УДК 611.4–018.2:591.4:618.33]-036–008.64

© Колектив авторів, 2013.

ОСОБЛИВОСТІ СУДИННОЇ ІНВАЗІЇ ПРИ ФОРМУВАННІ КОЛІННОГО СУГЛОБА ЩУРІВ.

М. А. Волошин, О. А. Григор'єва, А. В. Федотченко, О. В. Моніна, Ю. Ю. Абросімов

Кафедра анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії (зав. – д. мед. н., проф. Волошин М. А.), Запорізький державний медичний університет. 69035 Україна, м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26. E-mail: vnvoloshin@mail.ru

FEATURES OF BLOOD VESSEL INVASION DURING THE KNEE JOINT DEVELOPMENT IN RATS

M. A. Voloshyn, O. A. Grygorieva, A. V. Fedotchenko, O. V. Monina, Yu. Yu. Abrosimov

SUMMARY

The work revealed that in rats after administration of immunoglobulin vnutriplodnogo occurs earlier, when compared to intact control animals and the formation of subchondral bone, which is preceded by a relative increase in the area occupied by ingrowing vessels and changing the composition of the extracellular matrix surrounding the blood vessels invading the side proinvazivnyh factors

ОСОБЕННОСТИ СОСУДИСТОЙ ИНВАЗИИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ КОЛЕННОГО СУСТАВА КРЫС

Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева, А. В. Федотченко, Е. В. Монина, Ю. Ю. Абросимов

РЕЗЮМЕ

В работе установлено, что у крыс после внутриплодного введения иммуноглобулина происходит более раннее, по сравнению с интактными и контрольными животными, формирование субхондральной кости, чему предшествует увеличение показателя относительной площади, занятой врастающими сосудами и изменение состава экстрацеллюлярного матрикса, окружающего врастающие кровеносные сосуды в сторону проинвазивных факторов.

Ключові слова: колінний суглоб, субхондральна кістка, судинна інвазія, внутрішньоплідне введення імуноглобуліна.

Сучасні уявлення про суглоб, як складної багатокомпонентної органоспецифічної системи, включають розуміння закономірностей взаємодії складових його компонентів на всіх етапах розвитку. Вростання судин в епіфізарний хрящ представляє критичний ранній крок в розвитку вторинного центру окостеніння [5,18]. Перешкода на шляху епіфізарної васкуляризації призводить до дисфункції хондроцитів, що діляться, що асоціюється з уповільненням подовжнього росту [7, 9]. До початку вторинного окостеніння і розвитку субхондральної кістки, епіфізарний хрящ залишається аваскулярним, завдяки продукції інгібіторів судинного русла. Прогресуючий ріст нормального аваскулярного епіфізарного хряща призводить до утворення ділянки з підвищеною гіпоксією і високою концентрацією HIF 1α, що індукує продукцію VEGFα [12, 15, 19]. Розчинні ізоформи VEGFα дифундують з центру гіпоксії на периферію, стимулюючи вростання епіфізарних судин, знижуючи стрес гіпоксії та ініціюючи утворення вторинних осередків окостеніння. Метаепіфізарна інвазія судин асоційована з апоптозом кінцевих гіпертрофованих хондроцитів і вступом в хрящ остеобластів, остеокластів/хондрокластів, внаслідок чого мінералізований хрящ заміщається кісткою і кістковим мозком [3]. Нестача VEGFα в хондроцитах призводить до зменшення відшарування кінцевих гіпертрофованих хондроцитів, і порушення процесу мінералізації в суглобовому хрящі, що розвивається [8]. Особливості формування суглобового хряща, субхондральної кістки у щурів на тлі зміни в системі мати-плацента-плід не вивчені.

