



УКРАЇНА

(19) UA (11) 24689 (13) A

(51) G A 61 B 17/56; G 09 B 23/28

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ОСТЕОАРТРОЗУ

1

(21) 97073625

(22) 12.10.97

(24) 04.08.98

(46) 30.10.98. Бюл. № 5

(47) 04.08.98

(56) 1. Авторское свидетельство СССР
№ 1426542, кл. A 61 B 10/00; G 01 N 33/48. –
Бюл. № 36. – 1988.2. Авторское свидетельство СССР
№ 951368, кл. G 09 B 23/28. – Бюл. № 30. – 1982
(прототип).3. Морозова Н.Б. Влияние серотонина
на антигеннеспецифические супрессоры тимуса // Бюллетень эксперим. биологии и
медицины. – 1990. – № 7. – С. 68–70.

4. Науменко Е.В., Попова Н.К. Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. – Новосибирск, 1975. – 216 с.

2

(72) Баринев Едуард Федорович, Бондаренко
Надія Миколаївна, Ігнатенко Григорій
Анатольович(73) Донецький державний медичний
університет ім. М. Горького(57) Спосіб моделювання остеоартрозу шляхом
пошкодження суглобового хряща, який
в і д р і з н я є т ь с я тим, що пошкодження
здійснюють порушенням адаптаційних процесів
в тканинах суглоба, для чого впливають
УВЧ на скронево-тім'яну область по
12–15 хв щодобово 10–15 діб, після чого
підвищують одночасно фізичне навантаження
на локомоторний апарат, наприклад, біг
у тредбані, і температуру навколишнього
середовища, наприклад, до +38–39°C протягом
2–3 годин.

Заявлений спосіб моделювання остеоартрозу (ОА) відноситься до галузі експериментальної медицини та біології, а також, ревматології, травматології і ортопедії, і може бути використаним для моделювання захворювань, які супроводжуються дистрофічними і деструктивними порушеннями в тканинах суглоба, зокрема, ОА у шахтарів.

Відомий спосіб моделювання дистрофічного процесу в хрящі суглоба [Дедух Н.В. и соавт. Остеоартрозы Пути фармакологической коррекции. – Харьков, 1992. – С. 126] шляхом руйнування суглобового хряща,

для чого в порожнину суглоба вводять різні хімічні речовини. Спосіб виконують, наприклад, однократним введенням Кортизона в дозі 0,1 мг/кг в порожнину суглоба нестатевозрілих кроликів. При цьому виникає порушення організації матрикса і розволокнення суглобового хряща, а також необоротні зміни в епіфізарній зоні росту кістки. Такі ж зміни в суглобах контралатеральної кінцівки вказують на присутність системної дії.

Недоліком відомого способу є те, що Кортизон надходить до судинного русла і чинить системну дію, зокрема, на клітини

(19) UA (11) 24689 (13) A

хряща суглоба другої кінцівки. Проте, при цьому пошкоджуються і інші клітини, які мають рецептори до стероїдних гормонів (наприклад, лімфоцити, гепатоцити, аденоцити гіпофіза та ін.), в результаті чого можливо зниження функціональної повноцінності різних органів і систем і, як наслідок, доводиться зустрічатися з непередбаченими ускладненнями, які розвиваються при моделюванні остеоартрозу. Так, за нашими даними, в 30–37% випадків виникає лімфопенія, змінюється рівень гормонів у циркулюючій крові та ін.

Найбільш близьким за технічною суттю до способу, який заявляється, є спосіб моделювання деструктивно-дистрофічного процесу в суглобі [Авт. св. СССР № 951368, кл. G 09 B 23/28. – Бюл. № 30. – 1982] шляхом пошкодження суглобового хряща однократним прямим впливом струменя парорідинного азоту під тиском 0,2 – 0,6 атм протягом 4–8 с.

Реалізують спосіб-прототип таким чином.

