

IMPORTANȚA HIPOTIROIDISMULUI ÎN EVOLUȚIA ȘI PROGNOSTICUL OSTEOARTRITEI EXPERIMENTALE LA ȘOBOLAN

OVIDIU DRAGOMIR^{1,2}, LUMINIȚA PLEȘCA MANEA³

¹Centrul Medical Județean Cluj al Ministerului Administrației și Internelor

²Serviciul Județean de Ambulanță Cluj

³Catedra de Fiziopatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca

Rezumat

Hormonii tiroidieni joacă un rol major în dezvoltarea normală a structurilor articulare juvenile și în menținerea funcționalității articulației adulte. Efectele dezechilibrelor hormonale tiroidiene asupra structurilor articulare se fac atât prin modificarea metabolismului fosfo-calcic, cât și prin influențarea proliferării și diferențierii condrocitare. În lumina acestor date am elaborat un studiu prospectiv experimental cu scopul de a evalua influențele pe care scăderea nivelelor serice ale hormonilor tiroidieni le are asupra evoluției și prognosticului osteoartritei experimentale. Osteoartrita experimentală a fost indusă la trei grupuri de șobolani Wistar-Bratislava prin injectarea intraarticulară la nivelul articulației tibio-femorale stânga a 7 doze de 0,02 ml soluție carrageenan 1% de-a lungul unei perioade de 24 zile. Grupul 0 - martor - a fost obținut prin recoltarea articulațiilor tibio-femorale drepte, indemne, ale șobolanilor din grupul 1. Grupul 1 nu a primit nici un fel de tratament, grupul 2 a primit tratament cu thiamazol 12,5 mg/kg corp administrat prin gavaj pe o perioadă de 8 săptămâni, iar grupul 3 a primit tratament cu thiamazol 12,5 mg/kg corp administrat prin gavaj pe o perioadă de 4 săptămâni urmate de 4 săptămâni fără tratament. Evaluarea severității osteoartritei s-a făcut în baza următorilor parametri: diametrul articular, unghiul de maximă extensie articulară și evaluare histologică prin scor Mankin. Au fost evidențiate modificări statistice semnificative ale parametrilor studiați între grupul control și grupul cu hipotiroidism permanent, dar și între grupul cu hipotiroidism permanent și cel cu hipotiroidism corectat, sugerând astfel că hipotiroidismul este un factor de agravare a unei osteoartrite constituite și, mai mult, corectarea hipotiroidismului îmbunătățește evoluția osteoartritei.

Cuvinte cheie: osteoartrita experimentală, hipotiroidism, gușă endemică, scor Mankin, artroză.

THE IMPORTANCE OF HYPOTHYROIDISM IN THE EVOLUTION AND PROGNOSIS OF EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS IN RATS

Abstract

Thyroid hormones play a major role in the normal development of the young joint structure and in the maintenance of the functionality of the mature joint. The effects of thyroid hormones imbalance over articular structures takes place both through alterations in the phosphocalcic metabolism and through modifications of cellular growth and proliferation. In view of this data we conceived a experimental study in order to analyze the influence that lower than normal thyroid hormones levels have over the evolution and outcome of experimental osteoarthritis. The osteoarthritis was induced in three groups of adult Wistar-Bratislava rats by intraarticular injection into the left knee joint of 7 doses of 0,02 ml of carrageenan solution 1% over a period of 24 days. The group 0 – control – was obtained by harvesting healthy right knee joints from the group 1 rats. The first group received no treatment, the second group

received thyamazol 12.5mg/kg by gavage over a period of 8 weeks, and the third group received thyamazol 12.5mg/kg by gavage over a period of 4 weeks, followed by 4 weeks with no treatment. The severity of osteoarthritis was assessed by analyzing the following factors: joint diameter, maximum extension angle of the joint, and the Mankin score for histological evaluation. We obtained statistically significant alterations of the observed parameters both between the control group and the group with continuous hypothyroidism and between the group with continuous hypothyroidism and the group with corrected hypothyroidism suggesting that hypothyroidism is a factor of aggravation of a already present osteoarthritis and furthermore, correction of hypothyroidism improves the outcome of experimental osteoarthritis.

