were administrated, the number of large places of matrix nevertheless remains above, than norm.

The thickness of EC at GIOCP decreases, despite preventive application of vitamins. In GIOCP specific ChC quantity per unit of EC area and large places of matrix number increase, however in series where both vitamins D and E were preventively applied, the tendency to normalization of mean parameters of these indicators is observed. It gives evidence of steady character of glucocorticoid influence on EC chondrocytes and metaphyseal zone of ossification osteoblasts.

Conclusions. Preventive administration of vitamins D and E during GIOCP-modelling leads to restoration (or to intact animals parameters approximation) of the majority of osteometric indices level, and also introduces positive changes in AC and EC of proximal femoral epimetaphysis histomorphometric indicators.

Терапія глюкокортикоїдами (ГК) широко застосовується фахівцями медичних спеціальностей: ревматологами, дерматологами, ендокринологами, ортопедами тощо. Певні схеми лікування з використанням ГК мають показання і в дитячих контингентах хворих. Багато захворювань передбачають уведення в організм ГК як засобів місцевої дії, а також для системного впливу.

Незважаючи на позитивну дію цих лікарських засобів, відомі їхні побічні ефекти, серед яких важливе місце посідає глюкокортикоїд-індукований остеопороз (ГІО), прямий та опосередкований вплив на хрящі кісток. Ці дані одержали як у клінічних, так і в експериментальних дослідженнях [1–4]. У деяких рандомізованих клінічних випробуваннях за допомогою клінічних і візуалізаційних методів, зокрема МРТ, встановлено, що ГК при внутрішньосуглобовому введенні триамсінолону з приводу остеоартриту (ОА) призводить до зменшення об'єму (товщини) суглобового хряща (СХ), тобто ймовірно є розвиток дистрофічних і некротичних змін у його тканині [5,6]. В експериментальних дослідженнях показано особливості системної дії ГК на кісткові та хрящові структури довгих кісток [1,2,4]. Проте, на наш погляд, доказові можливості морфометричного методу під час аналізу результатів цих досліджень використані недостатньо, хоча дані цих робіт дають підстави позначати патологічні зміни в кістковій і хрящовій тканині як глюкокортикоїд-індуковану остеохондропатію (ГІОХП).

Для запобігання побічному впливу ГК на кісткові та хрящові структури як при внутрішньосуглобовому, так і при системному введенні ГК у клініці вже тривалий час застосовують препарати вітаміну D. Втім результати рандомізованих клінічних випробувань (РКВ) і деяких систематичних оглядів щодо клінічного ефекту вітаміну D є неоднозначними [7–11]. Результати превентивного впливу вітаміну D на суглобовий (СХ) та епіфізарний (ЕХ) хрящі в експерименті не завжди дають можливість об'єктивно оцінити зміни, що відбуваються у СХ та ЕХ, а також порівняти їх у різновидах гіалінового хряща певної локалізації в кістці.

Відомо, що вітамін Е – це універсальний протектор клітинних мембран від окисного пошкодження. Він перешкоджає впливу кисню на ненасичені ліпіди мембран, запобігаючи їх деструкції. Його молекула

може безпосередньо взаємодіяти з вільними радикалами кисню, ненасичених жирних кислот і перекисами. Крім того, він здійснює стабілізацію мембран, оскільки запобігає окисленню SH-груп мембранних білків [12]. Одержано дані про дозозалежний вплив вітаміну Е на обмін вітаміну D₃, що опосередковується ступенем забезпечення організму холекальциферолом [13], але досі не вивчили превентивний вплив поєданого застосування вітамінів D та Е на клітини, тканини органів опорно-рухового апарату, зокрема на СХ та ЕХ в умовах моделювання ГІОХП.

Мета роботи

На основі низки остеометричних і гістоморфометричних досліджень визначити параметри впливу вітамінів D та Е на зміни показників структурно-функціонального стану суглобового та епіфізарного хрящів при глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії в експерименті.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на 28 щурах-самцях лінійної породи Вістар віком 2 місяці. Тварин утримували відповідно до «Санітарних правил створення, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)» від 06.04.1973 р. і доповнень від 04.12.1978 р. до наказу МОЗ СРСР № 163 від 10.03.1966 р. «Про добові норми харчування тварин та продуценти». Під час дослідження керувалися «Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальними та іншими науковими цілями».

Уведення в організм тварин діючих речовин (розчин преднізолону, вітаміни D та Е, фізрозчин) здійснювали щоденно перорально за допомогою зонда з оливою.

Експериментальних тварин поділили на 4 дослідні серії по 7 щурів у кожній, термін спостереження від включення в експеримент до виводу з нього становив 30 діб:

– (I) Інтактні тварини – щоденно вводили по 0,5 мл 0,9 % розчину хлориду натрію.

– (II) Глюкокортикоїд-індукована остеохондропатія – щурам вводили по 0,5 мл розчину преднізолону в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла.

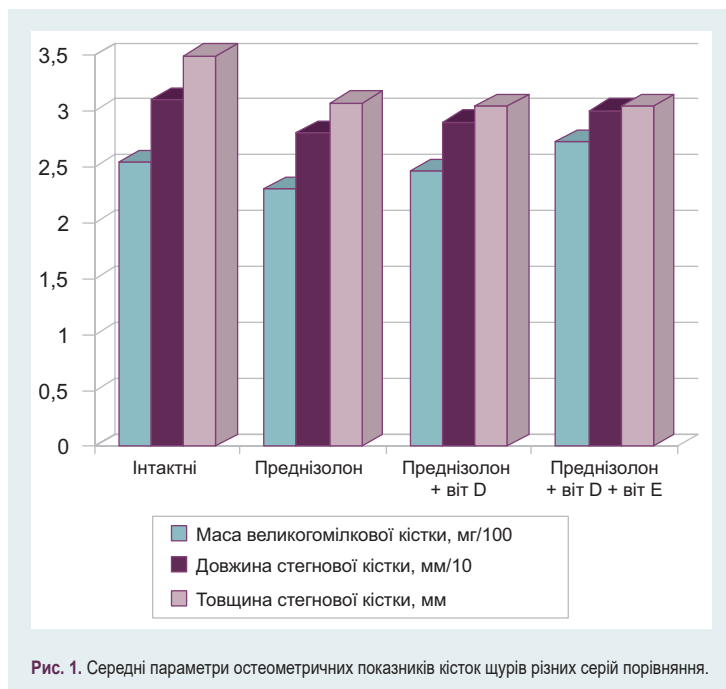


Рис. 1. Середні параметри остеометричних показників кісток щурів різних серій порівняння.