Мета дослідження: встановити особливості судинної інвазіїї при формуванні колінного суглоба щурів в ранньому післянатальному періоді в нормі та після внутрішньоплідного введення антигену.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Робота виконана в 2 етапи. На першому етапі вивчено морфогенез колінного суглоба 97 інтактних щурів від моменту народження до 120-ої доби життя. На другому етапі вивчено закономірності реактивності колінного суглоба щурів в постнатальному періоді після дії на плід антигену. Внутрішньоплідне введення імуноглобуліну (82 особини) здійснювали на 18-у добу плодового періоду за способом М. А. Волошина (1981). Тваринам контрольної групи (47 особин) було введено фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі. Новонароджені отримані від щурів з датованим терміном вагітності, встановленим методом вагінальних мазків (Стефанов А. В., 2002). Пологи наставали в строк — на 22–23 день після зачаття. Новонароджені щури були доношеними. Забій тварин (на 1, 7, 11, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120-ту добу) проводили шляхом декапітації після ефірного наркозу. Суглоби фіксували в рідині Буена протягом 24 годин. Шматочки зневоднювали у висхідній батареї спиртів. Починаючи з 14-ої доби, зафіксований колінний суглоб декальцинували 20 % розчином мурашиної кислоти, після цього зневоднювали і заливали в суміш: парафін: каучук: віск (20:1:1).

Виготовляли парафінові блоки. Серійні гістологічні зрізи (50–100 зрізів з одного блоку) виготовляли завтовшки 3–5 мкм для оглядової мікроскопії, постановки ШІК-реакції, забарвлення альціановим синім за Scott&Dorling і завтовшки 7 мкм для виявлення рецепторів до лектинів. Для характеристики обмінних процесів, виявлення глікозаміногліканів препарати забарвлювали альціановим синім за Scott&Dorling з ферментативним контролем і критичними концентраціями електроліту (MgCl2). Облік результатів забарвлення гістохімічного виявлення глікозаміногліканів проводили напівкількісно. фібронектин виявляли за допомогою лектингістохімічної реакції з лектином арахісу з попередньою обробкою зрізів пепсином (PraetoriusJ., 2001). Облік морфологічних ознак проводили методом морфологічного урахування структур за С. Б. Стефановим. Статистичну обробку отриманих числових результатів проводили методами варіаційної статистики на персональному комп'ютері з використанням, у тому числі, стат. пакету ліцензійної програми «STATISTICA®for Windows 6.0» (StatSoftInc., № AXXR712D833214FAN5). Достовірність різниці між групами оцінювали за методом Стьюдента-Фішера. Результати вважали достовірними при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На 7-у добу після народження у щурів на піку виявлення PNA^+ лімфоцитів в перехідній частині капсули визначається врастання кровоносних судин з перехідної частини в епіфізарні хрящі. Відносна площа, зайнята врастаючими судинами невелика (3,33±0,79%, 3,24±0,76% і 3,43±0,80% площі дистального епіфізарного хряща стегнової кістки, відповідно в інтактній і контрольних групах). Періостальні бруньки оточені обідком матриксу, що містить колаген I і III типу, сульфатованіглікозаміноглікани, рецептори до лектинів посівного горошку (VSA), арахісу (PNA) і зав'язі пшениці (WGA). Після попередньої обробки зрізів пепсином, інтенсивність розподілу рецепторів до лектину арахісу в матриксі, який оточує врастаючу кровоносну судину зменшується, що вказує на наявність в цій ділянці міжклітинної речовини розчинної форми фібронектину, що виявляється лектином арахісу. Фібронектин, в цій зоні забезпечує гаптотаксис — міграцію клітин з низької області концентрації екстрацелюлярного матриксу до високої, що має місце при судинній інвазії і, в цілому, є важливим компонентом розвитку органів і тканин. З іншого боку, у складі міжклітинної речовини, що оточує періостальну бруньку визначаються низько- і високосульфатовані глікозаміноглікани, які перешкоджають клітинній адгезії і міграції клітин при судинній інвазії, що описано в роботах [17]. Тобто при врастанні кровоносних судин з перехідної частини в епіфізарний хрящ для формування субхондральної кістки має місце чітко збалансоване співвідношення речовин, що потенціюють і інгібують цей процес. Порушення цього співвідношення у бік переважання проінвазивних факторів може привести до більш раннього формування вторинного осередка окостеніння, що може спричинити руйнування функціонально незрілого суглобового хряща і спровокувати передчасний розвиток остеоартрозу. У свою чергу перешкода врастанню судин і порушення формування субхондральної кістки може відбитися на конфігурації суглобового хряща і привести до деформації суглоба в цілому і також стане причиною раннього розвитку остеоартрозу.

