

УДК 611.728.3.018.3:[57.043:536.48

## Влияние низких температур и этанола на состояние структурных элементов коленного сустава

Б. П. Введенский<sup>1</sup>, Н. В. Дедух<sup>2</sup>, Г. А. Ковалев<sup>1</sup>, Б. П. Сандомирский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

<sup>2</sup> ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины», Харьков

*Morphological changes in the knee joint elements of laboratory rats after exposure to low temperatures and ethanol were studied. It was found out that an injection of ethanol, precooled down to  $-114$  °C,  $-50$  °C,  $-35$  °C, into the joint cavity resulted in damages of the articular cartilage, articular capsule, menisci and subchondral bone depending upon the temperature range. Significant destructive changes were registered in cases of ethanol cooling down to temperatures of  $-114$  and  $-50$  °C.*

*Вивчені морфологічні зміни елементів колінного суглоба лабораторних щурів після впливу низьких температур та етанолу. Встановлено, що введення попередньо охолодженого до  $-114$ ,  $-50$ ,  $-35$  °C етанолу в порожнину суглоба призводить до ушкодження суглобового хряща, капсули суглоба, менисків та субхондральної кістки залежно від температурного діапазону. Виражені деструктивні зміни зафіксовані в разі охолодження етанолу до температури  $-114$  та  $-50$  °C.*

**Ключевые слова:** низкие температуры, этанол, коленный сустав, структурные изменения

### Введение

Заболевания опорно-двигательной системы, в частности остеоартроз, относятся к одной из актуальных проблем современной медицины [7, 13].

Нарушения в суставах при остеоартрозе сопровождаются прогрессирующим разрушением суставного хряща и других компонентов сустава, а также субхондральной костной ткани [6]. Иницирующая и промоутерная роль в указанных процессах различных повреждающих факторов (механической травмы, перегрузки, прямого деструктивного влияния химических веществ и физических факторов) доказана как в эксперименте, так и у пациентов [8–10]. Было показано, что структурные повреждения элементов сустава можно моделировать на животных путем введения в полость сустава 96 или 70° этанола [5, 12]. Однако механизм воздействия этилового спирта при введении в сустав полностью не изучен, а вопрос о зависимости интенсивности повреждения от концентрации этанола остается открытым [11, 12]. Имеются убедительные данные о том, что охлаждение до низких температур приводит к возникновению деструктивно-дистрофических нарушений клеточных элементов и межклеточного вещества суставного хряща, интенсивность которых

пропорциональна температуре и длительности охлаждения [1]. Поиск адекватных моделей остеоартроза продолжается. В этой связи перспективным для разработки модели остеоартроза может явиться внутрисуставное введение охлажденного до низких температур этанола, однако возможности такого методического подхода мало изучены.

*Цель исследования:* оценить морфологические изменения элементов коленного сустава после введения в него охлажденного до низких температур этанола.

### Материал и методы

Эксперимент выполнен на белых беспородных 6-месячных крысах в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике [2] и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Воздействие на сустав осуществляли путем однократного введения в его полость 0,20–0,25 мл водного раствора этанола при температурах  $-114$ ,  $-50$ ,  $-35$ ,  $-25$  °C соответственно, используя модификацию

способа [4]. Сустав пунктировали по медиальному краю связки надколенника после обработки операционного поля общепринятым методом.

Животных разделили на 5 групп по 10 крыс в каждой: 1-я — контрольная (интактные), 2–5-я — экспериментальные (введение в сустав растворов этанола при вышеуказанных температурах). Из эксперимента животных выводили на 7-е сутки.

Для гистологического исследования у крыс выделяли коленные суставы, фиксировали их в 10 % растворе нейтрального формалина, декальцинировали в растворе 4 % азотной кислоты, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и заключали в целлоидин [3]. Гистологические срезы окрашивали железным гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по Ван-Гизон. Окрашенные срезы анализировали в микроскопе «AxioStar Plus», фотографировали с помощью цифровой камеры Canon EOS-300D.

### Результаты и их обсуждение

Морфологическая картина коленного сустава животных 1-й группы (интактные) не имеет каких-либо патологических нарушений и соответствует нормальному строению.