– (III) Глюкокортикоїд-індукована остеохондропатія на тлі застосування препарату вітаміну D – крім розчину преднізолону щурам вводили 100 МО вітаміну D₃ (виробник Medana Pharma, Польща).

– (IV) Глюкокортикоїд-індукована остеохондропатія на тлі застосування препаратів вітамінів D та E – крім розчину преднізолону щурам вводили 100 МО вітаміну D₃ та 0,726 МО (0,6 мг) вітаміну E (виробник ПАТ «Київський вітамінний завод», Україна).

У термін завершення експерименту тварин зважували та виводили з досліду шляхом передозування ефіру для наркозу, після чого здійснили забір матеріалу для морфологічних досліджень.

Остеометричні вимірювання виконали на видалених і звільнених від м'яких тканин кістках. Визначали масу великогомілкової кістки на аналітичних терезах, довжину стегнової кістки між верхнім полюсом голівки та найбільш дистальною точкою суглобової поверхні медіального виростка та товщину стегнової кістки в середній третині діяфіза – з допомогою штангенциркуля з точністю до 0,1 мм. Стегнові кістки фіксували в 10 % формаліні, виконували декальцинацію 5 % азотною кислотою, проводили у спиртах і заливали в целоїдин, одержували зрізи завтовшки 10 мкм, які фарбували гематоксиліном та еозином, гематоксиліном і пікрофуксином за Ван Гізоном. Гістологічні дослідження виконали на мікроскопах МБС-2 та Olympus CX-41, мікрофотографії робили фотоапаратом Nikon D90, закріпленим на тубусі мікроскопа.

З-поміж гістоморфометричних показників, котрі характеризують кількісні особливості хрящів проксимального епіметафіза стегнових кісток щурів, досліджували:

– товщину СХ та ЕХ голівки стегнової кістки у найбільш проксимально розташованих ділянках хрящів поблизу місця приєднання зв'язки голівки стегнової кістки, у мм;

– питому кількість хондроцитів (ХЦ) на одиницю площі зрізу хрящів у тестовому вікні, число клітин/мм².

Тестову ділянку у СХ та ЕХ завжди вибирали в найбільш проксимальній частині на фронтальному зрізі проксимального кінця стегна;

– кількість великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу (великих ділянок матриксу) у зрізах СХ та ЕХ. У зрізах хрящів підраховували число великих ділянок матриксу, що не містили ХЦ.

Одержані параметри остеометричних і гістоморфометричних показників піддавали статистичному опрацюванню, розраховуючи середні величини та параметри варіації (стандартні відхилення та помилки). Міжгрупові відмінності середніх величин оцінювали з розрахунком параметрів t-тесту Стьюдента. Для статистичного опрацювання кількісних даних використали програми Statistica, v. 7,0, програму калькулятора МК-52 [14].

Результати

Остеометричні показники. Середній параметр маси великогомілкової кістки (рис. 1) у щурів, яким вводили преднізолон (II серія), вірогідно знижувався порівняно із середнім значенням цього показника інтактних тварин (I) ($p < 0,001$). У серії, де разом із преднізолоном вводили препарат вітаміну D (III), середній параметр маси наближався до параметра інтактних (різниця не вірогідна), а в серії, де крім преднізолону вводили разом вітаміни D та E (IV), вірогідно перевищував середнє значення серій як тих, де застосовували тільки преднізолон (II), так і інтактних (I) ($p < 0,001$). Подібну динаміку виявляли середні параметри довжини стегнової кістки, хоча в обох серіях, де вводили преднізолон на тлі застосування вітамінів D та E (III, IV), середня довжина стегнової кістки залишалася вірогідно меншою, ніж в інтактних тварин (I) ($p < 0,001$). Середні значення товщини стегнової кістки в усіх серіях, де тваринам вводили преднізолон (II, III, IV), незважаючи на додавання препаратів вітамінів D та E, залишалися вірогідно нижчими від параметрів інтактних (I) ($p < 0,001$).

Морфологічні особливості СХ голівки стегнової кістки в серіях порівняння. Центр окостеніння епіфіза голівки стегнової кістки на фронтальному розрізі мав серпоподібну форму і складався переважно з коротких і товстих кісткових перекладок (рис. 2).

В інтактних щурів у СХ добре виражені ХЦ усіх трьох зон (поверхневої, проміжної, глибокої), хоча чітких анатомічних меж не існує (рис. 3). У тварин серії, де вводили преднізолон (II), часто спостерігали потоншення СХ у найбільш проксимально розташованих ділянках голівки (рис. 4). Питома кількість ХЦ на одиницю площі у хрящовій тканині СХ дещо збільшувалася внаслідок переважання дрібних ХЦ (рис. 5). Особливістю СХ голівки стегнової кістки щурів є наявність ділянок хрящового матриксу, які не містять ХЦ; ці ділянки сумірні з кластерами ХЦ або дещо більшого розміру (рис. 6).

Морфологічні особливості ЕХ проксимального епіметафіза стегнової кістки в серіях порівняння. На гістологічних зрізах проксимального епіметафіза стегнової кістки ЕХ мав форму дуги, що вигином спрямована проксимально, й утворював прошарок між губчастою кісткою епіфіза і зоною окостеніння метафіза, що має особливу будову, пов'язану з її функцією (рис. 7).



Рис. 2. Загальний вигляд голівки стегнової кістки щура. Добре збережені СХ та ЕХ. Губчаста кістка епіфіза має серпоподібну форму. Стрілкою позначено ділянку, де проводили вимірювання показників СХ. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини із серії інтактних (I). Забарвлення гематоксилином та пікрофуксином за ван Гізеном, збільшення $\times 20$.