Keywords: experimental osteoarthritis, hypothyroidism, endemic goiter, Mankin score, arthrosis.

Introducere

Osteoartrita este o boală foarte frecventă atât pe plan mondial [1], cât și în România [2]. De asemenea gușa endemică și disfuncțiile tiroidiene endemice reprezintă o problemă de sănătate publică în țara noastră, cu prevalențe atingând până la 41-52 % în zonele endemice cunoscute [3]. Mai multe studii au arătat asocieri semnificative între disfuncțiile tiroidiene și osteoartrită [4-7]. Rolul hormonilor tiroidieni este fundamental în dezvoltarea și turnover-ul fiziologic al tuturor celulelor organismului, dar la nivelul țesutului osos și cartilajinos aces rol este hotărâtor. Condrocitele umane de cultură prezintă un receptor specific nuclear de legare a T_3 [8]. Aceste celule răspund la T_3 *in vitro* prin creșterea activității fosfatazei alcaline după 9 zile de stimulare. De asemenea, tratamentul condrocitelor de șobolan cu T_3 timp de 96 de ore a produs creșterea activității fosfatazei alcaline concomitent cu creșterea expresiei de mRNA specific factorului de creștere insulin-like 1 (IGF-1) și diminuarea proliferării celulare [9].

Statusul hipotiroidian pare a induce anormalități ale acestor țesuturi care duc la apariția unor manifestări clinice cum ar fi disgenezia epifizară, necroză aseptică, artrită datorată depunerii de cristale și o artropatie caracterizată prin revărsat articular de vâscozitate mare, lipsit de caracter inflamator, afectând îndeosebi genunchiul, articulația radiocarpiană, și articulațiile mâinii. Studiul Framingham [10], cel mai important studiu prospectiv axat pe osteoartrită, a eșuat în a dovedi o interrelație semnificativă statistic între statusul tiroidian pe de-o parte și osteoartrită și condrocalcinoză pe de altă parte. Simptomele reumatice sau musculoscheletale pot fi semne inițiale ale hipotiroidismului. Artralgia cu caracter non-inflamator, redoarea articulară și semnele musculoscheletale ale hipotiroidismului se ameliorează progresiv sub tratament hormonal substitutiv adecvat [11].

Metode

Un studiu experimental a fost realizat prin inducerea osteoartritei la 3 loturi de șobolani Wistar-Bratislava, adulți, femele, prin injectarea intraarticulară la nivelul articulației tibio-femorale stângi a 7 doze de 0,02 ml soluție de carrageenan 1% pe o perioadă de 24 de zile. Soluția de carrageenan a fost obținută prin dizolvarea substanței active, carrageenan Tip 1, produs de Sigma Aldrich sub codul de produs C1013, în apă distilată sterilă. Lotul 0 - martor - a fost obținut prin recoltarea articulațiilor tibio-femorale drepte, indemne, ale șobolanilor din lotul 1. Lotul 1 nu a primit nici un fel de tratament, lotul 2 a primit tratament cu thiamazol 12,5mg/kg corp sub forma produsului Thyrozol produs de Merk KgaA, administrat prin gavaj pe o perioadă de 8 săptămâni, iar lotul 3 a primit tratament cu thiamazol 12,5mg/kg corp administrat prin gavaj pe o perioadă de 4 săptămâni urmate de 4 săptămâni fără tratament. Toate animalele au fost menținute în aceleași condiții de laborator și li s-a permis să se miște liber. Cele trei loturi au fost sacrificate după 12 săptămâni și 3 zile. Au fost recoltate și disecate ambele membre posterioare cu păstrarea integrității capsulei articulare.

