

Osteochondrosis in horses. Part II. Diagnosis and prognosis

Kliczkowska K.¹, Bereznowski A.²,
Sapierzyński R.¹, Department of Pathology and
Veterinary Diagnostic¹, Department of Large
Animal Diseases with Clinic², Faculty of Veterinary
Medicine, Warsaw University of Life Sciences –
SGGW

This paper aims at the presentation of osteochondrosis (OC), a disease characterized by abnormal differentiation of growth cartilage. Recently, osteochondrosis became very important problem in equine medicine and horse breeding. It has been recognized in more than 30% horses of certain breeds. This led to numerous studies conducted during last 10 years. There are many investigations concerning new diagnostic tools including measurement of cartilage breakdown biomarkers (like Coll2-1, Coll2-1 NO2 and CPII) concentrations in serum and/or synovial fluid. Interesting diagnostic possibilities are also provided by ultrasonography. Radiography is still the most important diagnostic tool and remains the gold standard of OC diagnosis – arthroscopy.

Keywords: osteochondrosis, diagnostic tools, horse.

Rozpoznawanie choroby

W diagnostyce osteochondrozy u koni najczęściej wykorzystywaną metodą badań dodatkowych jest badanie radiologiczne. Jednakże nie zawsze jest możliwe rozpoznanie tą metodą niektórych postaci choroby, dlatego prowadzone są prace nad zastosowaniem innych metod diagnostycznych, takich jak badanie ultrasonograficzne lub tomografia komputerowa. Wiele uwagi poświęca się też biomarkerom zapalenia i degradacji tkanki chrzęstnej, zwłaszcza że ich stężenia można badać nie tylko w mazi stawowej, ale też w surowicy, co ułatwia uzyskanie materiału do badań. Jednak wyniki większości doświadczeń porównywane są nadal do wyników oceny artroskopowej stawu, która w dalszym ciągu pozostaje złotym standardem w rozpoznawaniu osteochondrozy.

Badanie radiologiczne

Badanie radiologiczne jest najstarszą i najczęściej stosowaną metodą rozpoznawania uszkodzeń struktur układu kostno-stawowego, co ma również miejsce w przypadku osteochondrozy. Stosuje standardowe techniki radiologiczne pozwalające uwiocznienie uszkodzenia kości pod chrząstkami stawowymi. Znanych jest wiele schematów wykonywania tych badań i wiele skal oceny uwiocznionych zmian. Najbardziej znana i najczęściej stosowana jest skala

Osteochondroza u koni. Część II. Rozpoznawanie i rokowanie

Katarzyna Kliczkowska¹, Andrzej Bereznowski², Rafał Sapierzyński¹

z Zakładu Patomorfologii Zwierząt Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej¹
oraz Zakładu Chirurgii Katedry Chorób Dużych Zwierząt² Wydziału Medycyny
Weterynaryjnej w Warszawie

oceny zaproponowana przez Dika i wsp. (1), wprowadzająca 5 stopni oceny radiologicznej kości pod chrząstkami stawowymi:
A – brak zmian,
B – gładkie spłaszczenie konturu kości,
C – nieregularne spłaszczenie konturu kości,
D – obecność niewielkiego fragmentu kostno-chrzęstnego w stawie,
E – obecność dużego fragmentu kostno-chrzęstnego w stawie.

Badanie histopatologiczne

Najbardziej popularną skalą oceny osteochondrozy dającą jednocześnie obraz zmian histopatologicznych towarzyszących temu schorzeniu jest skala Van Wереena (2), w której obserwowane zmiany podzielono na 4 stopnie zaawansowania:

- stopień 0 – brak zmian patologicznych;
- stopień 1 – zachowany normalny układ chondrocytów, „wklęsły” front kostnienia (miejscowe zgrubienie warstwy chrząstki);
- stopień 2 – „wklęsły” front kostnienia, nieregularna linia kostnienia, zaburzony prawidłowy układ kolumnowy chondrocytów;
- stopień 3 – do powyższych zmian dochodzą pojawiające się szczeliny i martwica w głębokich warstwach chrząstki, na granicy z frontem kostnienia, powierzchnia chrząstki stawowej pozostaje niezmienną;
- stopień 4 – uszkodzenie chrząstki wraz z jej powierzchnią stawową, mogą być obecne wolne fragmenty kostno-chrzęstne w stawie i torbiele.

W przypadku gdy mamy do czynienia z formą *dissecans*, czyli obecnością wolnych fragmentów kostno-chrzęstnych w stawie, to histologicznie są one fragmentami tkanki kostnej ulegającymi martwicy, pokrytymi warstwą tkanki chrzęstnej (3).

Badanie ultrasonograficzne

Ta metoda badania ma zastosowanie w rozpoznawaniu zmian zlokalizowanych w miejscach niedostępnych do obrazowania metodami radiologicznymi.

Przykładowo, sporo trudności diagnostycznych przysparzają zmiany zlokalizowane na kostce przyśrodkowej nasady dalszej kości piszczelowej. W jednej z prac przeprowadzono porównanie wyników otrzymanych poprzez badanie radiologiczne z wynikami z badania ultrasonograficznego tej struktury (4). Próbowano też określić najbardziej efektywną projekcję rentgenowską dla uwiocznienia zmian kostki przyśrodkowej. Takie same czynności wykonano dla ślimaka grzebienia kości piszczelowej. Wykonano badania radiologiczne, ultrasonograficzne, a następnie artroskopowe 111 stawów stępu koni.