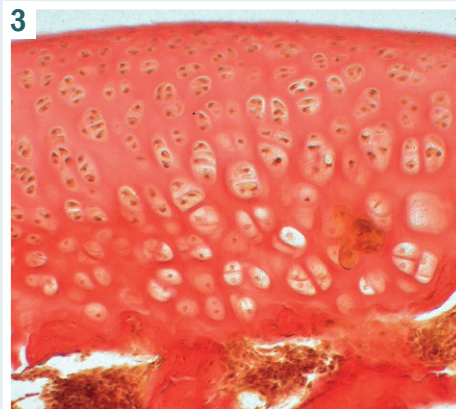


Рис. 3. Суглобова поверхня голівки стегнової кістки. Відносно товстий СХ. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини із серії інтактних (I). Забарвлення гематоксилином та пікрофуксином за ван Гізеном, збільшення $\times 150$.

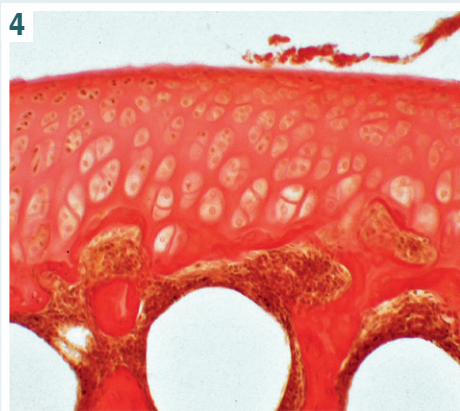


Рис. 4. СХ зменшеної товщини, що покриває поверхню голівки стегнової кістки. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини, серія з уведенням преднізолону (II). Забарвлення гематоксилином та пікрофуксином за ван Гізеном, збільшення $\times 150$.

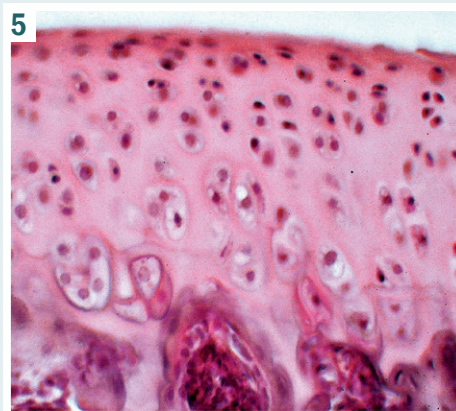


Рис. 5. Ділянка СХ з підвищеною питомою кількістю хондроцитів на одиницю площі зрізу тканини хряща. Збільшена кількість дрібних ХЦ у проміжній зоні СХ. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини, серія з уведенням преднізолону (II). Забарвлення гематоксилином та еозином, збільшення $\times 300$.



Рис. 6. Підвищена кількість великих ділянок хрящового матриксу (позначені стрілками) у проміжній та глибокій зонах СХ. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини, серія з уведенням преднізолону (II). Забарвлення гематоксилином та еозином, збільшення $\times 150$.

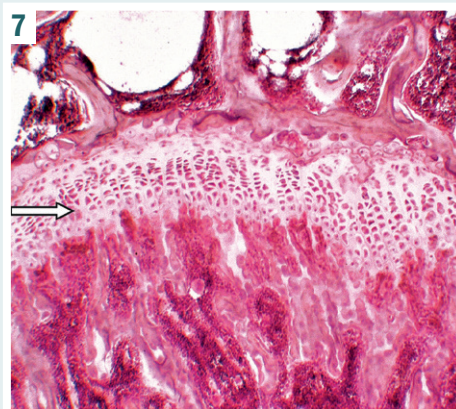


Рис. 7. Загальний вигляд проксимальної зони росту стегнової кістки. Над ЕХ – губчаста кістка епіфіза, знизу – зона окостеніння метафіза, між ними – епіфізарний хрящ (позначений стрілкою). Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини із серії інтактних (I). Забарвлення гематоксилином та еозином, збільшення $\times 75$.

До метафізарного боку ЕХ прилягає комплекс видовжених, орієнтованих паралельно осі кістки первинних кістково-хрящових перекладок, які є складовою частиною зони окостеніння метафіза. У тварин, які одержували преднізолон без або в поєднанні з вітамінами (II, III, IV серії), спостерігали певне потоншення ЕХ (рис. 8), а також збільшення питомої кількості ХЦ на одиницю площі зрізу (рис. 9), самі ж первинні кісткові перекладки виглядали коротшими (рис. 10), ніж у тварин серії норми (I). Збільшувалася також кількість великих ділянок матриксу у зрізах тканини ЕХ, загальне число яких однак було меншим, ніж великих ділянок матриксу у СХ (рис. 11).

Гістоморфометричні показники СХ у серіях порівняння. Середні значення товщини СХ у всіх серіях,

де щурам вводили преднізолон (II, III, IV) (рис. 12), виявилися нижчими за параметр цього показника в інтактних тварин (I) ($p > 0,05$), хоча виявили тенденцію до зростання в серіях, де тварини одержували вітаміни. Питома кількість ХЦ на одиницю площі зрізу в серії тварин, які одержували преднізолон (II), збільшувалось порівняно з інтактними (I). У серіях щурів, які одержували препарати вітамінів (III, IV), середні параметри цього показника знижувались та мали тенденцію до нормалізації, але залишалися вищими за параметр інтактних (I). Середня кількість великих ділянок матриксу у тканині СХ тварин серії, де вводили преднізолон (II), незначно зменшувалася порівняно з інтактними (I). У серії тварин, які крім преднізолону одержували вітамін D (III), вірогідно зменшувалась ($p < 0,01$), а в серії, де крім преднізолону