S-a măsurat unghiul de extensie maximă a fiecărui genuchi considerând că 0 grade corespunde celui mai mare unghi de extensie posibilă. Acest parametru reflectă gradul de mobilitate articulară [12]. S-au măsurat de asemenea diametrele antero-posterior și laterolateral maxim la nivelul fiecărei articulații cu ajutorul unui micrometru digital Klass-Messzeuge IP54. Aceste date reflectă macroscopic grosier gradul de distrucție și inflamație a structurilor articulare [13]. Pentru a evita posibile erori măsurătorile au fost efectuate de același operator. Piesele au fost ulterior fixate în formalina 10 % și pregătite pentru studiu histologic. Toate piesele au fost demineralizate prin imersie în acid azotic 1% pe o perioadă de 14 zile.

După fixare în parafină s-au preparat secțiuni tibiale colorate în hematoxină-eozină și Tricrom-Masson varianta Goldner. Leziunile articulare au fost evaluate și înregistrate folosind scorul Mankin (Tabel 1) [14]. Întreaga evaluare histologică a fost efectuată de un singur operator.

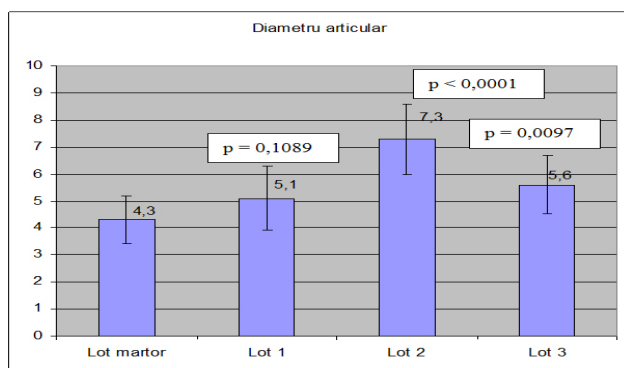
Tabel 1. Scorul Mankin.

Variabila	Scor
Suprafața	0 = normal 1 = neregulată 2 = fibrilară / vacuole 3 = flicte și eroziune
Hipocelularitate	0 = normal 1 = scădere ușoară a numărului de condrocite 2 = scădere marcată a numărului de condrocite 3 = acelularitate
Clone	0 = normal 1 = duo-uri ocazionale 2 = duo-uri și trio-uri 3 = celule multiple grupate
Alcianofilie	0 = normal 1 = scădere ușoară a colorării 2 = scădere severă a colorării 3 = lipsă colorare

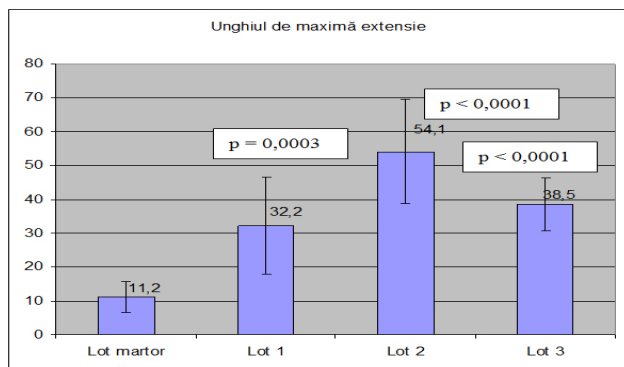
Pentru evaluarea statistică s-a folosit testul T pentru valori independente, precum și testul Wilcoxon pentru eşantioane perechi și testul U Mann-Whitney pentru eşantioane independente. Nivelul de semnificație statistică a fost stabilit la 5% ($\alpha = 0,05$).