Цитоархитектоника интактного суставного хряща крыс подобна таковой у людей, однако четкая граница между зонами в некальцифицированном хряще не выявляется. Поверхностная зона узкая, представлена одним-двумя слоями удлинённых клеток с плотным ядром, которые не формируют капсул. Хондроциты в областях, соответствующих промежуточной и глубокой зонам, располагаются в капсулах, имеют крупные ядра и небольшую цитоплазму. Ядра хондроцитов различаются хроматизацией — наряду с гипохромными выявляются гиперхромные, что свидетельствует об их различной метаболической активности. Капсулы клеток относительно однородные, имеют округлую или овальную форму. Обнаруживаются изогенные группы хондроцитов, состоящие из 2–3 клеток. В области суставного хряща, соответствующей его глубокой зоне, хондроциты формируют колонкообразные структуры. Базофильная линия, разделяющая некальцифицированный и кальцифицированный хрящ, у животных этого возраста полностью не сформирована, прослеживается на участках в виде контурной линии, в связи с этим четкая граница отсутствует. Фронт остеогенеза неравномерный, костные напластования на различную глубину проникают в кальцифицирующийся суставной хрящ.

Мениски, располагающиеся в полости сустава, по организации отличаются от таковой у человека.

Медиальный мениск крысы представлен гиалиновым хрящом, перемежающимся с волокнистым. В гиалиновом хряще хондроциты располагаются в капсулах. В латеральном мениске среди гиалинового хряща в центральной области находится обширный участок губчатой кости, что не встречается в менисках человека.

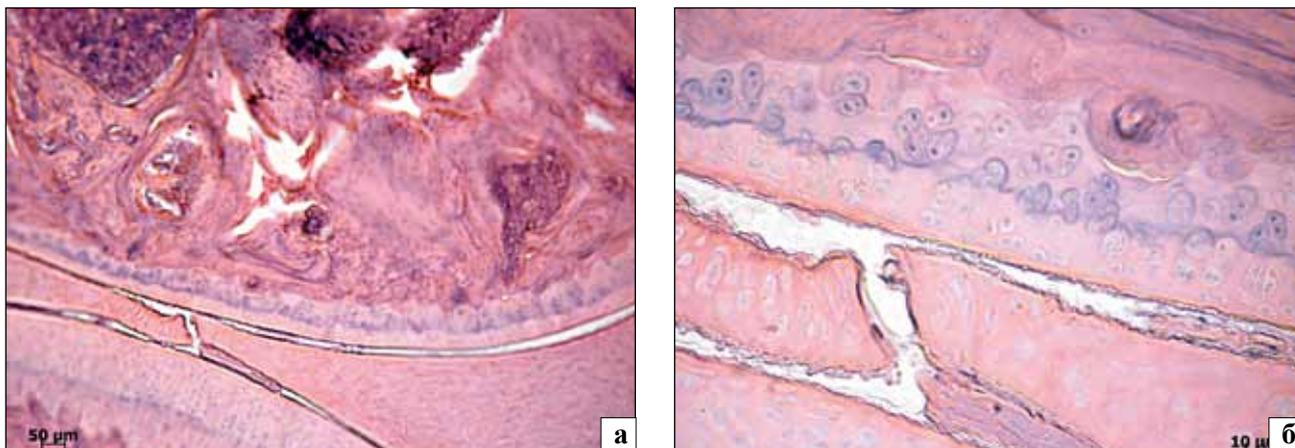
Клетки хрящевой ткани мениска представлены фиброхондроцитами, которые не формируют капсул, а также классическими хондроцитами, располагающимися в капсулах. Хондроциты различаются хроматизацией ядер. Плотность клеток на участках неравномерная: наиболее низкая характерна для областей мениска, прилежащих к переходной зоне, которая в виде узкой полоски волокнистого хряща соединяет латеральный мениск с медиальным.

Капсула сустава представлена узким синовиальным слоем с неравномерной плотностью синовиоцитов, в один-два слоя располагающихся на участках. Фиброзная часть капсулы состоит из рыхлой соединительной ткани с коллагеновыми волокнами, собранными в неравномерные пучки. На участках обнаруживаем скопления жировой ткани. В заворотах капсулы плотность синовиоцитов выше, чем в краевых отделах.