Під наркозом у тварини поширено розтинають кульшовий суглоб; розрізають капсулу суглоба і оголяють передню поверхню головки стегна, при цьому анатомічне співвідношення в суглобі та форма суглобової поверхні не порушується; подають парорідинний струмінь азоту на суглобовий хрящ апаратом "Х-34" з відстані 2 см під тиском 0,4 атм, час експозиції – 8 с, при цьому кровоплив розповсюджується на всю глибину суглобового хряща з захопленням замикальної пластинки.

При мікроскопічному дослідженні на 28-у добу і через 2 місяці після моделювання патологічного процесу морфологічні зміни в суглобі відповідали тим, що спостерігаються при деформуючому артрозі.

Недоліком відомого способу є те, що відома модель ОА у тварини патогенетично не відповідає аналогічному захворюванню, яке розгортається у людини в процесі інтенсивної професійної діяльності, наприклад, у шахтарів, оскільки відтворюється тільки місцевий патологічний процес – пошкодження клітин хряща, тоді як у людини розвиток ОА є наслідком зниження адаптаційних процесів в тканинах суглоба, які виникають при первинному порушенні регулюючих систем (насамперед ЦНС, а також імунної та ендокринної). Описане моделювання в експерименті ОА, за суттю, є відтворенням наслідків захворювання, яке розвивається у людини, і не дозволяє коректно переносити отримані результати в клініку для розробки відповідних методів діагностики, профілактики чи лікування.

Описаний підхід базується на припущенні про первинну зміну співвідношення рівня медіаторів (зниження вмісту серотоніну) в нейронах різних структур мозку, як пускового механізму виникнення ОА у людини, наслідком чого є активація гуморального імунітету, оскільки зменшується рівень Т-супресорів, падає рівень стероїдних гормонів, насамперед глюкокортикоїдів, і знижується нейротрофічний вплив на тканини суглоба. Наслідком цих змін (вторинний процес) є порушення адаптаційних процесів в суглобовому хрящі при підвищенні функціонального навантаження на суглоб і розвиток деструктивних змін в тканинах суглоба. Спроба моделювання патологічного процесу тільки в хрящі суглоба не буде супроводжуватися змінами в системах регуляції гомеостазу, які відповідні таким у людини при виникненні ОА. Таким чином, спосіб-прототип не відтворює картину патогенезу захворювання, аналогічну тій, що є у людини, хворої на ОА, а дозволяє проаналізувати механізми відновлення хряща (репаративної регенерації) у інтактних тварин.

В основу винаходу поставлена задача відтворити на тваринах патогенез остеоартрозу, в т.ч. професійного (який розвивається у шахтарів), шляхом впливу УВЧ на скронево-тім'яну область по 12–15 хв щодобово 10–15 діб, після чого підвищують одночасно фізичне навантаження на локомоторний апарат, наприклад, біг у тредбані, та температуру навколишнього середовища, наприклад, до +38–39°C протягом 2–3 годин, що приводить до зниження вмісту серотоніну в нейронах гіпоталамо-гіпофізарної системи і, як наслідок, запускаються механізми патогенезу ОА.

Суть винаходу заключається в тому, що пошкодження суглоба здійснюють впливом УВЧ на скронево-тім'яну область по 12–15 хв щодобово 10–15 діб, після чого підвищують фізичне навантаження на локомоторний апарат, наприклад, біг у тредбані, і одночасно температуру навколишнього середовища, наприклад, до +38–39°C протягом 2–3 годин.

Новим в способі, що заявляється, є те, що порушення репаративних процесів у суглобовому хрящі здійснюють впливом УВЧ на скронево-тім'яну область по 12–15 хв щодобово 10–15 діб, після чого підвищують одночасно фізичне навантаження на локомоторний апарат, наприклад, біг у тредбані, і температуру навколишнього середовища, наприклад, до +38–39°C протягом 2–3 годин.