W badaniu rentgenowskim zastosowano następujące projekcje:

- DP (dorsoplantar): grzbietowo-podeszwowa,
- LM (lateromedial): boczno-przyśrodkowa,
- D45L-PIMO (dorso45°lateral-plan-taromedial oblique): grzbietowo-boczna-podeszwowo-przyśrodkowa skośna o nachyleniu 45°,
- D30L-PIMO (dorso30°lateral-plan-taromedial oblique): grzbietowo-boczna-podeszwowo-przyśrodkowa skośna o nachyleniu 30°,
- D45M-PILO (dorso45°medial-plan-tarolateral oblique): grzbietowo-przyśrodkowo-podeszwowo-boczna skośna o nachyleniu 45°.

Artroskopowo uwioczniono 94 zmiany na grzebieniu ślimaka kości piszczelowej i 24 na kostce przyśrodkowej. Porównano wyniki badania artroskopowego z wynikami radiologicznymi i okazało się, że czułość badania rentgenowskiego wyniosła 96% dla grzebienia ślimaka (82% z nich było najlepiej widoczne przy D45M-PILO), 71% dla kostki przyśrodkowej (tutaj 94% zmian było najlepiej widocznych przy D30L-PMO). Czułość badania ultrasonograficznego wyniosła odpowiednio 83 i 98%. W badaniu ultrasonograficznym najlepszy obraz uzyskano w przypadku kostki przyśrodkowej (80%) przez skan poprzeczny (oprócz zmian zlokalizowanych w chrząstce stawowej), a dla grzebienia ślimaka przez skan podłużny (100%). W odróżnieniu od badania radiologicznego, ultrasonografia pozwala także na ocenę tchchrząstki stawowej na kostce przyśrodkowej, osiągając czułość

50% w skanie podłużnym. Nie można niestety ocenić powierzchni chrząstki stawowej grzebienia ślimaka ze względu na niemożność ułożenia sondy prostopadle do tej powierzchni. Badanie ultrasonograficzne jest więc cennym narzędziem mogącym zastąpić badanie radiologiczne w sytuacjach, kiedy objawom klinicznym nie towarzyszą zmiany radiologiczne.

Podobne badanie przeprowadzono na 36 zmienionych stawach udowo-rzepakowych 22 koni rasy pełnej krwi angielskiej w wieku od 12 do 18 miesięcy (5). Porównano czułość badania radiologicznego i ultrasonograficznego bloczka kości udowej w stosunku do badania artroskopowego. Wykonano następujące projekcje rentgenowskie:

- LM: boczo-przyśrodkową,
- Ca60°L-CrMO: doogonowo-boczną-przednio-przyśrodkową skośną o nachyleniu 60°,
- AP: doczaszkowo-dooonową,
- LM Flex: boczną w zgięciu stawu.

Zmiany oceniano w skali 4-stopniowej, gdzie:

- 0 – brak zmian;
- 1 – ścięły lub wklęsły kontur bloczka, przy czym może występować lekkie zagęszczenie cienia kości podchrzęstnej;
- 2 – brak ciągłości linii konturu bloczka z umiarkowanym zagęszczeniem cienia kości podchrzęstnej;
- 3 – fragmentacja powierzchni bloczka z silnie nasilonym zagęszczeniem cienia kości podchrzęstnej.

Następnie wykonano badanie ultrasonograficzne w skanach poprzecznym i podłużnym. Zmiany oceniano według skali:

- 0 – brak zmian;
- 1 – widoczna echogeniczna powierzchnia stawowa chrząstki z wklęśnięciami, ale z zachowaną ciągłością;
- 2 – hiperechogenna powierzchnia kości podchrzęstnej ze umiarkowaną nieregularnością i miejscowym brakiem ciągłości;
- 3 – całkowite przerwanie ciągłości echogenicznej powierzchni stawowej, hiperechogenna kość podchrzęstna z licznymi nieregularnościami i przerwami ciągłości pokryta heteroechoennym materiałem.

Podczas oceny artroskopowej stopnia degradacji chrząstki użyto następującej skali:

- 0 – brak zmian;
- 1 – ścięły lub wklęsły kontur powierzchni stawowej, przy czym może występować lekkie zagęszczenie cienia kości podchrzęstnej;
- 2 – brak ciągłości linii konturu powierzchni stawowej z umiarkowanym zagęszczeniem cienia kości podchrzęstnej.

- 3 – fragmentacja powierzchni stawowej z silnie nasilonym zagęszczeniem cienia kości podchrzęstnej.

Czułość badania rentgenowskiego wyniosła dla bocznej krawędzi bloczka kości udowej 84%, a dla przyśrodkowego 88%. Najbardziej czułe okazały się projekcje: LM (77 i 88%) i Ca60°L-CrMO (84 i 75%). Ultrasonografia wyniosła dla obu krawędzi czułość 100%, co sugeruje, że może być z powodzeniem używana do wykrywania zmian typowych dla osteochondrozy bloczka kości udowej.