Прилежащая к суставному хрящу субхондральная кость губчатой структуры. Фронт остеогенеза относительно равномерный, но на небольших участках костная ткань в виде холмиков проникает из субхондральной кости в кальцифицирующийся хрящ.

При микроскопическом исследовании суставного хряща, покрывающего мышечки бедренной и большеберцовой костей, у животных 2-й группы (введение в сустав этанола, охлажденного до температуры  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) выявлено, что на всем протяжении некальцифицированного хряща отсутствуют хондроциты (рис. 1), однако бесклеточный матрикс имел относительно равномерную эозинофильную окраску. Четко проявлялась базофильная линия, но клетки в этой области отсутствовали. Базофильная линия с неравномерными контурами огибала пустые капсулы хондроцитов. В отделах кальцифицирующегося хряща сохранились лишь единичные хондроциты с пикнотичными ядрами, располагающиеся в расширенных капсулах с базофильными краями, что может быть связано с кальцификацией.

Фронт остеогенеза на границе раздела суставного хряща и субхондральной кости неравномерный. В этой области обнаружены трещины, что свидетельствует о повышенном давлении на кость вследствие нарушения амортизационных свойств суставного хряща. Зафиксировано нарушение организации как латерального, так и медиального



**Рис. 1.** Микрофото коленного сустава крысы. Бедренно-большеберцовое сочленение. Отсутствие клеток в некальцифицированном суставном хряще, их пикноз в кальцифицированном. Трещины в области фронта остеогенеза. Разрыв мениска. Пустые капсулы в структуре мениска. Деструкция костной ткани. Гематоксилин и эозин, а) ув. 100, б) фрагмент рис. 1, а, ув. 400

менисков, в которых выявлены обширные бесклеточные области (рис. 2). В отдельных капсулах присутствовал клеточный детрит. Костная ткань в латеральном мениске была с деструктивными нарушениями. Отмечена фрагментация костных трабекул. В межтрабекулярных пространствах располагался деструктивный костный мозг. Фронт остеогенеза неравномерный, трабекулы губчатой кости без остеоцитов, в межтрабекулярных пространствах обнаружены массы клеточного детрита.

В заворотах сустава зафиксированы воспалительные пролифераты, нарушающие организацию синовиальной мембраны.

При морфологическом исследовании коленных суставов животных 3-й группы (введение в сустав этанола, охлажденного до температуры  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) отличительных особенностей в организации суставного хряща по сравнению с предыдущей группой не выявлено. В нем отмечены деструктивные нарушения, наиболее выраженные в краевых отделах и проявляющиеся наличием обширных областей без клеток и участков с расширенными капсулами без хондроцитов (рис. 3, а). В области как латерального, так и медиального мениска хондроциты отсутствовали на значительном протяжении. Единичные сохраненные клетки были с признаками пикноза (рис. 3, б).

В латеральном мениске структура костной ткани, расположенной в центральной области, нарушена, костные трабекулы разобщены, лишены клеток, в межтрабекулярных пространствах обнаружен детрит.

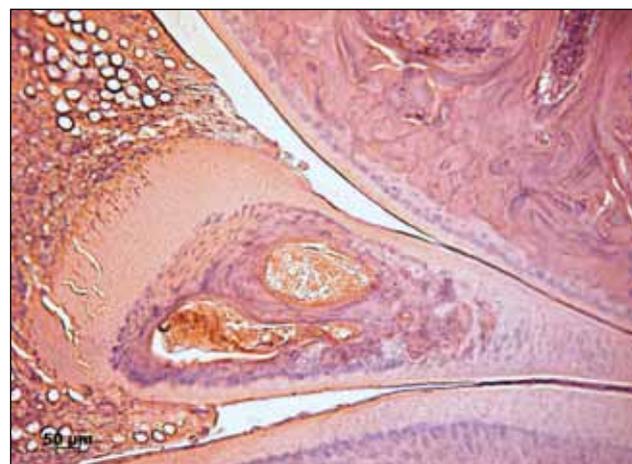
Синовиальная мембрана утолщена за счет пролиферации фибробластов, в заворотах сустава отмечены обширные скопления лимфоцитов и фибробластов.