Зниження вмісту серотоніну в нейронах гіпоталамо-гіпофізарної системи дозволить відтворити один із клінічних варіантів патогенезу ОА, який найбільш часто зустрічається і розвивається, наприклад, у шахтарів, при якому можливий наступний ланцюг причинно-наслідкових зв'язків: зміни метаболізму біогенних амінів в нейронах різних структур мозку – зниження вмісту серотоніна в нейронах гіпоталамуса – активація гуморального імунітету і зменшення рівня гормонів (в т.ч. глюкокортикоїдів) в циркулюючій крові – порушення адаптаційних процесів в тканинах суглоба – розвиток дистрофічних і деструктивних змін в суглобовому хрящі. Отже, спосіб, що пропонується, відкриває можливість відтворити картину виникнення і розвитку ОА у хворої людини. Крім того, виникнення остеоартрозу буде відображувати міцність компенсаторно-приспосовних, метаболічних процесів гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, яка є основою прогресування патологічного процесу і формування механізмів одужування (саногенезу). Внаслідок активації компенсаторно-приспосованих механізмів в структурах головного мозку вдається стандартизувати умови проведення функціонального навантаження на локомоторний апарат в умовах загальної гіпертермії організму, а значить – добитися зіставлення результатів дослідження у різних тварин, скоротити час дослідження і зменшити матеріальні витрати на проведення експериментів.

Розробка способу, який заявляється, стала можливою завдяки вперше встановленню авторами наступному науковому факту. Було показано, що при місцевому пошкодженні суглобового хряща у інтактних тварин (за способом-прототипом) морфологічна картина компенсаторно-приспосованих механізмів, які розвиваються в синовіальній оболонці, хрящі та субхондральній кістці, всього на 10–15% відповідає певній за клінічним перебігом ОА у шахтарів. Така ситуація приводила до безперспективної розробки методів діагностики, профілактики і лікування патології, що вивчається. Це спонукало провести клініко-експериментальні зіставлення (з використанням біохімічних, морфологічних і імунологічних досліджень), на підставі яких потрібно було встановити основні механізми патогенезу ОА у шахтарів. В результаті такого аналізу встановлено, що розвиток ОА у шахтарів супроводжується зниженням активності Т-супресорів, що приводить до активації Т-хелперів, зростанням синтезу антитіл, посиленню ци-

толітичних і цитотоксичних реакцій, утворенню імунних комплексів. При цьому на 20–30% в крові знижується концентрація кортизолу і трийодтироніну.

З літератури [3] відомо, по-перше, що однією з причин зменшення кількості Т-супресорів може бути зниження рівня серотоніна в нейронах мозку. Причому, стресс-реакція, а такою є робота шахтарів в підземних умовах, може супроводжуватися зміною обміну біогенних амінів в різних органах і тканинах, в т.ч. в мозку [4]. Це дозволило припустити існування взаємозв'язку між стрес-реакцією організму, з однієї сторони, і зменшення кількості Т-супресорів, з другої. По-друге, зниження вмісту серотоніна в нейронах ядер гіпоталамуса може супроводжуватися гальмуванням гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, що проявляється спадом концентрації в крові стероїдних гормонів, насамперед, глюкокортикоїдів, наслідком чого є порушення адаптаційних процесів в тканинах суглоба. По-третє, зменшення кількості Т-супресорів і рівня глюкокортикоїдів в крові створюють умови для активації реакції гуморального імунітету і формування запально-дегенеративних змін в суглобовому хрящі при інтенсивному фізичному навантаженні на локомоторний апарат.

З метою перевірки цієї гіпотези, експериментальні тварини (12 щурів) підлягали протягом 10–15 діб впливу електричним полем УВЧ на скронево-тім'яну область (частота 40,68 МГц, міцність потоку 30 Вт), тривалість одного сеансу 12–15 хв). При цьому в 75% випадків в нейронах гіпоталамуса і гіпокампа зменшувався вміст серотоніну і, як наслідок, знижувалась кількість Т-супресорів і рівень глюкокортикоїдів в крові, тобто дійсно змінювалась імунореактивність організму. У 88,7% цих тварин інтенсивне фізичне навантаження на локомоторний апарат в умовах загального перегрівання організму приводило через 10–15 діб до розвитку в суглобовому хрящі кінцівок дистрофічних і деструктивних змін, схожих на ті, що є у шахтарів при ОА.