Biomarkery zapalenia i degradacji chrząstki

Duże zainteresowanie lekarzy praktyków budzi możliwość diagnozowania osteochondrozy za pomocą pomiaru stężenia biomarkerów zapalenia oraz produktów degradacji chrząstki, zarówno w mazi stawowej, jak i w surowicy. Pomiar takie mogłyby się okazać przydatne zwłaszcza w dużych grupach koni, ponieważ procedura pobrania krwi jest o wiele szybsza i mniej kosztowna do przeprowadzenia, niż badanie rentgenowskie. W ten sposób tylko konie z podwyższonymi stężeniami poszczególnych biomarkerów w surowicy kwalifikowałyby się do przeprowadzenia badania rentgenowskiego, w celu dokładnej lokalizacji zmian.

Celem jednego z badań (6) było ustalenie rzetelnej metody pomiaru ilości glikoaminoglikanów (GAG), jako produktów degradacji chrząstki stawowej, oraz innych parametrów w mazi stawowej, w celu ustalenia nasilenia procesów degradacji chrząstki stawowej. Pobrano próbki mazi stawowej od 29 koni powyżej 2 roku życia, z rozpoznaną radiologicznie osteodystrofią oddzielającą grzebienia ślimaka kości piszczelowej, w tym 11 próbek od 8 koni (w wieku 2–6 lat) nie wykazujących objawów klinicznych choroby (kulawizna lub powiększenie obrysu stawu), 25 od 16 koni (w wieku 2–13 lat) wykazujących takie objawy oraz 10 od 5 koni zdrowych (w wieku 3 lat). Oprócz zawartości GAG, w postaci kwasu hialuronowego (HA) i siarczanu chondroityny (CS), badano lepkość mazi stawowej za pomocą rozciągania między kciukiem, a palcem wskazującym (normalna maź daje się rozciągnąć na ok. 5–6 cm, średnioleпка 2–5 cm, a maź o obniżonej lepkości poniżej 2 cm). Liczbę białych krwinek obliczano w komorze Neubauera po odwirowaniu mazi, w supernatancie określano zawartość białek. Mierzono też stężenie mocznika w mazi stawowej oraz w surowicy.

W grupie kontrolnej obserwowano normalną (7/10) lub średnią (3/10) lepkość mazi, podczas gdy w grupie ze

stwierdzoną radiologicznie osteochondrozą oddzielającą nie wykazującą objawów klinicznych ciągłość była normalna (7/11), średnia (3/11) lub niska (1/11). W grupie z objawami klinicznymi osteochondrozy: normalna lepkość obserwowana była tylko u 3/25 koni, średnia u 14/25, a niska u 8/25 koni. Liczba krwinek białych w mazi stawowej była znacznie wyższa w obu grupach z osteochondrozą (od 100 do nawet 1400 x 10⁹/l), niż u koni zdrowych (od 20 do 170 x 10⁹/l). Zawartość białka i mocznika w mazi stawowej nie różniła się znacząco pomiędzy grupami.

Zawartość kwasu hialuronowego i siarczanu chondroityny oznaczano za pomocą kombinacji elektroforezy w żelu agarozowym i degradacji enzymatycznej przy udziale swoistych liaz. Stężenie kwasu hialuronowego w mazi było o 30% wyższe u koni z objawami osteochondrozy (1013 µg/ml), niż w grupie kontrolnej (772 µg/ml). Jednak stosunek kwasu hialuronowego do mocznika był tylko nieznacznie podwyższony (3,78 i 2,92). Elektroforeza w żelu agarozowym wykazała, że masa cząsteczkowa kwasu hialuronowego z mazi o średniej lub niskiej lepkości była mniejsza, niż w normalnej mazi. Wyjaśnia to, dlaczego stężenie kwasu hialuronowego w mazi koni z grupy z objawami osteochondrozy było podwyższone, mimo obniżonej lepkości. Cząsteczki kwasu hialuronowego produkowane są przez syntazy kwasu hialuronowego (hyaluronic acid synthases – HAS). HAS-1 i HAS-2 produkują łańcuchy o wysokiej masie cząsteczkowej, zaś HAS-3 o niskiej. W badaniach *in vitro* wykazano, że wysokie stężenie siarczanu chondroityny i interleukiny 1-β pobudza syntezę HAS-1 i HAS-2, ale nie HAS-3, dlatego niska masa cząsteczkowa kwasu hialuronowego nie jest prawdopodobnie wynikiem syntezy mniejszych łańcuchów (7). Za niską masę łańcuchów kwasu hialuronowego odpowiedzialne są prawdopodobnie hialuronidazy, których ekspresja rośnie podczas reakcji zapalnej, co potwierdza duża liczba leukocytów w mazi. Stężenie siarczanu chondroityny w mazi w obu grupach koni z osteochondrozą, zarówno w grupie koni z objawami klinicznymi (170 µg/ml), jak i w grupie nie wykazującej objawów klinicznych choroby (144 µg/ml) było wyższe niż w grupie kontrolnej (50 µg/ml). Podwyższony był też stosunek CS/ mocznik (odpowiednio: 0,63, 0,45, 0,19) i CS/ HA (0,197, 0,190, 0,072).

Jak wykazuje opisane badanie, ocena stężenia siarczanu chondroityny w mazi może być przydatna do wykrywania zmian nie dających objawów klinicznych. Wzrost stężenia chondroityny w grupie

bezobjawowej wskazuje na potrzebę leczenia tych koni, ponieważ oznacza on, że mimo braku objawów klinicznych, zachodzi niszczenie chrząstki stawowej.