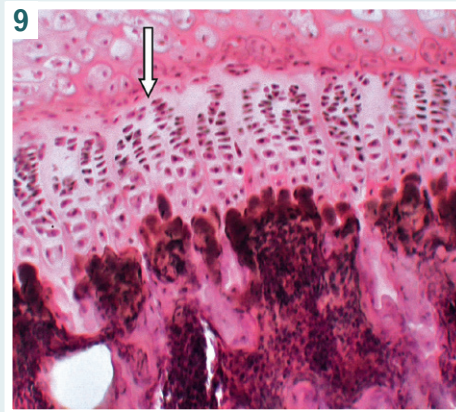
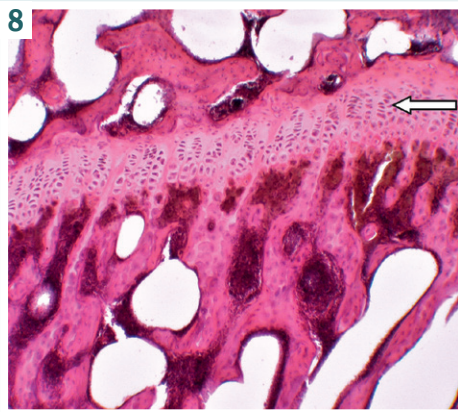


Рис. 8. Зменшення товщини ЕХ. Епіфізарний хрящ позначено стрілкою. Гістопрепарат проксимального епіфіза стегнової кістки тварини із серії з уведенням преднізолону та вітаміну D (III). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 75$.

Рис. 9. Збільшення питомої кількості хондроцитів (ділянка позначена стрілкою) на одиницю площі зрізу тканини ЕХ. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини, серія з уведенням преднізолону (II). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 150$.

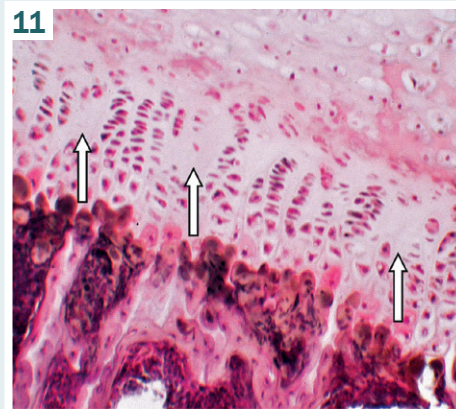
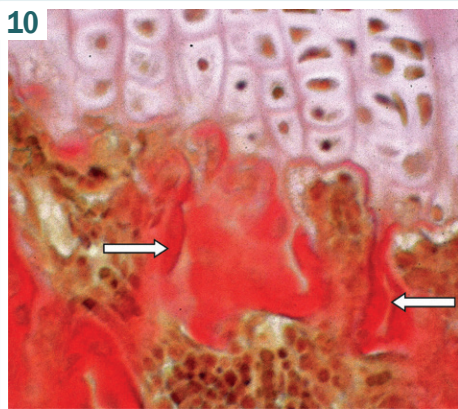


Рис. 10. Вкорочення первинних кісткових перекладок в зоні окостеніння метафіза (позначено стрілками). Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини, серія з уведенням преднізолону (II). Забарвлення гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гізоном, загальне збільшення $\times 150$.

Рис. 11. Підвищена кількість великих ділянок хрящового матриксу (позначені стрілками) в епіфізарному хрящі. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини, серія з уведенням преднізолону (II). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 150$.

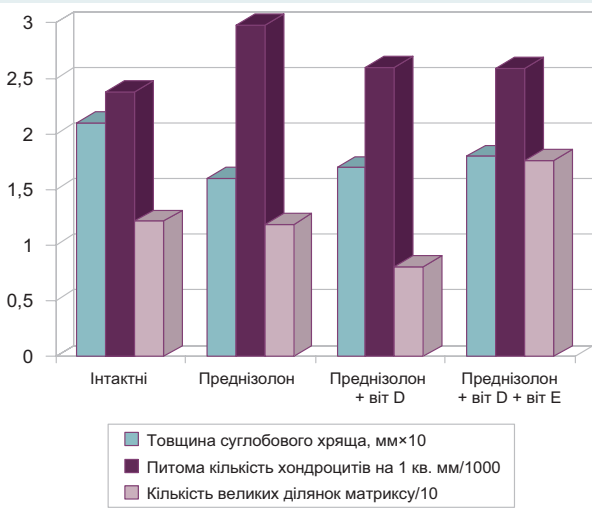


Рис. 12. Середні параметри гістоморфометричних показників суглобового хряща щурів різних серій порівняння.

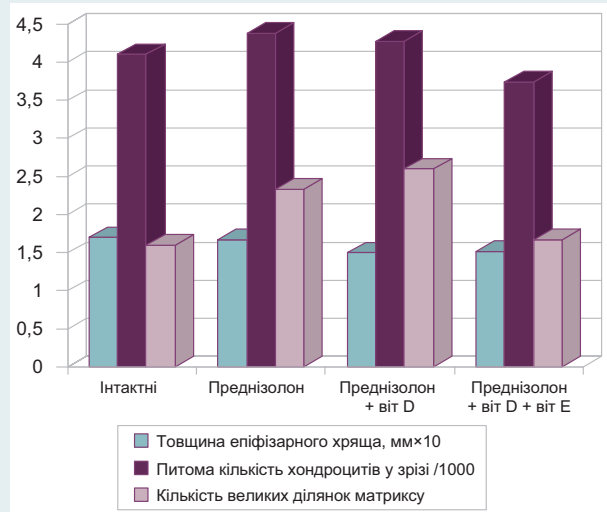


Рис. 13. Середні параметри гістоморфометричних показників епіфізарного хряща щурів різних серій порівняння.

вводили обидва препарати вітамінів (D та E) (III, IV), суттєво зростала, перевищуючи параметри всіх інших серій (різниця середніх між серіями IV та III вірогідна ($p < 0,001$), а також між серіями IV та II ($p < 0,002$)).