Якщо у тварин модель ОА відтворювалась не в повному об'ємі (не виникали деструктивні зміни в суглобовому хрящі), чи не відтворювалась зовсім, то в нейронах гіпоталамуса і гіпокампа внутрішньоклітинний рівень серотоніна статистично значуще не змінювався. Отже, високий рівень серотоніна в нейронах мозку є основною причиною низького відтворення ОА у цих тварин.

В контрольній групі аналогічне фізичне навантаження в умовах загального пе-

регрівання організму без дії електричного поля УВЧ лише в 45% випадків супроводжується виникненням ОА через 1,5–2 місяці, отже, вибраний режим впливу електричним полем УВЧ на скронево-тім'яну область знижує вміст серотоніну в нейронах гіпоталамо-гіпофізарної системи. Як наслідок, зменшується рівень рилізінг-гормонів, а значить і стероїдних гормонів у циркулюючій крові, що знижує міцність адаптаційних механізмів в тканинах суглоба. При цьому активізуються реакції гуморального імунітету, що викликають дистрофічні та деструктивні зміни в тканинах суглоба. Таким чином, сукупність істотних ознак формули дає можливість знизити вміст серотоніну в нейронах гіпоталамо-гіпофізарної системи, що приводить до відтворення механізмів патогенезу ОА як системного захворювання.

Досягнення технічного результату способу, що пропонується, базується на тому, що пошкодження здійснюються впливом УВЧ на скронево-тім'яну область по 12–15 хв щодобово 10–15 діб, після чого підвищують фізичне навантаження на локомоторний апарат, наприклад, біг у тредбані, і одночасно температуру навколишнього середовища, наприклад, до +38–39°C протягом 2–3 годин. Наші дослідження показали, що у 88,7% тварин через 10–15 діб розвивались дистрофічні та деструктивні зміни в суглобовому хрящі кінцівок.

Реалізують спосіб наступним чином. Беруть із віварія тварин, які тримають в однакових умовах, однакових за статтю і віком і адаптують їх до середовища лабораторії. В день дослідження на тварину впливають електричним полем УВЧ на скронево-тім'яну область (апарат УВЧ-66, частота $40,68 \pm 2$ МГц, міцність 30 Вт за допомогою конденсаторних пластин діаметром 0,02 м на скронево-тім'яну область із зазором 0,02 м щодобово протягом 10–15 діб по 12–15 хвилин). Потім інтенсифікують фізичне навантаження на локомоторний апарат тварини бігом протягом 120–180 хвилин на тредбані при температурі навколишнього середовища +38–39°C.

Наводимо конкретні приклади реалізації способу моделювання остеоартрозу, що заявляється.

П р и к л а д 1. Пошук оптимальної тривалості впливу електричним полем УВЧ на скронево-тім'яну область проведено на 6 групах рівноцінних тварин (за вагою, статтю, умовами тримання). 1-а група є контрольною (тварин утримували на станку, розміщували електроди, але вплив ЕП УВЧ не проводили). У тварин 2–6-ї груп вплив ЕП УВЧ (частота