W innym badaniu mierzono stężenia markerów metabolizmu kolagenu kości i chrząstki stawowej u źrebiąt w różnych grupach żywieniowych (8). Matki źrebiąt karmiono jednakowo przez cały okres ciąży. Po urodzeniu odnotowano masę ciała, wysokość w kłębie i obwód nadpęcia źrebiąt, po czym zostały one podzielone na 2 grupy: żywione intensywnie (20 koni) i żywione umiarkowanie (19 koni). Wszystkie konie dostawały pełnowartościową dietę, zbilansowaną pod względem energii, białka, witamin i soli mineralnych. Źrebięta z grupy żywionej intensywnie dostawały przez pierwsze 2 miesiące 120% właściwej dawki pokarmowej, a od 3 do 12 miesiąca 150% dawki. Wykonano zdjęcia rentgenowskie (projekcje boczne stawów: śródstopowo/śródręczno-palcowego, stępu i udowo-rzepakowego) w wieku 5,5 i 11 miesięcy oraz badanie sekcyjne stawów w wieku 12 miesięcy u 8 źrebiąt z każdej grupy (wybrano te, które wykazywały najsilniejsze zmiany patologiczne). Zmiany oceniano w 4-stopniowej skali według van Wereena i Barnewelda. Krew pobierano 8-krotnie od wieku 2 tygodni do 13 miesięcy i badano w surowicy stężenie markerów metabolizmu tkanki kostnej (w postaci osteokalcyny i C-końcowego telopeptydu kolagenu (CTX-1, czyli C-terminal telopeptide type I collagen) i chrzęstnej (produkty degradacji kolagenu typu II – C_{PII}, C_{2C}). Intensywność żywienia źrebiąt okazała się nie mieć wpływu na stężenie biomarkerów uszkodzenia chrząstki we krwi ani na rozwój osteochondrozy. Przyczyną tego może być fakt, że w doświadczeniu zwiększono co prawda ilość pokarmu, ale nadal pozostał on dietą w pełni zbilansowaną.

Z kolei stężenie osteokalcyny we krwi źrebiąt badane w wieku 2 tygodni okazało się mieć ścisły związek z występowaniem zmian radiologicznych podczas badania w wieku 5,5 oraz 11 miesięcy. Zwierzęta z najwyższymi indeksami sekcyjnymi (suma punktów za wszystkie znalezione zmiany osteochondrozy) wykazywały stężenie osteokalcyny we krwi 300 ng/ml i więcej. Zaobserwowano też wpływ stężenia C_{PII}/C_{2C} w wieku 5 miesięcy na zmiany końcowe stwierdzone w stawach podczas badania sekcyjnego.

Kolejnymi potencjalnie przydatnymi w diagnostyce osteochondrozy wskaźnikami są biomarkery metabolizmu kolagenu. Aby sprawdzić jak zmienia się stężenie C_{PII} (wskaźnik syntezy kolagenu typu II) i C_{2C} (wskaźnik degradacji kolagenu typu II) w trakcie uszkodzenia stawu w trakcie osteochondrozy lub

podczas urazu mechanicznego, badano ich stężenia w mazi stawowej pobranej od koni z osteochondrozą oddzielającą i koni ze złamaniem śródstawowym. Pobrano próbki z 38 stawów od 18 koni (6 z nich miało zdiagnozowane złamanie śródstawowej kości nadgarstka, a 12 koni osteochondrozę oddzielającą grzebień ślimaka kości piszczelowej i/ lub kostki bocznej nasady dalszej kości piszczelowej) i porównano je z 12 próbkami pobranymi ze stawów koni z grupy kontrolnej (9). U 16 koni oceniono artroskopowo stopień nasilenia zmian, aby zbadać zależność między nasileniem zmian a stężeniem C_{PII} i C_{2C}, jednak nie zauważono związku między nimi. Stężenie wyżej wymienionych czynników badano za pomocą testu ELISA. Stężenie C_{2C} w mazi ze stawów ze złamaniem śródstawowym wynosiło 239 (93–414) ng/ml, w stawach dotkniętych osteochondrozą oddzielającą – 121 (58–197) ng/ml i w stawach kontrolnych – 108 (75–140) ng/ml. Jeśli zaś chodzi o C_{PII}, to jego stężenie w mazi stawów ze złamaniem wynosiło 5803 (2656–8624) ng/ml, w stawach z osteochondrozą oddzielającą – 1316 (164–4641) ng/ml, a w kontrolnych 853 (407–1579) ng/ml. Stężenie C_{2C} było więc statystycznie wyższe w stawach z osteochondrozą oddzielającą w porównaniu do stawów zdrowych, zaś stężenie C_{PII} było statystycznie wyższe w stawach ze złamaniem śródstawowym (w porównaniu do zdrowych). W złamaniu śródstawowym mamy do czynienia z ostrym uszkodzeniem chrząstki, dlatego nasiloną syntezą składników macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix – ECM) jest procesem oczekiwany i odzwierciedlany przez wzrost stężenia C_{PII}. Natomiast osteochondroza oddzielająca jest procesem przewlekłym z nasilającą się degradacją chrząstki, co odzwierciedla wysokie stężenie C_{2C} w mazi jako produktu degradacji kolagenu. Ponieważ jednak nie wykazano korelacji stężenia C_{2C} i C_{PII} z nasileniem zmian stwierdzanych podczas artroskopii, należy jeszcze podchodzić ostrożnie do wartości diagnostycznej tych markerów.

