УДК 363.7-092.9:616.72-007.17-008.8:612.398.12:612.015.31

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА У СОБАК С ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИМИ ПОРАЖЕНИЯМИ В КОЛЕННОМ СУСТАВЕ

Гасанова А.Г., Матвеева Е.Л., Спиркина Е.С.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава Российской Федерации, Курган, e-mail: office@ilizarov.ru

Изучение электролитного состава и ферментативной активности синовиальной жидкости коленного сустава и сыворотки крови, микроскопических исследований мазков синовиальной жидкости коленных суставов собак с моделью остеоартроза показало нарушение минерального обмена при развитии дегенеративно-дистрофических изменений суставов.

Ключевые слова: остеоартроз, синовиальная жидкость, сыворотка крови, минеральный обмен

CHANGE INDICATORS MINERAL METABOLISM IN DOGS WITH EXPERIMENTAL MODELS OF DEGENERATIVE AND DYSTROPHIC CHANGES

Gasanova A.G., Matveeva E.L., Spirkina E.S.

Federal State Institution «Russian Scientific Center» Restorative Traumatology and Orthopedics» named after academician G.A. Ilizarov»the Ministry of Health of the Russian Federation, Kurgan, e-mail: office@ilizarov.ru

The study of electrolyte composition and the enzymatic activity of the synovial fluid of the knee joint and blood serum , microscopic examination of smears of synovial fluid of the knee joints of dogs with a model of osteoarthritis showed a violation of mineral metabolism in the development of degenerative changes in the joints.

Keywords: osteoarthritis, synovial fluid, serum, mineral metabolism

Болезни и повреждения суставов конечностей имеют большую распространенность и занимают значительный удельный вес в структуре временной нетрудоспособности и инвалидности. Так на долю остеоартроза (ОА) приходится до 70% всех ревматических заболеваний. Это дегенеративно-дистрофическое заболевание, которое проявляется поражением всех структур сустава, приводит к деформации и, в конечном итоге, к утрате подвижности в суставе. Дегенеративно-дистрофические изменения суставов имеют общие механизмы патогенеза. По данным ряда авторов [7, 8] изменения в субхондральной кости могут повлечь за собой деградацию хряща. Это объясняется тем, что субхондральная кость может продуцировать провоспалительные цитокины и факторы роста, которые в свою очередь попадают в вышележащий хрящ и участвуют в деградации хрящевой ткани. Все это является результатом нарушения ремоделирования субхондральной кости [9].

Исходя из этого, **целью** данного исследования явилось изучение показателей электролитов, активности фосфатаз, системного индекса электролитов, индекса фосфатаз в синовиальной среде коленного сустава и сыворотке крови у экспериментальных животных с моделью дегенеративно-дистрофических изменений коленного сустава.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования служила синовиальная жидкость и сыворотка крови от 25 животных: 14 животных (собак) – контрольная группа; 11 животных – группа собак с моделью дегенеративно-дистрофических изменений суставов, полученной иммобилизацией коленного сустава с компрессией в срок 28 дней эксперимента [Патент 2452999 РФ от 10.06.2012, М.А. Степанов]. Сроки эксперимента соответствовали ранним стадиями остеоартроза. Анализ показателей минерального обмена в синовиальной жидкости и сыворотки крови включал определение кальция, фосфора, магния и хлоридов спектрофотометрическим методом на биохимическом анализаторе Stat Fax 1904 Plus с использованием наборов реагентов фирмы Vital Diagnostics (Россия, Санкт-Петербург).

Для расчета системного индекса электролитов (СИЭ) использовали формулу [2]:

$$\text{СИЭ} = \frac{[Ca]\times[Mg]\times[Cl]}{[PO_4]}$$

где [Ca] – концентрация кальция (ммоль/л), [Mg] концентрация магния (ммоль/л), [Cl] – концентрация хлоридов (ммоль/л), [PO_4] – концентрация фосфора (ммоль/л).

Для расчета значений ионизированного кальция определяли общее количество белка биуретовым методом. Показатель ионизированного кальция рассчитывали по формуле [6]:

$$Ca^{2+} = \frac{6Ca - \frac{Б}{3}}{Б + 6} * 0{,}2495$$

где Ca^{2+} – ионизированный кальций, Ca – общий кальций (мг%), Б – общий белок (г%), 0,2495 – коэффициент пересчета в ммоль/л.

Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) и кислой фосфатазы (КФ) определяли с помощью анализатора Stat Fax® 1904 Plus (США), используя наборы фирмы

Vital Diagnostic (Санкт-Петербург). Индекс фосфатаз (ИФ) рассчитывали по формуле [2]:

$$ИФ=\frac{ЩФ}{КФ}$$

где ЩФ – концентрация щелочной фосфатазы (ед/л), КФ – концентрация кислой фосфатазы (ед/л).

Электрофоретическое разделение белковых фракций проводили без предварительной обработки синовии, используя прибор для электрофореза Helena («BioSciens Europe», Англия); производя расчет альбумин-глобулинового коэффициента.

Микроскопическому исследованию подвергали окрашенные препараты синовиальной жидкости собак с моделью дегенеративно-дистрофических изменений коленного сустава. Использовали стандартную технику приготовления мазка, препараты окрашивали по Паппенгейму. Световую микроскопию осуществляли на аппаратном комплексе Axio Scope.A1 (производитель: Carl Zeiss Microlmaging GmbH). Данный микроскоп оснащен модульным программным обеспечением от компании Carl Zeiss для обработки и анализа изображений.

Обработку результатов исследования проводили методом вариационной статистики для малых выборок, с принятием вероятности p, равной 0,05. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для каждой группы исследований определяли медиану значений и интерквартильные размахи 0,25 и 0,75 персентили. Достоверность различий показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона, используя лицензионные программы: Microsoft Excel, версия 5.0 и интеграторный модуль Atte Stat 1,0, разработанный в ИВЦ ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Илизарова Минздрава России» И.П. Гайдышевым.

Результаты исследования и их обсуждения

В результате экспериментального моделирования остеоартроза у собак методом иммобилизации коленного сустава с пересечением бедренной артерии мы имели возможность визуально оценить наличие дегенеративно-дистрофических изменений в суставе. При макроскопической оценке состояния суставного хряща были отмечены изменения, характерные для дегенеративно-дистрофического процесса: разволокнение суставной поверхности, появление поверхностных узур и геморрагий. Результаты оценки морфофункционального состояния суставного хряща и субхондральной кости подтверждают, что данная экспериментальная модель дает возможность получить остеоартроз, развитие которого происходит на основе компрессии суставных концов, изменения кровообращения сустава, трофики суставных поверхностей и субхондральной кости.

В результате проведенных исследований нами были получены биохимические данные показателей электролитов и активности фосфатаз синовиальной жидкости (табл. 1).

Согласно полученным нами данным, повышение концентраций общего кальция и фосфат-ионов в синовиальной жидкости коленных суставов собак с ДДИ было незначительным по сравнению с контрольной группой. Отношение Ca/P оставалось без изменений. В нашем исследовании было отмечено, что при развитии дегенеративно-дистрофических поражений суставов собак в суставной среде концентрация общего белка повышается достоверно, что соответствует литературным данным [6], однако это не сказывалось на концентрации ионизированного кальция.

Таблица 1

Биохимические показатели минерального обмена, общего белка, щелочной и кислой фосфатаз в синовиальной жидкости коленных суставов собак в контрольной и опытной группе при моделировании остеоартроза на ранних стадиях ДДИС (медианы значений и интерквартильные размахи)

Показатели в синовиальной жидкости, ед.изм.	Контрольная группа (n = 12)	Опытная группа (n = 15)
Кальций, ммоль/л	1,62 (1,45;1,85)	1,85 (1,70;2,05)
Фосфор, ммоль/л	1,65 (1,27;1,88)	2,01 (1,67;2,09)
Кальций/фосфор	0,91 (0,78;1,20)	0,98 (0,89;1,13)
Магний, моль/л	0,76 (0,72;0,79)	0,83 (0,80;0,94)
Хлориды, ммоль/л	52,70 (47,05;63,50)	58,50 (55,48;75,88)
СИЭ	40,93 (36,08;49,89)	48,14 (43,77;62,65)
Общий белок, г/л	23,30 (19,99;26,69)	39,09* (36,99;51,00)
A/G	1,27 (0,83;1,63)	0,69 (0,61;0,88)
Кальций ионизированный, ммоль/л, мг%	1,73 (1,64;1,81) 6,93 (6,59;7,26)	1,56 (1,44;1,73) 6,27 (5,76;6,94)
Щелочная фосфатаза, ед/л	30,50 (18,00;36,05)	106,15* (79,45;154,15)
Кислая фосфатаза, ед/л	1,70 (0,53;5,03)	23,60* (15,5;43,35)
Щелочная фосфатаза/кислая фосфатаза	22,83 (11,13;73,4)	6,32* (3,99;7,99)

Примечание. * – различия между показателями достоверны в сравнении со значениями нормы.