По данным морфологического исследования, у крыс 4-й группы (введение в сустав охлажденного до температуры  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  этанола) имели место нарушения в суставном хряще, затрагивающие различные его области. На участках обнаружены как хондроциты с гиперхромными ядрами, так и обширные бесклеточные поля (рис. 4).

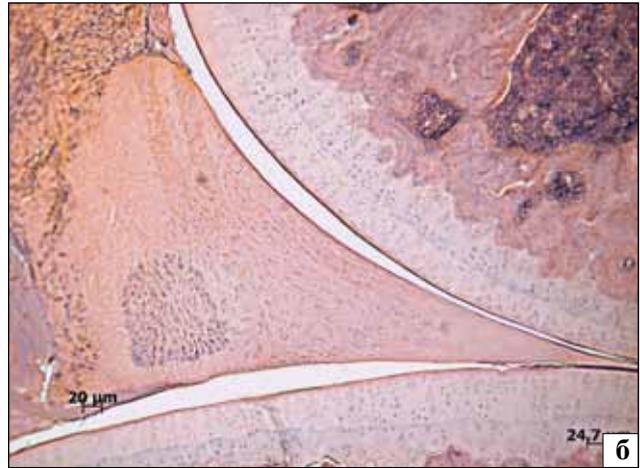
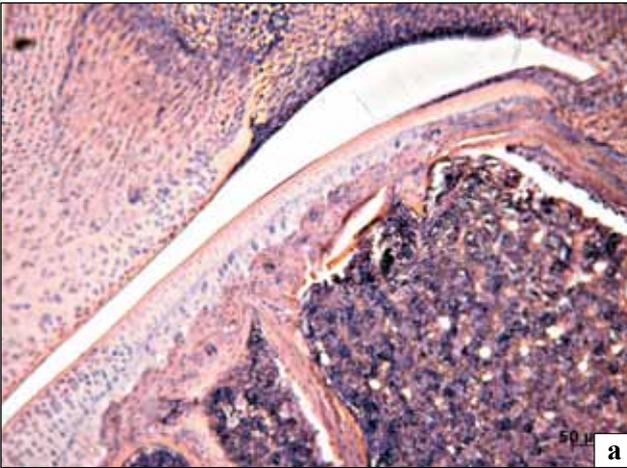
Бесклеточные области располагались в основном в зоне некальцифицированного суставного хряща.

Деструктивные нарушения зафиксированы и в менисках. Они проявлялись как нарушением организации суставного хряща, так и костной ткани, располагающейся в латеральном мениске (рис. 5).

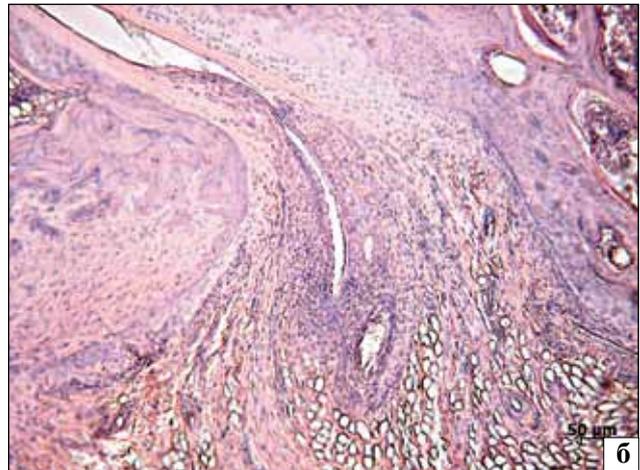
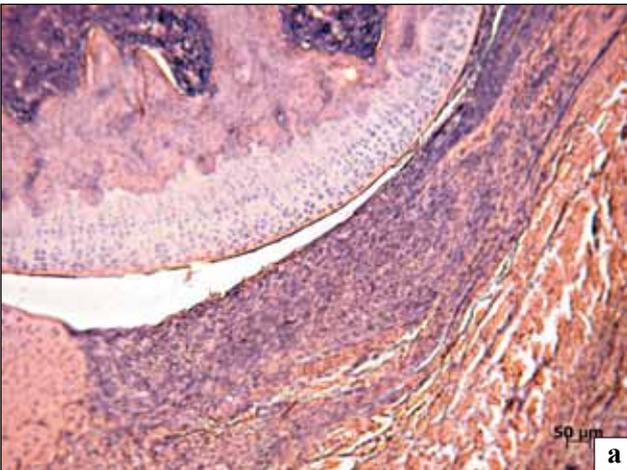
Однако по сравнению с двумя предыдущими сериями эксперимента нарушения в костной ткани мениска выражены значительно меньше. Так, костные трабекулы содержали остециты. В меж-