Kolejnym produktem degradacji kolagenu, którego stężenie mierzyć można zarówno w mazi stawowej, jak i we krwi, jest Coll2-1 i jego pochodna Coll2-1 NO₂. W jednym z doświadczeń badano stężenie Coll2-1, Coll2-1 NO₂ i aktywność mieloperoksydazy (MPO, enzym wytwarzany przez neutrofile) w mazi stawowej 45 koni z usuniętym artroskopowo fragmentem z grzebienia ślimaka kości piszczelowej (10). Znaczące różnice pomiędzy grupą kontrolną a końmi dotkniętymi osteochondrozą oddzielającą znalezione w przypadku stężenia Coll2-1 w mazi

i było ono wyższe u koni chorych (225 ng/ml) niż u zdrowych (170 ng/ml). Aktywność MPO nie wykazała wzrostu w grupie koni chorych, co autorzy tłumaczą brakiem nasilonych stanów zapalnych w badanych stawach.

Następnie ci sami autorzy pobrali próbki krwi i mazi stawowej od 63 koni w wieku 3,5 roku \pm 2 lata, u których znaleziono wolny fragment chrzęstno-kostny w stawie stępowo-podudziowym w celu zbadania stężenia Coll2-1, Coll2-1 NO₂ i MPO (11). Przeprowadzono artroskopowe usunięcie fragmentu, podczas którego oceniano nasilenie procesu zapalnego oraz zmian zwyrodnieniowych w stawie. Nasilenie zapalenia oceniano w skali 3-punktowej, biorąc pod uwagę występowanie przekrwienia, wybroczyn, pogrubienia i gęstnienia kosmków maziówki, nieprawidłowy wygląd kosmków, obecność wolnych fragmentów chrzęstno-kostnych w stawie, ścięczenie chrząstki z nalotem włóknikowym lub zrostami. Oceniano też uszkodzenie chrząstki w skali 3-punktowej i rozległość zmian w skali 4-punktowej. Konie podzielono na 3 grupy na podstawie nasilenia zmian: A – najmniej nasilone zmiany; B – średnio nasilone zmiany; C – bardzo nasilone zmiany, oddzielnie pod kątem zapalenia i pod kątem uszkodzenia chrząstki.

Wyraźnie podwyższony był poziom Coll2-1 we krwi koni grupy ze zniszczeniem chrząstki C (725,61–857,93 nM/ml) w porównaniu do grup A i B (636,16–756,75 i 659,65–778,17 nM/ml) oraz jego poziom w mazi był wyższy w grupach B i C (16,56–382,79 i 63,43–430,88 nM/ml) niż w A (19,35–297,96 nM/ml). Badanie stężenia Coll2-1 daje więc nadzieję na możliwość małoinwazyjnej oceny zmian zwyrodnieniowych w stawach.

Niestety, w innym badaniu (12), w którym porównywano status radiologiczny (brano pod uwagę zmiany o charakterze osteochondrozy, chorobę zwyrodnieniową stawów i powiększenie obrysu stawu kopytowego) 63 ogierów gorąckrwistych, ze stężeniem IGF-1, MPO, Coll 2–1, Coll 2–1 w surowicy, nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem tych biomarkerów a zmianami radiologicznymi oraz między stężeniem biomarkerów we krwi u koni z osteochondrozą i bez osteochondrozy.

Mikrotomografia komputerowa

Kolejną metodą, która może mieć zastosowanie w diagnostyce osteochondrozy u koni jest mikrotomografia komputerowa (13). Mikrotomografia jest narzędziem obrazowania, które pozwala na bardzo dokładne odwzorowanie w trójwymiarze niejednorodnych mikrostruktur

badanego obiektu przy rozdzielczości rzędu 1 mm. W badaniu z użyciem mikrotomografii usypiano kolejno 9 źrebiąt od rodziców z osteochondrozą stawu stawowo-podudziowego w wieku 12 godzin życia, w pierwszym tygodniu życia, w drugim (tu dwa źrebięta), następnie co tydzień, aż do siódmego tygodnia życia. W jednej kończynie miednicznej sporządzano *post mortem* trwały angiogram za pomocą roztworu baru i pobierano próbki z 2 miejsc predylekcyjnych dla osteochondrozy (grzebień ślimaka kości piszczelowej oraz grzebień boczny bloczka kości skokowej) w stawie stawowo-podudziowym. Następnie próbki skanowano mikrotomografem komputerowym i poddano analizie jako skrawki 2D oraz przekształcono na modele trójwymiarowe, by ostatecznie poddać je badaniu histopatologicznemu. Źrebięta 0, 4 i 5 (numery pochodzą od tygodnia życia źrebiąt, w którym poddano je eutanazji) nie wykazywały zmian patologicznych w badanych stawach, potraktowano je więc jako grupę kontrolną. U źrebiąt 1, 2a, 2b i 3 znaleziono potwierdzone histopatologicznie zmiany patologiczne chrząstki grzebienia ślimaka kości piszczelowej, natomiast u źrebiąt 1, 6 i 7 zmiany grzebienia bocznego bloczka kości skokowej. W miejscach, gdzie za pomocą mikrotomografii można było zaobserwować zaburzenia w kostnieniu śródchrzęstnym, histopatologicznie były widoczne martwicze kanały chrzęstne, otoczone ogniskami martwicy niedokrwiennej chondrocytów. Obszary te znajdowały się na granicy pomiędzy frontem kostnienia a chrząstką nasadową. Za pomocą mikrotomografu udało się zobaczyć wszystkie zmiany, jednak w przypadku dwóch zmian położonych w bliskiej odległości od siebie widać je było jako jedną. Nie można też rozróżnić poszczególnych komórek i macierzy pozakomórkowej. W obecności kontrastu można obserwować przebieg naczyń krwionośnych, jednak nie da się ocenić, czy naczynie jest niezmiennione, czy ulega fizjologicznej mineralizacji wraz z posuwającym się frontem kostnienia lub ulega martwicy. Dzięki modelowi 3D można było bardzo dobrze obserwować zmiany w sieci unaczynienia, jakie zachodzą podczas procesu kostnienia śródchrzęstnego, a co za tym idzie – prowadzić obserwacje dotyczące patogeny osteochondrozy. Mikrotomografia komputerowa ma więc obecnie w przypadku osteochondrozy znaczenie bardziej naukowe, niż diagnostyczne.