Rezultate

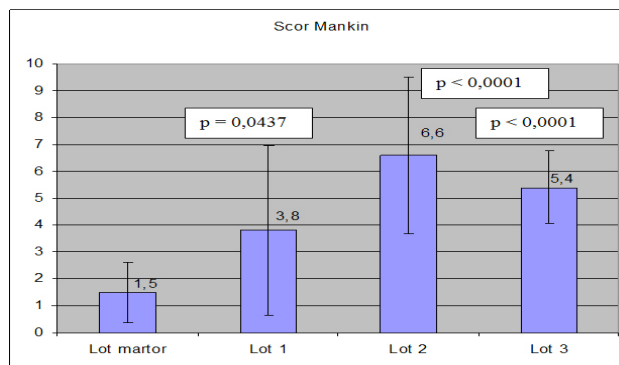
Confirmarea modelului experimental de osteoartrită s-a făcut prin compararea diametrului articular (Graficul 1), unghiului de extensie maximă (Graficul 2) și a scorului Mankin (Graficul 3) a articulațiilor contralaterale (drepte) ale lotului martor cu cele trei loturi experimentale.



Grafic 1. Compararea lotului martor cu cele trei loturi experimentale din punct de vedere al diametrului articular.

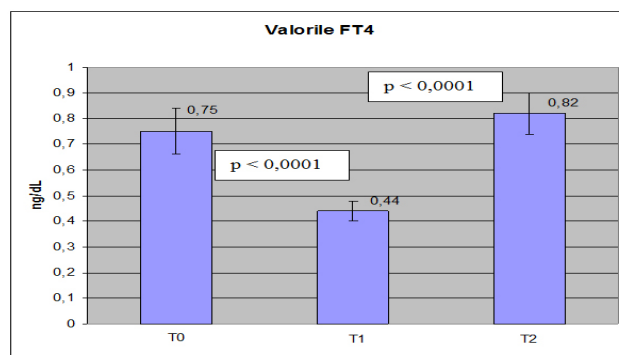


Grafic 2. Compararea lotului martor cu cele trei loturi experimentale din punct de vedere al unghiului de maximă extensie.



Grafic 3. Compararea lotului martor cu cele trei loturi experimentale din punct de vedere al scorului Mankin.

Confirmarea hipotiroidismului indus terapeutic s-a făcut prin dozarea FT4 la componenții lotului 3 la 3 momente de-a lungul experimentului: T0 – înainte de inducerea hipotiroidismului, T1 – după 4 săptămâni de tratament cu thiamazol și T2 – la finalul experimentului (Grafic 4).



Grafic 4. Compararea nivelelor de FT4 ale membrilor lotului 3 de-a lungul fazelor experimentului.

Analiza funcțională a fiecărui genunchi s-a făcut prin analizarea unghiului de extensie maxim, conform rezultatelor din Tabelul 2.

Am găsit diferențe semnificative statistic între unghiurile de extensie ale lotului 1 cu osteoartrită **necomplăcată** și ale lotului cu hipotiroidism permanent, precum și între unghiurile de extensie ale lotului cu hipotiroidism corectat și cele ale lotului cu hipotiroidism permanent.

Analizarea diametrului articular mediu, obținut prin efectuarea mediei aritmetice între diametrul anteroposterior și cel laterolateral maxim a relevat rezultatele din Tabelul 3.

S-au evidențiat diferențe statistic semnificative între lotul cu osteoartrită necomplicată și lotul cu hipotiroidism permanent dar și între lotul cu hipotiroidism permanent și lotul cu hipotiroidism corectat.

Tabel 2. Analiza unghiului de extensie maximă (grade).

	Lot 1 - control	Lot 2 – Hipotiroidism permanent	Lot 3 – Hipotiroidism corectat
Medie	32,2	54,1	38,5
Max	10	20	30
Min	65	70	50
SD	14,25	15,40	7,84
SEM	4,50	4,76	2,48
n	10	10	10

Mann-Whitney $p = 0.0029$ (Lot 1 vs Lot 2)
 Wilcoxon $p = 0.0025$ (Lot 2 vs Lot 3)
 Mann-Whitney $p = 0.0348$ (Lot 1 vs Lot 3)

Tabel 3. Analiza diametrului articular mediu (mm).