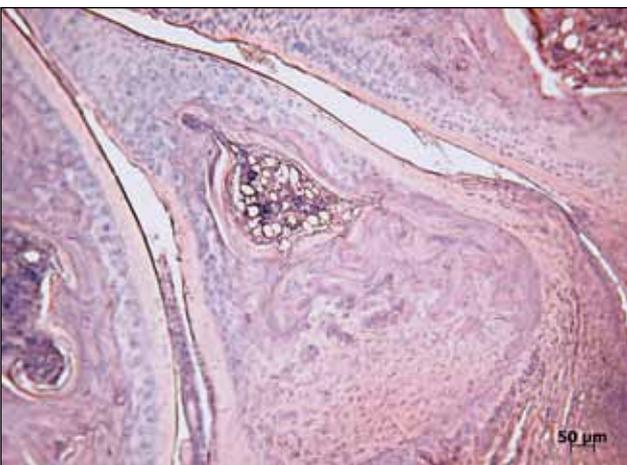
**Рис. 2.** Микрофото. Нарушение организации латерального мениска. Обширные бесклеточные поля. Трещины и щели. Костная ткань в латеральном мениске с деструктивными нарушениями. Фрагментация костных трабекул. Деструкция костного мозга. Гематоксилин и эозин. Ув. 100



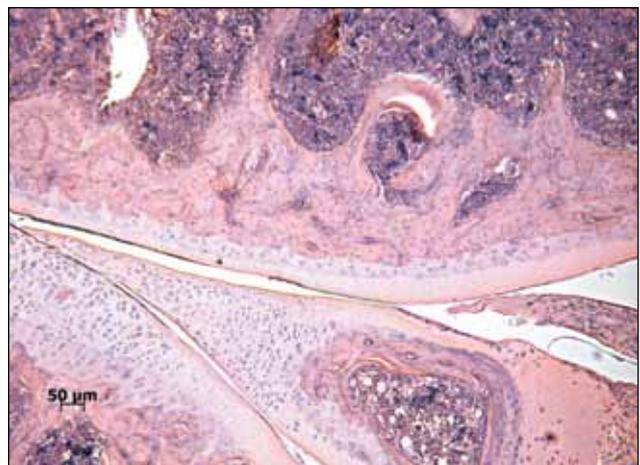
**Рис. 3.** Микрофото: а) мышелки большеберцовой кости, заворот коленного сустава, отсутствие клеток на участках некальцифицированного суставного хряща, пикноз хондроцитов, фибротизация синовиального слоя капсулы. Ув. 100; б) медиальный мениск, нарушение плотности клеток, гибель хондроцитов. Ув. 200. Гематоксилин и эозин



**Рис. 4.** Микрофото: а) мышелок бедренной кости, высокая плотность хондроцитов в суставном хряще, участки с хондроцитами, содержащими гиперхромные ядра, бесклеточные области, фибротизация синовиального и фиброзного слоев капсулы. Ув. 100; б) обширные бесклеточные области в суставном хряще, нарушение организации синовиального, фиброзного слоев капсулы, воспалительные инфильтраты, фибротизация капсулы, гибель жировых клеток, вакуолизация. Ув. 100. Гематоксилин и эозин



**Рис. 5.** Микрофото. Бесклеточные области в суставном хряще и на участках мениска, нарушение субхондральной кости и костной ткани в области медиального мениска. Гематоксилин и эозин. Ув. 100



**Рис. 6.** Микрофото. Очаги суставного хряща без клеток и латеральный мениск с бесклеточными участками, перемежающимися с зонами с высокой плотностью клеток. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

трабекулярных пространствах локализовались небольшие участки сохраненного красного костного мозга, перемежающегося с вакуолями, что свидетельствует о нарушении его гидратации.