$40,68 \pm 2$ МГц) здійснювали від апарату УВЧ-66 міцністю 30 Вт за допомогою конденсаторних пластин діаметром 0,02 м на скронево-тім'яну область із зазором 0,02 м, щодобово протягом 12 діб і відповідно тривалістю 6, 10, 12, 15 і 17 хвилин. Після останнього сеансу УВЧ-терапії тварин виводили з експерименту (шляхом введення тиопенталу натрію), виділяли сенсомоторну кору, гіпоталамус і заморожували в рідкому азоті. Тканини мозку, що виділили, зважували і гомогенізували при охолодженні в скляних гомогенізаторах протягом 2 хв в 0,3–0,5 мл (для зразків масою менше 10 мг) і в 0,5–0,7 мл (для зразків масою 10–40 мг) 0,02 N CH_3COOH в CH_3OH . Гомогенати центрифугували при 4°C, 12 000 г протягом 20 хв. Супернатанти переносили в пробірки з оргскла (висотою 0,5–1 см) і витримували в поточці теплого повітря протягом декількох хвилин для випаровування рідини, потім до вмісту пробірок добавляли 50–100 мкл 0,1N HCl, отримували концентрований розчин, який містив біогенні аміни та їх метаболіти. Катехоламіни визначали методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВРХ) з електрохімічною детекцією ("LKB", Швеція). Умови хроматографії були наступні: колонка із нержавіючої сталі розміром 250 x 4 мм, яка упакована сорбентом для обернуто-фазової хроматографії Lichrosorb RP-18 с розміром часточок 5 мкм ("LKB"), рухлива фаза, що виготовлена на бідистильованій воді, містила 0,1M NaH_2PO_4 , 1 мМ ЗДТА, 10 мМ NaCl, 5 мг/л натрію октилсульфонату (SOS) і 10% (по об'єму) метилового спирту рН 4,0. Швидкість елюції складала 1 мл/хв. Потенціал склоуглеродного електроду встановлювали рівним +0,65 В. Розчин, що містив катехоламіни, проводили через інжектор ("Rheodyne", Inc., США) з петлею об'ємом 20 мкл в колонку для ВРХ. В циркулюючій крові визначали рівень глюкокортикоїдів, вимірюючи в плазмі крові флюориметричним методом концентрацію сумарних 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС). В селезінці досліджували кількість гемолізінутворюючих клітин (ГУК) методом локального гемолізу в гелі. Про інтенсивність проліферативних процесів в лімфоїдній тканині судили по загальній кількості ядерних клітин селезінки. Статистичну обробку результатів проводили за t-критерієм Ст'юдента. Отримані дані наведені в табл. 1, 2, 3.

Таким чином, тільки в інтервалі 12–15 хвилин впливу ЕП УВЧ на скронево-тім'яну область відбувається статистично значуще зниження вмісту серотоніну в структурах головного мозку.

Приклад 2. Моделювали остеоартроз у щура з шифром НБ004, масою 185 г шляхом впливу ЕП УВЧ (частота $40,68 \pm 2$ МГц) від апарату УВЧ-66 міцністю 30 Вт за допомогою конденсаторних пластин діаметром 0,02 м на скронево-тім'яну область із зазором 0,02 м, щодобово протягом 10 діб і тривалістю 12–15 хвилин. Щодобово після сеансу впливу ЕП УВЧ підвищували фізичне навантаження на локомоторний апарат бігом в тредбані протягом 2-х годин при температурі навколишнього середовища $+38-39^\circ\text{C}$. На 11-у добу тварин виводили із експерименту, в структурах головного мозку досліджували вміст серотоніну, в циркулюючій крові – рівень глюкокортикоїдів (11-ОКС), в селезінці – кількість гемолізіноутворюючих клітин (ГУК). Встановлено, що вміст серотоніну в гіпоталамусі досягав $6,3$ нмоль/г тканини, вміст 11-ОКС складав 98 пмоль/л і кількість ГУК в селезінці – $1,47 \times 10^6$ клітин.