Гістоморфометричні показники ЕХ у серіях порівняння. Товщина ЕХ у серіях, де щури отримували тільки преднізолон (II серія) або преднізолон разом з вітамінами (III, IV) (рис. 13), була дещо зменшена. Пи-

тома кількість ХЦ на одиницю площі зрізу в серіях, де щурам вводили тільки преднізолон (II) або преднізолон у поєднанні з вітаміном D (III), була збільшена, тільки в серії, де крім преднізолону вводили вітаміни D та E (IV), виявилася нижчою від параметра групи інтактних тварин (I). Середній параметр кількості великих ділянок матриксу у зрізах тканини ЕХ серії тварин, де вводили преднізолон, збільшувався. Застосування тільки віта-

міну D (III) не призводило до нормалізації параметра, яке досягалося лише в серії тварин, де поєднували введення вітамінів D та E (IV). Усі відмінності середніх параметрів відзначених показників між окремими серіями були статистично не вірогідними за наявної кількості випадків.

Обговорення

Публікації останніх років свідчать про неоднозначність результатів лікувального впливу ГК на хрящові структури залежно від показань (нозології або синдрому), типу введення в організм (локальне, системне), дози та тривалості застосування певного лікарського засобу. Розглянемо окремо відомості про вплив ГК на суглобовий та епіфізарний хрящі.

Ефекти та механізми впливу ГК на структури СХ. Більшість досліджень присвячена вивченню дії ГК при локальному введенні як у клінічних спостереженнях на пацієнтах, так і в експерименті на тваринах, зокрема відзначається позитивний вплив на симптоми ураження суглоба при ОА у низьких дозах препарату та несприятливий вплив при використанні високих доз ГК [5,6,15,16]. Щодо впливу безпосередньо на експлантовані ХЦ *in vivo*, результати неоднозначні. В одному дослідженні виявлено, що попередня або наступна обробка дексаметазоном зменшувала втрату компонентів хрящового матриксу та посилювала синтез протеогліканів у хрящових експлантатах, підданих поєднаному впливу механічної травми, TNF- α і співвідношення IL-6/рецептор [16]. В іншому дослідженні цитотоксичність ГК щодо ХЦ визначили вже при дозах, часто використовуваних у ветеринарній практиці, хоча *in vitro* максимальний протизапальний ефект досягнуто при концентраціях, які нижчі від рекомендованих виробником препарату [17].

Ефекти та механізми впливу ГК на структури ЕХ. ГІОХП характеризується різноманітними проявами, оскільки ГК виявляють вплив на клітинні рецептори у клітинах різних диферонів. Мішенями ГК-впливу є ХЦ поверхневої зони СХ, ХЦ зони збереженого хряща ЕХ та остеообласті зони окостеніння губчастості кістки метафіза [2–4]. Так, остеометричне дослідження стегнових кісток щурів показало, що пероральне введення преднізолону в дозі 0,5 мг/100 г маси призвело до зменшення параметрів показників, що показує затримку росту кістки як органа [4,18]. В ЕХ щурів виявлено нерівномірне забарвлення матриксу, зменшення числа клітин у колонках, наявність безклітинних ділянок [4]. Під час електронно-мікроскопічного дослідження в деяких ХЦ щурів знайдено осередки деструкції в цитоплазмі, протягом поляризаційно-мікроскопічного дослідження – зменшення інтенсивності рефракції у міжклітинній речовині ЕХ. Морфометричний аналіз дав змогу встановити, що зменшувалась ширина всіх зон ЕХ: збереженого хряща, проліферації, гіпертрофії, – це зменшення більше стосувалося тварин молодшого віку [2].

Дослідження клітин ЕХ в органних культурах і на тваринах *in vivo* показали, що ГК мають прямий інгібуючий ефект на ХЦ ЕХ: вони сповільнюють ріст кістки у довжину через гальмування проліферації, гіпертрофії ХЦ та синтезу хрящового матриксу [19].

В експерименті на поросятах виявлено, що у тварин, які одержували преднізолон, загальна ширина ЕХ у зрізах зменшувалась до 81 % від параметра контролю, насамперед у зв'язку зі зниженням ширини проліферативної зони. Збільшувалась також частка ХЦ, що перебували у стані апоптозу (40,5 % замість 5,8 %), а апоптотичні клітини з'являлися вище в зоні гіпертрофованих клітин. У преднізолон-лікованих тварин у цій зоні ЕХ не визначено VEGF. Відповідно, в зоні окостеніння метафіза визначали зменшення кількості капілярів, втрату їх довжини та паралельності, була знижена також довжина первинних кісткових перекладок метафіза [1]. Подібні гістологічні зміни (потоншення ЕХ, збільшення числа великих ділянок матриксу) спостерігали і в нашому матеріалі.

Вплив вітаміну D на СХ та ЕХ при деяких захворюваннях органів опорно-рухового апарату, зокрема в умовах превентивної дії при ГІОХП. У дослідженнях, де вивчали вплив додавання вітаміну D до комплексу терапії ОА, одержані неоднозначні результати. Якщо в одних роботах вірогідну різницю за показниками стану СХ не визначили [8] або вплив на динаміку симптомів був вибіркоким, переважно знімаючи біль і порушення функції суглобів, проте власне на патологічні зміни СХ рівень вітаміну D крові не впливав [9,11], то в інших дослідженнях встановили зв'язок прогресування ознак ОА колінного суглоба та низького рівня вітаміну D крові [7,10].

У роботі, що присвячена вивченню участі вітаміну D у процесах регуляції клітинної проліферації ЕХ, показано: є специфічні мембрано-асоційовані шляхи передачі сигналів, які медіують обидві – швидкі не-геномну і геномну відповіді ХЦ зони збереженого хряща ЕХ – на дію вітаміну D. Останній із високою специфічністю з'єднується з мембраною ХЦ, що має результатом зростання активності протеїн-кінази С та продукцію нових матриксних пухирців (везикул) [20].

В одній із попередніх робіт у групі тварин, яким поряд з уведенням преднізолону застосовували вітамін D, структурно-функціональна організація СХ голівки стегнової кістки наближалася до такої в інтактних тварин, та основною ознакою стану СХ тварин цієї серії (ГК + вітамін D) була активізація проліферації хондроцитів у поверхневій зоні. Результати дослідження виявили ознаки відновлення ендохондріального окостеніння у метафізі, яке відбувалося менш інтенсивно порівняно з серією інтактних тварин, про що може свідчити довжина первинних перекладок метафіза [4]. Одержані в цьому дослідженні дані морфометричних показників СХ та ЕХ встановили зміни, що характеризують кількісні особливості впливу ГК в умовах окремо взятого та поєданого превентивного застосування вітамінів D та E.