Анализ гистологических срезов суставов животных 5-й группы (введение в сустав этанола, охлажденного до температуры  $-25^{\circ}\text{C}$ ) выявил цепь нарушений в суставном хряще, субхондральной кости и капсуле сустава, однако выраженность изменений была меньше, чем в других сериях эксперимента. Так, в суставном хряще на участках обнаружены как очаги бесклеточного матрикса, так и поля с хондроцитами, имеющими нормальную структурную организацию (рис. 6).

В субхондральной костной ткани отмечены слабо выраженные деструктивные проявления, связанные с низкой плотностью остеоцитов. Частично сохраненный красный костный мозг располагался в межтрабекулярных пространствах.

В латеральном и медиальном менисках обнаружены небольшие области без клеток.

В капсуле сустава была повышенная плотность фибробластов и лимфоцитов (рис. 7).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что введение охлажденного до низких температур раствора этанола вызывает комплекс морфологических изменений деструктивно-дистрофического характера как на клеточном, так и на тканевом уровнях. Учитывая относительно слабую репарационную способность хрящевой ткани, даже однократное повреждающее воздействие на сустав инициирует дегенеративный и воспалительный процессы. Исходя из этого, дозирование интенсивности повреждающего воздействия играет важнейшую роль в моделировании деструктивно-дистрофических проявлений в суставах. Доставка хладагента непосредственно в полость коленного сустава позволяет минимизировать отвод холода через энергоемкое сосудистое русло. Это, по-видимому, дает возможность поддерживать низкую температуру, способствующую повреждению хрящевой ткани, хотя в целом хрящевая ткань отличается более высокой устойчивостью по сравнению с другими тканями сустава. Повреждающее действие на сустав можно регулировать, изменяя температурный режим охлаждения, что было показано в нашем исследовании.

## Выводы

Наиболее выраженное деструктивное влияние оказывает введение растворов этанола, охлажденных до температуры  $-114$ ,  $-50^{\circ}\text{C}$ , которая находится за порогом температурной устойчивости элемен-

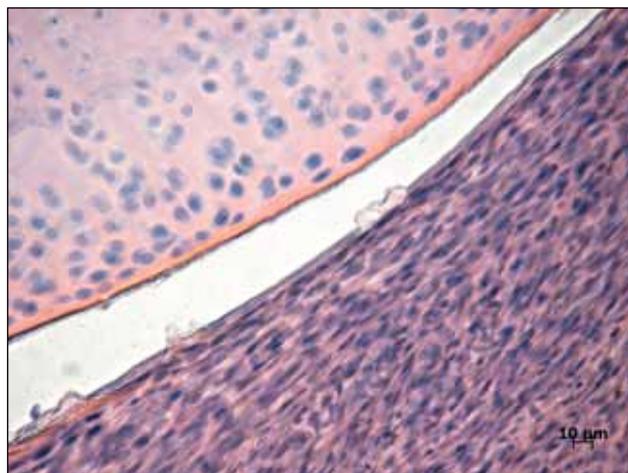


Рис. 7. Микрофото участка сохраненного суставного хряща с высокой плотностью хондроцитов, фибротизация капсулы сустава. Гематоксилин и эозин. Ув. 400

тов сустава. Внутрисуставное введение раствора, охлажденного до температуры  $-35^{\circ}\text{C}$ , влечет за собой структурные нарушения, выраженные в меньшей степени в суставном хряще, субхондральной кости и мениске. Наименьшее деструктивное влияние зафиксировано при использовании в качестве хладагента раствора этанола, охлажденного до температуры  $-25^{\circ}\text{C}$ . Морфологические изменения в хрящевой ткани и других элементах сустава под действием хладагентов по направленности сходны, однако степень выраженности и распространенность деструктивных нарушений зависит от температурного режима. Разработанная экспериментальная модель остеоартроза, осложненного воспалительным процессом, может быть использована для оценки воздействия медикаментозных препаратов и различных физиотерапевтических факторов.