Rokowanie co do dalszego użytkowania koni

Osteochondroza wpływa znacząco na pogorszenie użyteczności koni. Rokowanie

zależy jest od umiejscowienia, stopnia nasilenia zmiany oraz od tego, czy wdrożone zostało leczenie operacyjne. Ze względu na charakter powstawania osteochondrozę zalicza się do tzw. ortopedycznych zaburzeń rozwojowych (developmental orthopaedic diseases – DODs). W jednej z prac badano wpływ obecności DOD w różnych odcinkach układu kostno-stawowego na liczbę późniejszych startów i osiągnięcia sportowe u koni 3-letnich (14). Porównano 137 ogierów zdrowych i 78 ze zmianami o charakterze ortopedycznych zaburzeń rozwojowych, potwierdzonymi radiologicznie w wieku 3 lat. Następnie sumowano liczbę późniejszych startów koni w zawodach skokowych, a także punktowano ich starty ze względu na zajęte miejsce. Kiedy brano pod uwagę wszystkie konie z ortopedycznymi zaburzeniami rozwojowymi, bez względu na lokalizację zmian chorobowych, to wykazywały one zbliżoną liczbę startów i osiągały podobne wyniki sportowe do koni zdrowych. W grupie koni z osteodystrofią oddzielającą dogrzebietowej części grzebienia pośrodkowego kości śródreżca/śródstopia III obserwowano statystycznie niższą liczbę startów w stosunku do koni z grupy kontrolnej. Także DOD (a zwłaszcza osteochondroza oddzielająca) stawu kolanowego obniżało statystycznie zarówno liczbę startów, jak i osiągnięte wyniki sportowe. Również konie z osteochondrozą (bez wolnego fragmentu chrzęstno-kostnego w stawie) kłykcia bocznego bloczka kości udowej startowały rzadziej. Z tego wynika, że rokowanie co do przyszłości sportowej wobec koni ze zmianami o charakterze osteochondrozy oddzielającej dogrzebietowej części grzebienia pośrodkowego kości śródreżca/śródstopia III oraz z osteochondrozą w obrębie stawu kolanowego powinno być ostrożniejsze niż koni ze zmianami zlokalizowanymi w innych miejscach.

W kolejnym doświadczeniu 190 kłusaków francuskich poddano badaniu radiologicznemu (staw pięciny, nadgarstkowy, staw stawu i kolanowy) przed opuszczeniem stajni hodowlanej w celu udania się na trening wyścigowy (15). 77 koni (40,5%) nie zakwalifikowało się na trening wyścigowy, z czego 15 (31% koni niezakwalifikowanych) z powodu objawów radiologicznych. 5 z koni niezakwalifikowanych zostało poddanych chirurgicznemu usunięciu fragmentu chrzęstno-kostnego, w wyniku czego 4 z nich udało się następnie zakwalifikować do treningu. Według wcześniejszych badań około 80% koni poddanych artroskopowemu usunięciu odłamka chrzęstno-kostnego może się ścigać (16, 17). Liczba zmian radiologicznych zmniejszała

szanse na kwalifikację do treningu jedynie wśród koni, u których objawy radiologiczne sklasyfikowano jako zaawansowane. Zwłaszcza zmiany o charakterze osteochondrozy kłykcia bocznego kości udowej znacznie obniżały zakwalifikowanie koni (tylko 25% koni z osteochondrozą kłykcia zostało zakwalifikowanych) na trening wyścigowy.

W kolejnym badaniu (18) dotyczącym kłusaków francuskich przebadano radiologicznie stawy palców, śródreżczno/śródstopowo-palcowe, stawu i kolanowe u 865 koni. U 363 z nich (42%) znaleziono zmiany patologiczne. Następnie konie zostały poddane treningowi wyścigowemu, po którym badano, czy obecność zaawansowanych zmian radiologicznych (u koni niepoddanych leczeniu chirurgicznemu) wpłynęła znacząco na długość kariery wyścigowej. U koni, których kariera wyścigowa trwała tylko rok wykazano $1,21 \pm 1,88$ wyraźnie nasilonych zmian w badaniu rentgenowskim, w porównaniu do koni startujących 2 lata ($0,4 \pm 1,05$ zmian), 3 lata ($0,6 \pm 0,92$) i 4 lata ($0,32 \pm 0,67$), co potwierdza, że obecność znacznie nasilonych zmian radiologicznych skraca długość kariery wyścigowej.