Пояснення особливостей патологічних змін у СХ та ЕХ в умовах здійсненого експерименту можливе лише враховуючи особливості клітинної динаміки та патологічні зміни ХЦ (проліферації, дозрівання, дистрофії та некрозу ХЦ), а також топографію структур, що відповідають за ендохондріальний остеогенез [1,3,19]. У СХ ХЦ, що піддаються розмноженню, локалізуються в поверхневій зоні хряща, тому можна передбачити, що вплив преднізолону на незрілі клітини залежить від ГК, що перейшов із крові в синовіальне середовище. В ЕХ

зона збереженого хряща прилягає до губчастої кістки епіфіза, і проліферація ХЦ, хоча й опосередковано, залежить від впливів із боку кровопостачання епіфіза. Імовірно, характеристики впливів ГК і ГК у поєднанні з вітамінами D та E на процес проліферації ХЦ СХ і ЕХ можуть бути різними. Суттєво розрізняються параметри показників ендохондріального остеогенезу в губчастій кістковій тканині, що прилягає до СХ, і з боку метафіза – до ЕХ, в останньому випадку є унікальною за інтенсивністю. Кровопостачання в цій ділянці кістки є також інтенсивним. Імовірно, що при ГІОХП об'єктом максимального впливу на глюкокортикоїдні рецептори ядер клітин стають саме молоді остеобласти, що інтенсивно проліферують [18].

Отже, якщо в СХ товщина зменшується через вплив на ХЦ поверхневої зони, а гальмування остеогенезу при цьому має менше значення, і товщина СХ під впливом превентивної дії вітамінів виявляє тенденцію до наближення до середніх значень інтактних тварин, то на товщину ЕХ вплив преднізолону позначається як внаслідок дії на остеобласти первинних перекладок метафіза, тобто товщина ЕХ в цих умовах є результатом двох процесів.

Вплив застосування вітаміну D окремо та поєднання вітамінів D та E на хрящові структури стегнової кістки виявився неоднозначним. Якщо в умовах моделювання ГІОХП такі остеометричні показники, як маса великогомілкової кістки та довжина стегнової кістки виявляли тенденцію до нормалізації, то товщина стегнової кістки реагувала слабше. У попередньому дослідженні встановлено, що площа перетину компактної кістки діафіза, знижена внаслідок ГІОХП, в умовах дії вітаміну D та D + E має виражену тенденцію до нормалізації [18].

Висновки

1. Пероральне введення ГК (преднізолону) у тварин в період росту в дозі 0,5 мг/100 г маси чинить характерний вплив на структури довгої кістки, зокрема анатомічні утворення проксимального кінця стегнової кістки – суглобовий і епіфізарний хрящі, а також клітини губчастої кістки метафіза. Сукупність патологічних змін цих тканин доцільно позначати як глюкокортикоїд-індуковану остеохондропатію (ГІОХП).

2. Моделювання ГІОХП в експерименті на щурах призводить до зрушень параметрів морфометричних показників, що характеризують структурно-функціональний стан суглобового та епіфізарного хрящів проксимального епіметафіза стегнової кістки.

3. У тварин з ГІОХП виражених змін зазнають остеометричні показники: маса великогомілкової кістки, довжина та товщина стегнової кістки, середні параметри яких зменшуються.

4. З-поміж гістоморфометричних показників у тварин з ГІОХП найбільш вираженим є зменшення товщини СХ і збільшення питомої кількості ХЦ на одиницю площі СХ та ЕХ, збільшення кількості великих ділянок матриксу в тканині ЕХ. Відбувається також незначне зменшення товщини ЕХ.

5. Превентивне застосування вітамінів D та E сприяє відновленню або тенденції до нормалізації значень

більшості остеометричних і гістоморфометричних показників хрящових утворень проксимального кінця стегнової кістки, зокрема найбільш виражений превентивний ефект застосування вітамінів D та E в умовах моделювання ГІОХП має на такі показники, як маса великогомілкової кістки, питома кількість ХЦ СХ і ЕХ на одиницю площі зрізу хряща, кількість великих ділянок матриксу у СХ та ЕХ.

Перспективи подальших досліджень полягають у наступному вивченні превентивної дії вітамінів D та E, що вводяться в організм в різних дозах, у процесі моделювання ГІОХП та впливу цих превентивних доз на динаміку гістоструктур СХ та ЕХ довгої кістки.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Григоровський В. В., д-р мед. наук, професор, лікар-патологоанатом вищої категорії, головний науковий співробітник відділу патоморфології, ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», м. Київ.

Калашников А. В., д-р мед. наук, професор, керівник відділу травматичних ушкоджень та проблем остеогенезу ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», м. Київ.

Кузів Є. Л., лікар ортопед-травматолог, Військово-медичний клінічний центр Центрального регіону, м. Вінниця, Україна.

Апуховська Л. І., канд. біол. наук, старший науковий співробітник, Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, м. Київ.

Сведения об авторах:

Григоровский В. В., д-р мед. наук, профессор, врач-патологоанатом высшей категории, главный научный сотрудник отдела патоморфологии, ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины», г. Киев.

Калашников А. В., д-р мед. наук, профессор, руководитель отдела травматических повреждений и проблем остеогенеза, ГУ «Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины», г. Киев.

Кузев Е. Л., врач ортопед-травматолог, Военный-медицинский клинический центр Центрального региона, г. Винница, Украина.

Апуховская Л. И., канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Институт биохимии имени А. В. Палладина НАН Украины, г. Киев.

Information about authors:

Hryhorovskiy V. V., MD, PhD, DSc, Professor, Doctor-Pathologist of the Highest Category, Principal Scientific Officer of the Pathomorphological Department, SI "Research Institute of Traumatology and Orthopaedics of NAMS of Ukraine", Kyiv.