## Список литературы

1. Малышкина С. В. Структурно-метаболические изменения суставного хряща после локального криовоздействия: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22 / Светлана Владимировна Малышкина. — Х., 1985. — 187 с.
2. Общие этические принципы экспериментов на животных: материалы III Национального конгресса по биоэтике (тезисы докладов и выступлений). — К.: НАНУ, 2007. — 16 с.
3. Основы гистологии и гистологической техники / Под ред. В. Г. Елисеева. — М.: Медицина. — 1967. — 286 с.
4. Пат. 56629 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання деструктивно-дистрофічного процесу в колінному суглобі / Введенський Б. П., Гальченко С. С., Ковальов Г. О., Синчикова О. П., Сандомирський Б. П. — Заявл. 07.06.10; опубл. 25.01.11; Бюл. № 2.
5. Alcohol-facilitated ankylosis of the distal intertarsal and tarsometatarsal joints in horses with osteoarthritis / J. Carmalt, C. Bell, L. Panizzi et al. // J. Am. Vet. Med. Assoc. — 2012. — Vol. 240, № 2. — P. 199–204.
6. Cartilage damage pattern in relation to subchondral plate thickness in a collagenase-induced model of osteoarthritis /

- S. M. Botter, G. J. van Osch, J. H. Waarsing et al. // Osteoarthritis Cartilage. — 2008. — Vol. 16, № 4. — P. 506–514.
7. Felson D. T. Arthroscopy as a treatment for knee osteoarthritis / D. T. Felson // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. — 2010. — Vol. 24, № 1. — P. 47–50.
  8. Kawaguchi H. Mechanism underlying osteoarthritis induced by mechanical stress on joint cartilage / H. Kawaguchi // Clin. Calcium. — 2008. — Vol. 18, № 9. — P. 1274–1286.
  9. Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin / C. Flannery, R. Zollner, C. Corcoran et al. // Arthritis Rheum. — 2009. — Vol. 60, № 3. — P. 840–847.
  10. Prognosis of limitations in activities in osteoarthritis of the hip or knee: a 3-year cohort study / G. van Dijk, C. Veenhof, P. Spreeuwenberg et al. // Arch. Phys. Med. Rehabil. — 2010. — Vol. 91, № 1. — P. 58–66.
  11. Use of ethanol in the treatment of distal tarsal joint osteoarthritis: 24 cases / L. Lamas, J. Edmonds, W. Hodge et al. // Equine Veterinary Journal. — 2012. — № 44. — P. 399–403.
  12. Use of intra-articular administration of ethyl alcohol for arthrodesis of the tarsometatarsal joint in healthy horses / R. W. Shoemaker, A. L. Allen, C. E. Richardson et al. // Am. J. Vet. Res. — 2006. — Vol. 67, № 5. — P. 850–857.
  13. Valdes A. M. The genetic epidemiology of osteoarthritis / A. M. Valdes, T. D. Spector // Curr. Opin. Rheumatol. — 2010. — Vol. 22, № 2. — P. 139–142.

Статья поступила в редакцию 15.06.2012

### *Уважаемые коллеги!*

Украинская ассоциация ортопедов-травматологов приглашает Вас принять участие в XVI съезде ортопедов-травматологов Украины, который состоится **3–5 октября 2013 г.** в Харькове.

### *Научная тематика съезда*

#### *Пленарные заседания*

1. Фундаментальные, прикладные и организационные вопросы травмы и травматизма в Украине.
2. Реабилитация в ортопедии и травматологии.

#### *Секционные заседания*

1. Эндопротезирование суставов.
2. Повреждения и заболевания позвоночника.
3. Повреждения и заболевания верхних конечностей.
4. Ошибки и осложнения в травматологии и ортопедии.
5. Ортопедические аспекты костной онкологии и метаболических заболеваний костной ткани.
6. Детская ортопедия и травматология.
7. Повреждения и заболевания таза, нижних конечностей.
8. Спортивная травматология, артроскопия суставов и новые технологии.

Рабочие языки — украинский, русский, английский

#### **Секретариат:**

ВОО «Украинская ассоциация ортопедов-травматологов»,  
 ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов  
 им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины»,  
 научно-организационный отдел

61024 Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, 80

тел. +38 (057) 704-14-78

факс +38 (057) 700-11-27

www.uaot.org.ua

e-mail: ipps-noo@ukr.net