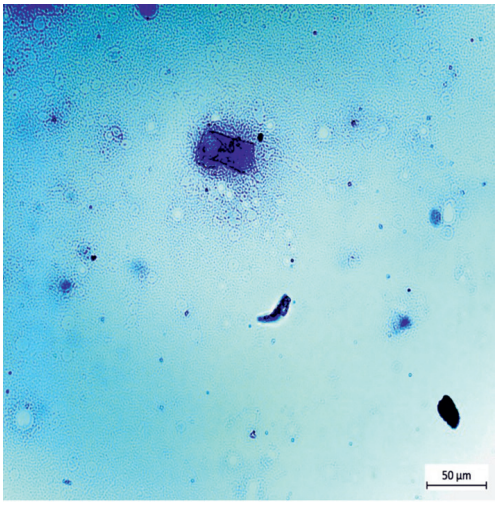

Рис. 1. Кристалл пирофосфата кальция в синовиальной жидкости коленного сустава у собак с ДДИ

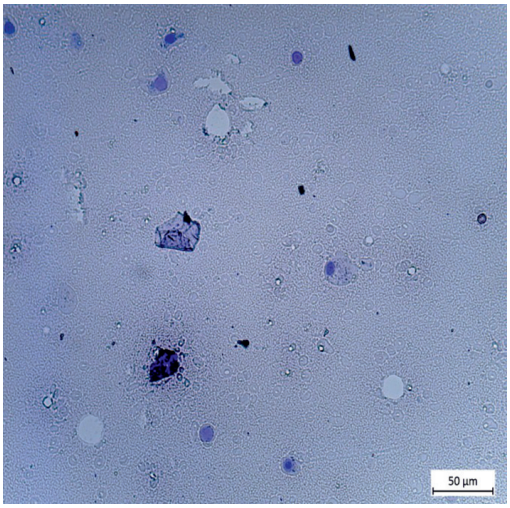

Рис. 2. Частицы износа хряща в синовиальной жидкости коленного сустава у собак с ДДИ

Таблица 2

Биохимические показатели минерального обмена, общего белка, щелочной и кислой фосфатаз сыворотки крови собак в контрольной и опытной группе при моделировании остеоартроза на ранних стадиях ДДИС (медианы значений и интерквартильные размахи)

Показатели в сыворотке крови, ед.изм.	Контрольная группа (n = 6)	Опытная группа (n = 10)
Кальций, ммоль/л	2,29 (2,19;2,34)	2,50* (2,42;2,58)
Фосфор, ммоль/л	1,32 (1,23;1,36)	1,68* (1,64;1,74)
Кальций/фосфор	1,71 (1,65;1,74)	1,48* (1,37;1,55)
Магний, моль/л	0,86 (0,85;0,88)	0,88 (0,85;0,89)
Хлориды, ммоль/л	112,05 (102,65;113,50)	101,45 (98,93;103,78)
СИЭ	135,86 (133,95;137,28)	165,86* (151,23;172,11)
Общий белок, г/л	66,65 (66,43;69,04)	71,80* (67,95;74,85)
A/G	1,16 (1,10;1,23)	0,58* (0,55;0,67)
Кальций ионизированный, ммоль/л мг%	2,05 (1,95;2,09) 8,23 (7,82;8,36)	2,18* (2,06;2,24) 8,74* (8,25;8,98)
Щелочная фосфатаза, ед/л	2,01 (1,93;2,07)	117,85* (107,95;118,38)
Кислая фосфатаза, ед/л	0,19 (0,19;0,20)	2,25* (2,13;2,45)
Щелочная фосфатаза/кислая фосфатаза	10,08 (9,31;10,88)	47,12* (39,0;55,94)

Примечание. * – различия между показателями достоверны в сравнении со значениями нормы.