	Lot 1 - control	Lot 2 – Hipotiroidism permanent	Lot 3 – Hipotiroidism corectat
Medie	5,1	7,3	5,6
Max	6,5	8,9	6,8
Min	3,5	4,8	4,1
SD	1,2	1,3	1,1
SEM	0,41	0,22	0,18
n	10	10	10

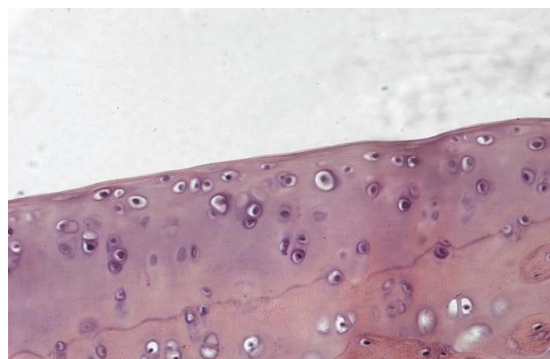
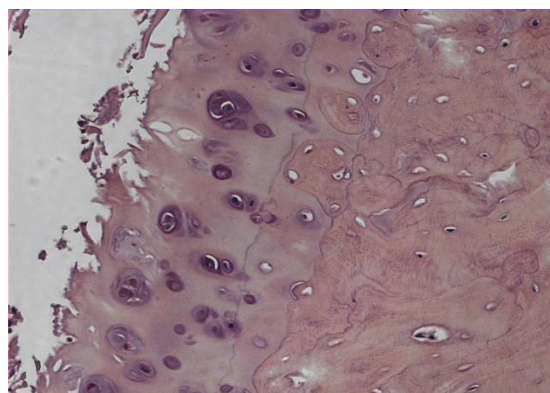
Mann-Whitney $p = 0.0024$ (Lot 1 vs Lot 2)
 Wilcoxon $p = 0.0037$ (Lot 2 vs Lot 3)
 Mann-Whitney $p = 0.0259$ (Lot 1 vs Lot 3)

Analiza histologică folosind scorul Mankin a arătat nivele moderate ale modificărilor degenerative în toate cele 3 grupuri – Tabelul 4. S-au evidențiat diferențe semnificative între scorul Mankin al lotului cu osteoartrită necomplicată și al lotului cu hipotiroidism permanent. Între lotul cu hipotiroidism permanent și cel cu hipotiroidism corectat nu au apărut diferențe semnificative statistic din punct de vedere histologic.

Tabel 4. Evaluarea prin scorul Mankin.

	Lot 1 - control	Lot 2 – Hipotiroidism permanent	Lot 3 – Hipotiroidism corectat
Medie	3,8	6,6	5,4
Max	10	10	7
Min	0	1	3
SD	3,16	2,91	1,35
SEM	0,10	0,92	0,42
n	10	10	10

Mann-Whitney $p = 0.0019$ (Lot 1 vs Lot 2)
 Wilcoxon $p = 0.2799$ (Lot 2 vs Lot 3)
 Mann-Whitney $p = 0.0173$ (Lot 1 vs Lot 3)

**Fig 1.** Cartilaj articular - Lot martor. Scor Mankin - 2.**Fig 2.** Cartilaj articular - Lot cu hipotiroidism permanent. Scor Mankin - 9.

Discuții

Literatura de specialitate este divizată în ceea ce privește importanța hipotiroidismului în apariția și progresia osteoartritei. În timp ce multe dintre aceste studii susțin absența unei legături de tip cauză-efect între cele două afecțiuni, punând asocierea dintre ele pe seama manifestărilor osteo-musculare ale hipotiroidismului [15], a prezenței crescute a bolnavilor hipotirodicieni în serviciile reumatologice [16] și a pseudogutei [17], altele insistă asupra asocierii dintre entitățile patologice menționate [4,6,18].