Врастаючі судини вистелені SBA^+, WGA^+ ендотелієм, який за даними Н. В. Родионової (1989, 2006) не має базальної мембрани [3, 4]. За ходом врастання капілярів в епіфізарний хрящ визначаються переважно малодиференційовані клітини фібробластичного типу, макрофаги. За даними Н. В. Родионовой (1989, 2006) виявляються дві популяції макрофагів, одна з яких фагоцитує продукти деградації клітин і міжклітинної речовини епіфізарного хряща. Друга популяція клітин містить численні мітохондрії і вакуолі і виступає як макрофаги, що здійснюють регуляторну функцію, контролюючи секрецію в клітинах першого типу [3]. На нашу думку, друга популяція клітин є нічим іншим, як дендритними клітинами, що здійснюють разом з поруч розташованими PNA^+ лімфоцитами, серед яких можуть виявлятися як імунологічно незрілі, так і γ/δ-Т лімфоцити, що здійснюють контроль за процесами морфогенезу [2]. Встановлено, що в стінці врастаючих судин визначаються поодинокі широкоплазмені лімфоцити з альціанофільною цитоплазмою, PNA^+, LCA^+ лімфоцити і SBA^+ клітини, серед яких виявляються лімфоцити, макрофаги, дендритні клітини, WGA^+ клітини, які ряд авторів [1] розцінює як поліпотентні стовбурові клітини. WGA+ клітини округлої форми, 6–8 мкм в діаметрі виявляються також в перехідній частині капсули суглобу. Окрім цього, в стінці врастаючих судин і безпосередньо в перехідній частині визначаються ki — 67^+ клітини.

Встановлено, що у новонароджених антигенпремійованих щурів в перехідній частині визначається найбільший вміст як лімфоцитів в цілому, так і PNA^+ лімфоцитів, що пов'язано з виходом імунологічно незрілих лімфоцитів з тимуса на периферію і заселення ними периферичних лімфоїдних і нелімфоїдних органів [2]. Функціональна активність PNA^+- лімфоцитів викликає дисбаланс формування клітин мікрооточення, синтезу міжклітинної речовини, волокон екстрацелюлярного матриксу, що призводить до змін морфофункціонального стану органів.

У антигенпремійованих щурів на 7-у добу життя формування суглобового хряща також не завершене, проте поверхневі шари суглобового хряща набувають рис поверхневої і проміжної зони ювенільного суглобового хряща на відміну від контрольних

тварин, у яких дистальний епіфізарний хрящ стегнової кістки характеризується як ембріональний. У поверхневій зоні суглобового хряща, вперше від моменту народження і, на відміну від контрольних і інтактних щурів, розрізняють тангенціальний і перехідний шари. Виявляються врастаючі в хрящ з перехідної зони кровоносні судини, відносна площа яких достовірно більше, ніж в контролі (5,00±0,41 % і 3,24±0,76 %, відповідно).