Model dojrzewania i różnicowania się chondrocytów podczas kostnienia śródchrzęstnego

Model różnicowania i dojrzewania chondrocytów *in vitro* został opracowany i opisany w 2007 r. (19). Pozwala on na dokładne zbadanie procesu kostnienia śródchrzęstnego. Wiedza na temat obrazu komórek, jakie można obserwować podczas fizjologicznego procesu kostnienia śródchrzęstnego umożliwi rozpoznanie patologii w przypadku zaburzeń w procesie kostnienia. W doświadczeniu tym pobierano chondrocyty z chrząstki stawu śródreżczno-palcowego płodów (3,6 i 9 miesiące ciąży), źrebiąt 7-dniowych, rosnących (6–12 miesięcy) i dorosłych koni w wieku 17 lat. Hodowle uzyskane z chondrocytów płodowych i hodowane przy użyciu surowicy końskiej składały się z 2 rodzajów hipertroficznymi chondrocytów – jasnych i ciemnych, rozłożonych równomiernie w obrębie peletu. Ciemne chondrocyty zawierały ciemne jądro i bardzo obfitą szorstką siateczkę śródplazmatyczną (RER). Jasne posiadały jasne jądro i słabo rozwiniętą RER. Ciemne chondrocyty obumierały, „wyciskając” cytoplazmę do macierzy pozakomórkowej (extracellular matrix – ECM), podczas gdy w jasnych następował rozpad cytoplazmy bez przerwania ciągłości błony komórkowej. Po 14 dniach hodowli chondrocyty płodowe utworzyły obraz chrząstki szklistej – położone były

w jamkach rozłożonych równomiernie w gęstej ECM, a w niektórych obszarach utworzyły układ kolumnarny podobny do tego w rosnącej chrząstce. Pelet otaczały spłaszczone komórki przypominające perichondrium. Hipertrofia komórek zauważalna była już po 14 dniach hodowli, a po 21 dniach obejmowała więcej niż 80% chondrocytów. Hipertrofię potwierdzono pomiarem ekspresji kolagenu typu X, aktywnością fosfatazy zasadowej w dniu 21 i wzrastającą mineralizacją ECM od 7 do 21 dnia hodowli. Wzrosła grubość i ciężar peletów, zmalało zagęszczenie komórek. Po 14 dniach zwiększona była ekspresja kolagenu typu II i białka Sox9 odpowiadających za różnicowanie się chondrocytów (Sox 9 zwiększa też ekspresję kolagenu typu II). Czynniki transkrypcji RunX odpowiedzialny u myszy za hipertrofię chondrocytów wykazał zwiększoną ekspresję po 14 dniach, wtedy zauważalne były pierwsze komórki hipertroficzne. Ekspresja MMP-13 (metaloproteinaza macierzy biorąca udział w degradacji ECM podczas kostnienia śródcchrzęstnego) i czynnik wzrostu tkanki łącznej (connective tissue growth factor – CTGF), którego ekspresja jest pobudzana przez hipertroficzne chondrocyty, była wyższa po 21 dniach. Aktywacja receptora dla czynnika wzrostu fibroblastów ((fibroblast growth factor receptor – FGFR3) hamuje hipertrofię chondrocytów i w 14 dniu doświadczenia jego ekspresja była obniżona. Wygląda więc na to, że chondrocyty pobrane od płodów końskich i hodowane jako pelety w surowicy końskiej lub płodowej surowicy bydłowej mogą być z powodzeniem używane w doświadczeniach jako model różnicowania się i dojrzewania chondrocytów podczas kostnienia śródcchrzęstnego chrząstki szklistej.

Osteochondroza jest tematem bardzo aktualnym zarówno dla lekarzy hipiatrów, jak i hodowców oraz właścicieli koni. Na bazie przytoczonych doświadczeń naukowych można zauważyć, że trwają ciągle prace nie tylko nad dogłębnym zbadaniem patogenezы wszystkich trzech postaci osteochondrozy (*latens, manifesta i dissecans*), ale przede wszystkim nad opracowaniem wiarygodnych metod wczesnego wykrywania choroby. Ze względu na to, jak obecnie użytkowane są konie, nie należy się spodziewać zmniejszenia intensyfikacji chowu i zaprzestania dążenia do hodowania wyższych i bardziej umięśnionych zwierząt. Jedyną bronią w walce z osteochondrozą pozostaje więc wczesne wykrywanie choroby przy względnie niskich kosztach, na przykład przez badanie stężeń odpowiednich markerów degradacji chrząstki w surowicy. Jest to tym bardziej istotne,

że w badaniu radiologicznym nie zawsze udaje się wykazać bardzo wczesne stadia choroby i nie każdy ma dostęp do aparatu rentgenowskiego. Duże nadzieje na poprawę możliwości diagnostycznych daje też badanie ultrasonograficzne.