Суглобовий хрящ кінцівок досліджували за допомогою світлооптичних, гістохімічних і електронно-мікроскопічних методів вивчення цитоархітектоніки структурних елементів суглобових тканин, ензиматичного профіля, а також морфометричних показників стану біосинтетичної функції та енергоутворення в клітинах суглобових тканин. Ознаки локальної деструкції суглобових тканин, що відображують порушення адаптаційних механізмів, проявлялись зменшенням товщини середньої зони хряща і фрагментацією його базофільної смужки, потоншенням трабекул субхондральної кістки. В середній зоні суглобового хряща спостерігали зниження на $42,7 \pm 2,1\%$ ($p < 0,01$) оптичної щільності вмісту глікозаміногліканів (ГАГ), зменшення в 2 рази удільного об'єму цистерн гладенької та

гранулярної ендоплазматичної сітки, різке (в 3,8 рази) зниження значень коефіцієнта енергетичної ефективності мітохондрій хондроцитів. В глибокій зоні хряща зменшилась на $37,6 \pm 1,2\%$ ($p < 0,01$) удільна вага гіпертрофічних клітин, пікнотично змінені хондроцити склали $22,0 \pm 1,0\%$.

Лабораторні випробування способу, що заявляється, проведені на 42 щурах

Приведені дані свідчать про виникнення остеоартрозу в суглобах кінцівок і підтверджують вірогідність і швидкість моделювання остеоартрозу.

Таким чином, заявлений спосіб дозволяє відтворювати остеоартроз, за рахунок чого відкривається можливість розробки патогенетично обгрунтованої терапії у шахтарів, скорочується час моделювання патологічного процесу і зменшуються матеріальні витрати на проведення експериментів.

Переважа способу, який заявляється, полягає в тому, що він є універсальним, технічно простим, економічним, інформативним, скорочує час і матеріальні витрати на проведення експериментів, підвищує вірогідність результатів дослідження і забезпечує високе відтворення остеоартрозу – $88,7\%$.

Перераховані переваги визначають перспективність застосування методу в експериментальній біології та медицині для моделювання остеоартрозу, підвищення ефективності відтворення цієї патології та вибіркового тварин. Крім того, спосіб може бути покладений в основу розробки патогенетично обгрунтованої терапії професійного остеоартрозу у шахтарів, а також змін метаболізму біогенних амінів в нейронах мозку, перевірки імуномодулюючого ефекту різних впливів на організм.

Таблиця 1

Вміст серотоніна в структурах головного мозку щурів (нмоль/г тканини) при різній тривалості впливу ЕП УВЧ на скронево-тім'яну область

№ п/ч	Група	Тривалість впливу ЕП УВЧ (хв)	Вміст серотоніна	
			сенсомоторна кора	гіпоталамус
1	1-а	Контроль	$1,215 \pm 0,033$	$1,047 \pm 0,041$
2	2-а	6	$1,735 \pm 0,036$	$1,458 \pm 0,035$
3	3-я	10	$1,434 \pm 0,029$	$1,211 \pm 0,028$
4	4-а	12	$1,073 \pm 0,020$	$0,655 \pm 0,030$
5	5-а	15	$1,005 \pm 0,018$	$0,660 \pm 0,034$
6	6-а	17	$0,986 \pm 0,037$	$0,670 \pm 0,040$

Таблиця 2

Вміст 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) в плазмі крові (пмоль/л) при різній тривалості впливу ЕП УВЧ на скронево-тім'яну область

№ п/ч	Група	Тривалість впливу ЕП УВЧ (хв)	Вміст 11-ОКС
1	1-а	Контроль	166 ± 14
2	2-а	6	215 ± 13
3	3-я	10	184 ± 11
4	4-а	12	103 ± 15
5	5-а	15	95 ± 17
6	6-а	17	106 ± 14

Таблиця 3

Вміст прямих гемолізінутворюючих клітин (ГУК) в селезінці при різній тривалості впливу ЕП УВЧ на скронево-тім'яну область

№ п/ч	Група	Тривалість впливу ЕП УВЧ (хв)	Вміст ГУК · 10 ⁶ спленоцитів
1	1-а	Контроль	2,31 ± 0,11
2	2-а	6	4,13 ± 0,31
3	3-я	10	3,87 ± 0,39
4	4-а	12	1,63 ± 0,12
5	5-а	15	1,42 ± 0,14
6	6-а	17	1,94 ± 0,16

Упорядник

Техред М Келемеш

Коректор О Обручар

Замовлення 4602

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101