Am utilizat un model experimental consacrat, ușor de realizat, care nu a necesitat intervenție chirurgicală, și prin care sunt induse modificări articulare similare celor din modelele osteoartritei chirurgicale [19].

Am considerat acest studiu necesar datorită paucității studiilor experimentale centrate în jurul unor ipoteze asemănătoare, dar mai ales datorită absenței unei evaluări a prognosticului și evoluției osteoartritei după corectarea hipotiroidismului.

Am inclus în analiza noastră unghiul maxim de extensie considerând 0 grade unghiul de extensie maximă, așadar o valoare mică reprezintă o extensie mai bună decât o valoare mai mare.

Rezultatele noastre arată diferențe semnificative atât din punct de vedere morfologic – diametru articular, funcțional – unghiul maxim de extensie articulară și

histologic – scor Mankin între grupul martor și grupul cu hipotiroidism permanent. Aceste diferențe se datorează probabil alterărilor turnoverului și metabolismului condrocitar. Astfel, hipotiroidismul induce apoptoză condrocitară și determină scăderea ratei de sinteză a componentelor matricei extracelulare [20]. S-a observat totodată o creștere a conținutului de apă a cartilajului articular sub influența hipotiroidismului [21]. Aceasta explică creșterea diametrului articular nu numai pe seama leziunii articulare, ci și prin infiltrarea hidrică a țesutului articular și periarticular. Între grupul cu hipotiroidism permanent și cel cu hipotiroidism corectat am evidențiat diferențe statistic semnificative din punct de vedere morfologic – diametru articular și funcțional – unghiul maxim de extensie dar nu și din punct de vedere histologic – scor Mankin, sugerând că ameliorarea evoluției osteoartritei prin corectarea hipotiroidismului se face prin alte mecanisme decât modificarea proliferării și diferențierii condrocitare. Este posibil ca ameliorarea diametrului articular și a unghiului de maximă extensie să fie consecința dezinfiltrării hidrice a structurilor articulare, dar nu putem exclude nici posibilitatea unor îmbunătățiri ale proprietăților biomecanice ale cartilajului, prin creșterea sintezei de proteoglicani, collagen, acid hialuronic, proteine noncolagenice și ADN [22], înainte de apariția modificărilor histologice care să ateste evoluția spre vindecare a cartilajului articular. Totodată avem în vedere că evoluția scorului Mankin, deși statistic nesemnificativă, este una spre ameliorare, cu o scădere de la 6,6 la lotul cu hipotiroidism corectat la 5,4 la lotul cu hipotiroidism corectat. Este posibil ca continuarea experimentului, într-un studiu viitor, încă 10-14 zile să ofere timp suficient pentru ca refacerea cartilajului articular să atingă nivele semnificative statistic și din punct de vedere histologic.

Concluzii

1. Injectarea de carragenan 1 % intraarticular produce la nivelul genunchiului la șobolan apariția unor modificări osteoartrite similare celor din osteoartrita umană.
2. Hipotiroidismul indus terapeutic în condițiile unui model experimental de osteoartrită provoacă un grad mai sever de redoare articulară precum și o distrucție histologică articulară mai avansată.
3. Corectarea hipotiroidismului îmbunătățește evoluția osteoartritei din punct de vedere funcțional și al modificărilor macroscopice dar nu și din punct de vedere histologic.

Limitările studiului

Pentru o mai bună evaluare histologică ar fi utilă folosirea unui sistem de analiză histometrică a imaginii care oferă indici histologici multipli, mai fideli și mai puțin influențați de eroarea umană decât parametrii folosiți în studiul curent.