У антигенпремійованих щурів на 11-у добу після народження на тлі підвищеного в порівнянні з контролем вмісту як загальної кількості лімфоцитів (8,65±0,38 і 7,03±0,64 клітин на умовній одиниці площі, відповідно), так і PNA^+ лімфоцитів (5,95±0,28 і 3,75±0,15 клітин на умовній одиниці площі, відповідно), формується субхондральна кістка. Хрящ, будучи аваскулярною тканиною значних розмірів, під час розвитку особливо чутливий навіть до помірних порушень процесу васкуляризації, живлення і оксигенації [13]. Ось чому, різні дії на організм плоду, що призводять до порушення васкуляризації, можуть стати причиною розвитку дисплазії суглоба. Збільшений вміст PNA^+ лімфоцитів в капсулі суглобу можливо змінює активність ендотеліоцитів, збільшуючи синтез VEGF, що грає одну з ключових ролей в процесі енходрального окостеніння [8, 13]. Це призводить до більш ранньої судинної інвазії і передчасного утворення субхондральної кістки і суглобового хряща, хондроцити якого є функціонально незрілими, що проявляється нижчим в порівнянні з контролем вмістом сульфатованих глікозаміногліканів, їх накопиченням у складі внутрішньоцитоплазматичних включень, і порушенням їх екскреції в міжклітинне середовище, що у свою чергу змінює еластопружні властивості суглобового хряща. Низький вміст сульфатованих глікозаміногліканів, полегшує вростання кровоносних судин з проміжної зони. Окрім цього, у антигенпремійованих щурів рівень вмісту фібронектину в матриксі, який оточує врастаючу кровоносну судину, вищий, ніж у інтактних і контрольних щурів, що виявлено при проведенні лектингістохімічної реакції з лектином арахісу і попередньої обробки зрізів пепсином. Цей факт збільшення вмісту фібронектину в міжклітинній речовині сприяє прискореним темпам судинної інвазії [14] і руйнуванню функціонально незрілого хряща металопротеазами, синтезованими макрофагами, розташованими по ходу врастаючої судини [3,4]. Зазнаючи агресивної дії з боку остеобластів субхондральної кістки, разом із зростаючим механічним навантаженням, суглобовий хрящ антигенпремійованих щурів, який, по суті, є функціонально незрілим, спочатку компенсаторно потовщується, а надалі безвідворотньо стоншується, що з віком є передумовою розвитку первинного остеоартрозу. З боку хряща формуванню вторинного осередка окостеніння сприяє наростання об'єму клітинної маси, при цьому наростає рівень тканинної гіпоксії [13, 15, 19]. Цитоплазма хондроцитів вакуолізується, хондроцити піддаються апоптозу, на їх цитоплазматичній мембрані експресовані молекули галектина-3, що виявляється за допомогою лектину арахісу. Помічена чітка зональність розподілу галектина- 3 в хондроцитах суглобового хряща. У клітинах пери-, про- і метахондральної зони ембріонального епіфізарного хряща, в поверхневій зоні ювенільного і зрілого суглобового хряща галектин-3 входить до складу внутрішньоцитоплазматичних включень хондроцитів і не експресований на цитоплазматичній мембрані, що вказує на активність внутрішньоцитоплазматичних процесів в хондроцитах поверхневої зони. Відносна кількість хондроцитів з PNA^+-внутрішньоцитоплазматичними включеннями в поверхневій зоні упродовж чотирьох місяців після народження досить стабільна.

ВИСНОВКИ

У щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну прискорюються процеси формування субхондральної кістки, чому сприяє збільшення відносної площі, зайнятої врастаючими з перехідної зони судинами.

У щурів після внутрішньоплідного введення антигену змінюється якісний склад екстрацелюлярного матриксу навколо врастаючих судин у бік переважання проінвазивних речовин.

Стаття є частиною науково-планової роботи кафедри анатомії людини, оперативної хірургії і топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету «Лектингістохімічна характеристика морфогенезу органів і тканин в ранньому постнатальному періоді в нормі і експерименті» (2008–2012, № держ. реєстрації 0109U003986).

ЛІТЕРАТУРА

1. Барановский Ю. Г. Современный метод определения гистотопографии галактоконъюгатов с помощью лектинов в раннем эмбриогенезе кожи человека/Ю. Г. Барановский, Т. И. Забашта, К. Л. Лазарев//Буковинський медичний вісник. — 2003. — № 3–4.- С. 259–261.