Być może dzięki możliwościom stworzenia dokładnego modelu 3D rozwoju naczyń w rosnącej chrząstce oraz dzięki stworzeniu modelu wzrostu końskiej chrząstki *in vitro* w niedalekiej przyszłości jeszcze bardziej pogłębiona zostanie znajomość patogenezы osteochondrozy, co pomoże zmniejszyć jej występowanie.

Piśmiennictwo

- Dik K.J., Enzering E., van Weeren P.R.: Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine Vet. J. Suppl.* 1999, **13**, 9-15.
- Van Weeren P. R., Barneveld A.: The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal. *Equine Vet. J.* 1999, **31**, 16-25.
- Schneider N., Heimann M., Lejeune J. P., Verwilghen D. R., Deby-Dupont G. P., Serteyn D. A.: Histology of two rice bodies isolated from the stifle of an adult draught horse stallion. *J. Vet. Sci.* 2006, **7**, 83-85.
- Relave F., Meulyzer M., Alexander K., Beauchamp G., Marcoux M.: Comparison of radiography and ultrasonography to detect osteochondrosis lesions in the tarsocrural joint: A prospective study. *Equine Vet. J.* 2009, **41**, 34-40.
- Beccati F., Chalmers H. J., Dante S., Lotto E., Pepe M.: Diagnostic sensitivity and interobserver agreement of radiography and ultrasonography for detecting trochlear ridge osteochondrosis lesions in the equine stifle. *Vet Radiol Ultrasound* 2012, **0**, 1-9.
- Machado T. S., Correia da Silva L. C., Baccarin R. Y., Michelacci Y. M.: Synovial fluid chondroitin sulphate indicates abnormal joint metabolism in asymptomatic osteochondrotic horses. *Equine Vet. J.* 2012, **44**, 404-411.
- David-Raoudi M., Deschrevel B., Leclercq S., Galera P., Boumediene K., Pujol J.P.: Chondroitin sulphate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases. *Arthritis Rheum.* 2009, **60**, 760-770.
- Donabedian M., van Weeren P. R., Perona G., Fleurance G., Robert C., Leger S., Bergero D., Lepage O., Martin-Rosset W.: Early changes in biomarkers of skeletal metabolism and their association to the occurrence of osteochondrosis (OC) in the horse. *Equine Vet. J.* 2008, **40**, 253-259.
- Lettry V., Sumie Y., Mitsuda K., Tagami M., Hosoya K., Takagi S., Okumura M.: Divergent diagnosis from arthroscopic findings and identification of CPII and C2C for detection of cartilage degradation in horses. *Jap J. Vet. Res.* 2010, **57**, 197-206.
- Verwilghen D., Martens A., Busschers E., Franck T., Deberg M., Y. Henrotin, Vanderheyden L., Serteyn D.: Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase concentrations in the synovial fluid of equine tarsocrural joints affected with osteochondrosis. *Vet. Res. Commun.* 2011, **35**, 401-408.
- Verwilghen D. R., Enzerink E., Martens A., Franck T., Balligand M., Henrotin Y., Detilleux J., Serteyn D.: Relationship between arthroscopic joint evaluation and the levels of Coll2-1, Coll2-1NO2, and myeloperoxidase in the blood and synovial fluid of horses affected with osteochondrosis of the tarsocrural joint. *Osteoarth. Cart.* 2011, **19**, 1323-1329.
- Verwilghen D., Busoni V., Gangl M., Franck T., Lejeune J. P., Vanderheyden L., Detilleux J., Grulke S., Deberg M., Henrotin Y., Serteyn D.: Relationship between biochemical markers and radiographic scores in the evaluation of the osteoarticular status of Warmblood stallions. *Res. Vet. S.* 2009, **87**, 319-328.
- Olstad K., Cnudde V., Masschaele B., Thomassen R., Dølvik N. I.: Micro-computed tomography of early lesions of osteochondrosis in the tarsus of foals. *Bone* 2008, **43**, 574-583.
- Verwilghen D. R., Janssens S., Busoni V., Pille F., Johnston C., Serteyn D.: Do developmental orthopaedic disorders influence future jumping performances in Warmblood stallions? *Equine Vet. J.* 2012, doi: 10.1111/evj.12027.
- Courouge-Malblanc A., Leleu C., Bouchilloux M., Geoffroy O.: Abnormal radiographic findings in 865 French Standardbred trotters and their relationship to racing performance. *Equine Vet. J.* 2006, **36**, 417-422.
- Witton R. C., Kannegieter N. J.: Osteochondral fragmentation of the plantar/palmar proximal aspect of the proximal phalanx in racing horses. *Aust Vet. J.* 1994, **71**, 318-321.
- Beard W. L., Bramlage L. R., Schneider R. K., Embertson R. M.: Postoperative racing performance in standardbreds and thoroughbreds with osteochondrosis of the tarsocrural joint: 109 cases (1984-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994, **204**, 1655-1659.
- Courouge-Malblanc A., Leleu C., Bouchilloux M., Geoffroy O.: Abnormal radiographic findings in 865 French Standardbred trotters and their relationship to racing performance. *Equine Vet. J., Suppl.* 2006, **417-422**.
- Ahmed Y. A., Tatarczuch L., Pagel C. N., Davies H. M., Mirams M., Mackie J.: Hypertrophy and physiological death of equine chondrocytes in vitro. *Equine Vet. J.* 2007, **39**, 546-552.

Lek. wet. Katarzyna Kliczkowska
e-mail: pilotek@autograf.pl