Bibliografie

1. Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, Luta G, Dragomir AD, Woodard J, Fang F, Schwartz TA, Abbate LM, Callahan LF, KALSBECK WD, HOCHBERG MC. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol*. 2007 Jan;34(1):172-80.
2. Lefter V, Manole A, Iliescu ML. Epidemiological and clinical research on arthrosis and other rheumatic diseases recorded in Brăila district, between 1994-2003. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2005 Jan-Mar;109(1):149-52.
3. Simescu M. Study on the evolution of endemic goiter in Romania. *Endocrinologie*. 1991;29(1-2):73-83.
4. Turmukhambetova BT, Bagirova VV, Boguslavskaya MI. Thyroid status and clinical features of osteoarthritis in the region of goiter endemicity. *Ter Arkh*. 2000;72(10):10-2.
5. R.McClean, D.Podell. Bone and joint manifestations of hypothyroidism. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, Volume 24, Issue 4, Pages 282-290
6. Neeck G, Riedel W, Schmidt KL. Neuropathy, myopathy and destructive arthropathy in primary hypothyroidism. *J Rheumatol*. 1990 Dec;17(12):1697-700.
7. Douglas N. Golding. The musculo-skeletal features of hypothyroidism. *Postgraduate Medical Journal* 1971;47:611-614.
8. Chaisson CE, McAlindon TE, Felson DT, Naimark A, Wilson PW, Sawin CT. Lack of association between thyroid status and chondrocalcinosis or osteoarthritis: the Framingham Osteoarthritis Study. *J Rheumatol*. 1996 Apr;23(4):711-5.
9. Punzi L, Sfriso P, Pianon M, Schiavon F, Ramonda R, Cozzi F, Todesco S. Clinical manifestations and outcome of polyarthralgia associated with chronic lymphocytic thyroiditis. *Semin Arthritis Rheum*. 2002 Aug;32(1):51-5.
10. Carrascosa A, Ferrandez MA, Audi L, Ballabriga A. Effects of triiodothyronine (T3) and identification of specific nuclear T3-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1992;75:140-144.
11. Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson OG, Lindahl A & Isgaard J. Hormonal regulation of longitudinal bone growth. *European Journal of Clinical Nutrition* 1994; 48:S150-S160.
12. Uchôa De Rezende M., Melo De Campos Gurgel H., Vilaça Junior P.R., Kawassaki Kuroba R., Silva Santiago Lopes A., Zon Phillipi R., Hernandez A. J. Diacerhein Versus Glucosamine In A Rat Model Of Osteoarthritis. *Clinics* 2006;61(5):461-6
13. Bressan E., De Queiroz Cunha F., Tonussi C.R. Contribution of TNF α , IL-1 β and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. *Cytokine*, Volume 36, Issues 1-2, October 2006, 83-89
14. Armstrong S, Read R, Ghosh P. The effects of intraarticular hyaluronan on cartilage and subchondral bone changes in an ovine model of early osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1994;21:680
15. Dorwart BB, Schumacher H R, Joint effusions, chondrocalcinosis and other rheumatic manifestations of hypothyroidism: a clinicopathologic study. *Am J Med* 1975; 59: 780-90.
16. Blum M. Thyroid function and disease in the elderly. *Hosp Pract* 1981; 16:105-106.
17. Ellman MH, Brown N L, Porat AP, Laboratory investigations in pseudogout patients and controls, *J Rheumatol* 1980; 7:77-81.
18. Doherty M, Patrick M, Powell R. Nodal generalised

osteoarthritis is an autoimmune disease. *Ann Rheum Dis.* 1990 December; 49(12): 1017–1020.

19. Hansra P, Moran EL, Fornasier VL, Bogoch ER. Carrageenan-induced arthritis in the rat. *Inflammation* 2000; 24 :141-55

20. Silberberg M, Silberberg R. Role of thyroid hormone in the pathogenesis of joint disease in mice; effects of radiothyroidectomy and high-fat diets. *J Bone Joint Surg Am.* 1995 Jun;37-A(3):537-

48.

21. McDevitt CA, Muir H. Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. *J Bone Joint Surg* 58B:94, 1976

22. Ryu J, Treadwell BV, Mankin HJ: Biochemical and metabolic abnormalities in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 27:613, 1984.