Kalashnikov A. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Traumatic Injuries and Problems of Osteosynthesis, SI "Research Institute of Traumatology and Orthopaedics of NAMS of Ukraine", Kyiv.

Kuziv Ye. L., MD, Orthopedist-Traumatologist, Military Medical Center of Central Region, Vinnytsia, Ukraine.

Apukhovska L. I., PhD in Biology, Senior Researcher, Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

Надійшла до редакції / Received: 03.07.2018

Після доопрацювання / Revised: 10.08.2018

Прийнято до друку / Accepted: 17.08.2018

Список літератури

- [1] Short-term glucocorticoid treatment of piglets causes changes in growth plate morphology and angiogenesis / J.J. Smink, I.M. Buchholz, N. Hamers, et al. // Osteoarthritis and Cartilage. – 2003. – Vol. 11. – Issue 12. – P. 864–871.

- [2] Батура І.О. Вплив екзогенного гідрокортизону на ріст, будову та егенерацию стегнової кістки щурів різного віку : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня к.біол.н.: 03.00.11 / І.О. Батура. – К., 2008. – 20 с.
- [3] Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy / K. Hartmann, M. Koenen, S. Schauer, et al. // *Physiol Rev.* – 2016. – Vol. 96. – Issue 2. – P. 409–447.
- [4] Калашніков А.В. Морфологічна та морфометрична характеристика змін структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканини при поєднаному введенні вітаміну D3 з преднізолоном / А.В. Калашніков, А.Т. Бруско, Є.Л. Кузів // *Вісник морфології.* – 2017. – Т. 23. – №2. – С. 207–211.
- [5] An intra-articular, extended-release formulation of triamcinolone acetone prolongs and amplifies analgesic effect in patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial / N. Bodick, J. Lufkin, C. Willwerth, et al. // *J. Bone and Joint Surg.* – 2015. – Vol. 97. – Issue 11. – P. 877–88.
- [6] Effect of Intra-articular Triamcinolone vs Saline on Knee Cartilage Volume and Pain in Patients With Knee Osteoarthritis. A Randomized Clinical Trial / T.E. McAlindon, M. LaValley, W.F. Harvey, et al. // *JAMA.* – 2017. – Vol. 317. – Issue 19. – P. 1967–1975.
- [7] Association between serum levels of 25-hydroxyvitamin D and osteoarthritis: a systematic review / Y. Cao, T. Winzenberg, K. Ngo, et al. // *Rheumatology.* – 2013. – Vol. 52. – №7. – P. 1323–34.
- [8] Effect of Vitamin D Supplementation on Tibial Cartilage Volume and Knee Pain Among Patients With Symptomatic Knee Osteoarthritis: A Randomized Clinical Trial / X. Jin, G. Jones, F. Cicuttini, et al. // *JAMA.* – 2016. – Vol. 315. – Issue 10. – P. 1005–13.
- [9] Gao X.R. The effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials / X.R. Gao, Y.S. Chen, W. Deng // *Int. J. Surg.* – 2017. – Issue 46. – P. 14–20.
- [10] Garfinkel R.J. Vitamin D and Its Effects on Articular Cartilage and Osteoarthritis / R.J. Garfinkel, M.F. Dilisio, D.K. Agrawal // *Orthop. J. Sports Med.* – 2017. – Vol. 5. – Issue 6. – 2325967117711376.
- [11] Diao N. Effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials / N. Diao, B. Yang, F. Yu // *Clin. Biochem.* – 2017. – Vol. 50. – Issue 18. – P. 1312–1316.
- [12] Роль вітаміну Е в регуляції гідроксилування хлоркальціоферолу за D–гіповітамінозу та D–гіпервітамінозу / Л.І. Апуховська, М.М. Великий, О.Ю. Лотоцька, А.В. Хоменко // *Український біохімічний журнал.* – 2009. – Т. 81. – №5. – С. 50–57.
- [13] Морозкіна Т.С. Вітаміни / Т.С. Морозкіна, А.Г. Мойсеєнок. – Мінск: Асар, 2002. – С. 66–72.
- [14] Иванов Ю.И. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам / Ю.И. Иванов, О.Н. Погорелюк. – М.: Медицина, 1990. – 219 с.
- [15] Wernecke Ch. The Effect of Intra-articular Corticosteroids on Articular Cartilage. A Systematic Review / Ch. Wernecke, H.J. Braun, J.L. Dragoo // *The Orthopaedic Journal of Sports Medicine.* – 2015. – Vol. 5. – Issue 1–7. – 2325967115581163.
- [16] Lu Yihong C.S. Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines / C.S. Lu Yihong, Ch.H. Evans, A.J. Grodzinsky // *Arthritis Research and Therapy.* – 2011. – Vol. 13. – Issue 5. – R142.
- [17] Zhu Wenyng. Glucocorticoid-induced chondrocyte cytotoxicity at doses recommended for intra-articular therapy in horses / Wenyng Zhu // *Theses and Dissertations–Veterinary Science.* Lexington, Kentucky. – 2015. – Vol. 23. Retrieved from http://uknowledge.uky.edu/gluck_etds/23.
- [18] Григоровський В.В. Показники структурно-функціонального стану губчастої та компактної кістки та їх кореляція за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу в умовах застосування вітамінів D та E / В.В. Григоровський, А.В. Калашніков, Є.Л. Кузів // *Вісник ортопедії, травматології, протезування.* – 2018. – №1. – С. 15–26.
- [19] Lui J.C. Effects of Glucocorticoids on the Growth Plate / J.C. Lui, J. Baron // *Endocr Dev.* – 2011. – Vol. 20. – P. 187–193.
- [20] 24,25-(OH)₂D₃ regulates cartilage and bone via autocrine and endocrine mechanisms / B.D. Boyan, V.L. Sylvania, D.D. Dean, Z. Schwartz // *Steroids.* – 2001. – Vol. 66. – Issue 3–5. – P. 363–374.
- [1] Smink, J. J., Buchholz, I. M., Hamers, N., van Tilburg, C. M., Christis, C., Sakkars, R. J. B., et al. (2003). Short-term glucocorticoid treatment of piglets causes changes in growth plate morphology and angiogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(12), 864–871. doi: 10.1016/S1063-4584(03)00187-0.