Во многих исследовательских работах используются биохимические маркеры костеобразования – показатели фосфатазной активности. В процессе изучения активности фосфатаз синовиальной жидкости мы получили следующие результаты. У собак с моделью ДДИ наблюдалось достоверное увеличение активности фосфатаз, а индекс фосфатаз достоверно понижался, что свидетельствовало о преобладании процессов резорбции костной ткани.

При микроскопическом исследовании синовиальной жидкости коленных суставов собак с моделью ДДИ мы обнаружили типичные клеточные единицы: синовиоциты, гистиоциты, элементы крови – лимфоциты, нейтрофилы и моноциты, а так же кристаллы ромбовидной формы, идентифицированные как кристаллы пирофосфата кальция. Это свидетельствовало о наличии нарушений электролитного баланса синовиальной среды, которые возникают в результате развития патологий суставов. Кроме этого, почти во всех образцах мазков нами отмечено наличие частиц износа хрящевой ткани, что также указывало на развитие ДДИ суставов (рис. 1, 2).

Таким образом, биохимическое исследование синовиальной жидкости собак

с ДДИС показало незначительное увеличение показателей кальция, фосфора и магния, достоверное увеличение концентрации общего белка и фосфатазной активности.

В ходе биохимических исследований показателей электролитов и активности фосфатаз сыворотки крови собак с ДДИ нами были получены следующие результаты (табл. 2).

Концентрация общего кальция и фосфатионов достоверно увеличивалась в сыворотке крови экспериментальных животных, а соотношение Ca/P достоверно снижалось, это говорит о том, что концентрация фосфатионов снижалась в большей степени, чем концентрация кальция. Показатель общего белка статистически значимо снижался.

Результаты данного исследования показали достоверное увеличение активности фосфатаз, что свидетельствует о процессе ремоделирования костной ткани при дегенеративно-дистрофических изменениях суставов. Кроме того, было отмечено статистически значимое увеличение индекса фосфатаз в сыворотке крови экспериментальных животных, что свидетельствует о преобладании процессов регенерации костной ткани над процессами резорбции, тогда как в синовиальной жидкости индекс фосфатаз статистически значимо понижался.

Выводы

На основании изменений биохимических показателей электролитного состава и ферментативной активности синовиальной жидкости и сыворотки крови, микроскопических исследований мазков синовиальной жидкости коленных суставов собак с моделью остеоартроза можно сделать вывод о нарушение минерального обмена при развитии дегенеративно-дистрофических изменений суставов.

Список литературы

1. Анатомия собаки / под ред. проф. Н.В. Зеленевского. – СПб., 1997. – 340 с.

2. Информативность лабораторных исследований в ортопедии и травматологии / К.С. Десятниченко, Л.С. Кузнецова, Г.П. Гайдышев и др. // Современные методы диагностики: Тез. докл. – Барнаул, 1999. – С. 202–203.

3. Исследование некоторых биохимических и клинических показателей гонартроза и их взаимосвязь. Матвеева Е.Л., Лунева С.Н. Успехи современного естествознания. – 2015. – № 3. – С. 51–54.

4. Матвеева Е.Л. Изменения в составе синовиальной жидкости больных при застарелых и свежих повреждениях мениска / Е.Л. Матвеева, Т.Ю. Карасева, Е.А. Карасев // Гений ортопедии. – 2008. – № 3. – С. 15–18.

5. Особенности капсулы сустава, синовиальной жидкости, гиалинового хряща у животных. Борисов М.С. Ветеринария. – 2009. – № 1. – С. 43–45.

6. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л.А. Даниловой. – СПб., Питер. – 2003. – 733 с.

7. Burr D.B., Schaffler M.B. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: quantitative microscopic evidence. Microsc Res Tech 1997;37(4):343–57.

8. Frieden E. A survey of the essential biochemical elements // Biochemistry of the essential ultratrace elements / Ed. E. Frieden. – New York, London: Plenum Press. 1984. – P. 1–16.

9. Hilal G., Martel–Pelletier J., Pelletier J.P., et al. Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin–like grows factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. Arthritis Rheum 1999;42:2112–2.