2. внутриутробная антигеннная стимуляция как модель для изучения морфогенеза органов/Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева, О. Г. Кущ [и др.]//Морфологические ведомости.- 2006.- № 1–2, приложение 1.- С. 57–59.

3. Резніченко Ю. Г. Хронічна плацентарна недостатність/Ю. Г. Резніченко, Г. І. Резніченко.- З.: ВПК "Запоріжжя", 2000.- 144 с.

4. Решетов П. Д. Факторы роста костной ткани/П. Д. Решетов//Ортопедия, травматология, протезирование. — 1994. — № 4. — С. 89.

5. Cole, A.A. Perivascular cells in cartilage canals of the developing mouse epiphysis/A.A. Cole, F.H. Wezeman,// *Am.J. Anat.* — 1985. — Vol. **174.** — P.119–129.

6. Demoor-Fossard M. Expression of decorin and biglican by rabbit articular chondrocytes. Effects of

cytokines and phenotypic modulation/M. Demoor-Fossard, F. redini, M. Boittin//Biochim. Biophys. Acta.— 1998.— Vol. 1398.— P. 179–191.

7. Floyd W. E., Zaleske D. J., Schiller A. L. Vascular events associated with the appearance of the secondary center of ossification in the murine distal femoral epiphysis/W. E. Floyd, D. J. Zaleske, A. L. Schiller//*J. Bone Joint Surg. Am.*- 1987.— Vol.**69.- P.**185–190.

8. Gerber H. P. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation/H. P. Gerber//*Nat. Med.*- 1999.- Vol.**5.**— P.623–628.

9. Horner A. Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage/A. Horner, N. J. Bishop, S. Bord//J. Anat.— 1999.— Vol. 194.— P. 519–524.

10. Karsenty G. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development/G. Karsenty, E. F. Wagner//*Dev. Cell.*— 2002.- Vol.**2.**- P.389–406.

11. Kuemel T. A. Lectin binding sites on CD34+ human haematopoietic stem cells and lymphocytes from peripheral blood: an ultrastructuralpostembedding study/T. A. Kuemel, J. Thiele, A. H. Blaeser//The histochemical journal.— 1997.— Vol. 29, N 9.— P. 695–705.

12. Maes C. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEG F188/C. Maes//*Mech. Dev.*— 2002.— Vol. **111.— P.**61–73.

13. Maes C. Soluble VEGF isoforms are essential for establishingepiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival/C. Maes, I. Stockmans, K. Moermans//J. Clin. Invest.— 2004.— Vol. 113.— P. 188–199.

14. McCarthney — FrancisN. Supression of arthrithis by an inhibitor of nitric oxide synthase/N. McCarthney — Francis, J. B. Allen, D. E. Mizel//j. Exp. Med.— 1993.— Vol. 178.— P. 749–754.

15. Pfander D. HIF-1 controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes/D. Pfander, T. Cramer, E. Schipani//*J. Cell Sci.*— 2003.— Vol. **116.**— P. 1819–1826.

16. Praetorius J. Specific lectin binding to beta1 integrin and fibronectin on the apical membrane of madin-darby canine kidney cells/J. Praetorius, P. Backlund, A. L.Yergey//J. Membr. Biol.— 2001.— № 184.— P.273–281.

17. Rich A. M. Cartilage proteoglycans inhibit fibronectin-mediated adhesion/A. M. Rich, E. Pearlstein, G. Weissmann//Nature.— 1981.— Vol. 293.— P. 224–226.

18. Rivas R. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit/R. Rivas, F. Shapiro//*J. Bone Joint Surg. Am.*— 2002.— Vol. **84.**— P. 85–100.

19. Schipani E. Hypoxia in cartilage: HIF-1 is essential for chondrocyte growth arrest and survival/E. Schipani//*Genes Dev.*— 2001.— Vol. **15.**— P.2865–2876.