- [2] Батура, І. О. (2008) *Вплив екзогенного гідрокортизону на ріст, будову та регенерацію стегнової кістки щурів різного віку* (Автореф. дис. канд. біол. наук). [The Influence of exogenic hydrocortisone on the femoral bone growth, structure and regeneration of the various age rats. (Extended abstract of candidate's thesis). Kyiv. [in Ukrainian].
- [3] Hartmann, K., Koenen, M., Schauer, S., Wittig-Blaich, S., Ahmad, M., Baschant, U., & Tuckermann, J. P. (2016). Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy. *Physiol. Rev.*, 96(2), 409–447. doi: 10.1152/physrev.00011.2015.
- [4] Kalashnikov, A. V., Brusco, A. T., & Kuziv, E. L. (2017). Морфологічна та морфометрична характеристика змін структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканини при поєднаному введенні вітаміну D3 з преднізолоном [Morphological and morphometric characteristics of the structural and functional state of bone and cartilage tissues changes at the common introduction of dynamic vitamin d3 with prednisolone]. *Visnyk morfologii*, 23(2), 207–211. [in Ukrainian].
- [5] Bodick, N., Lufkin, J., Willwerth, C., Kumar, A., Bolognese, J., Schoonmaker, C., Ballal, R., et al. (2015). An intra-articular, extended-release formulation of triamcinolone acetone prolongs and amplifies analgesic effect in patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. *J. Bone and Joint Surg.*, 97(11), 877–888. doi: 10.2106/JBJS.N.00918.
- [6] McAlindon, T. E., LaValley, M., Harvey, W. F., Lori, L. P., Driban, J. B., Zhang, M., & Ward, R. J. (2017). Effect of Intra-articular Triamcinolone vs Saline on Knee Cartilage Volume and Pain in Patients With Knee Osteoarthritis. A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 317(19), 1967–1975. doi: 10.1001/jama.2017.5283.
- [7] Cao, Y., Winzenberg, T., Ngo, K., Lin, J., Jones, G., & Ding, C. (2013). Association between serum levels of 25-hydroxyvitamin D and osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology*, 52(7), 1323–1334. doi: 10.1093/rheumatology/ket132.
- [8] Jin, X., Jones, G., Cicuttini, F., Wluka, A., Zhu, Z., Han, W., et al. (2016). Effect of Vitamin D Supplementation on Tibial Cartilage Volume and Knee Pain Among Patients With Symptomatic Knee Osteoarthritis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 315(10), 1005–1013. doi: 10.1001/jama.2016.1961.
- [9] Gao, X. R., Chen, Y. S., & Deng, W. (2017). The effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int. J. Surg.*, 46, 14–20. doi: 10.1016/j.ijsu.2017.08.010.
- [10] Garfinkel, R. J., Dilisio, M. F., & Agrawal, D. K. (2017). Vitamin D and Its Effects on Articular Cartilage and Osteoarthritis. *Orthop. J. Sports Med.*, 5(6), 2325967117711376. doi: 10.1177/2325967117711376.
- [11] Diao, N., Yang, B., & Yu, F. (2017). Effect of vitamin D supplementation on knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin. Biochem.*, 50(18), 1312–1316. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.09.001.
- [12] Apukhovska, L. I., Vellik, M. M., Lototska, O. Ju., & Chomenko, A. V. (2009). Rol вітаміну E в регуляції гідроксилування хлоркальціоферолу за D–гіповітамінозу та D–гіпервітамінозу [Role of vitamin E in regulation of cholecalciferol hydroxylation process under d-hypovitaminosis and dypervitaminosis conditions]. *Ukr. Biochem. J.*, 81(5), 50–57. [in Ukrainian].
- [13] Морозкіна, Т. С., & Мойсеєнок, А. Г. (2002). *Вітаміни [Vitamins]*. Мінск: Асар. [in Russian].
- [14] Иванов, Ю. И., & Погорелюк, О. Н. (1990). *Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам [Statistical processing of results of medical-biological investigations with programmed calculators]*. Moscow: Medicina. [in Russian].
- [15] Wernecke, Ch., Braun, H. J., & Dragoo, J. L. (2015). The Effect of Intra-articular Corticosteroids on Articular Cartilage. A Systematic Review. *Orthop. J. Sports Med.*, 3(5), 1–7, 2325967115581163. doi: 10.1177/2325967115581163.
- [16] Lu Yihong, C. S., Evans, Ch. H., & Grodzinsky, A. J. (2011). Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. *Arthritis Research and Therapy*, 13(5), R142. doi: 10.1186/ar3456.
- [17] Wenyng, Zhu (2015). *Glucocorticoid-induced chondrocyte cytotoxicity at doses recommended for intra-articular therapy in horses*. Theses and Dissertations–Veterinary Science. Lexington, Kentucky. Retrieved from http://uknowledge.uky.edu/gluck_etds/23.
- [18] Hryhorovskiy, V. V., Kalashnikov, A. V., & Kuziv, Ye. L. (2018). Показники структурно-функціонального стану губчастої та компактної кістки та їх кореляція за експериментального хлоркальціоферолу за D–гіповітамінозу та E / [The indicators of structural-functional condition of cancellous and compact bone and their correlation by the experimental glucocorticoid-induced osteoporosis in vitamin D and E application. *Visnyk ortopedii, travmatologii, protezuвання*, 1, 15–26. [in Ukrainian].
- [19] Lui, J. C., & Baron, J. (2011). Effects of Glucocorticoids on the Growth Plate. *Endocr. Dev.*, 20, 187–193. doi: 10.1159/000321244.
- [20] Boyan, B. D., Sylvania, V. L., Dean, D. D., & Schwartz Z. (2001) 24,25-(OH)₂D₃ regulates cartilage and bone via autocrine and endocrine mechanisms. *Steroids*. 66(3–5), 363–374. doi: 10.1016/S0039-128X(00)00162-8.