

ЛЕКТИНГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СУСТАВНОГО ХРЯЩА КРЫС С МОДЕЛИРОВАННЫМ ОСТЕОАРТРОЗОМ

Григорьева Е.А., Волошин Н.А.

Запорожский государственный медицинский университет

Григорьева Е.А., Волошин Н.А. Лектингистохимические особенности суставного хряща крыс с моделированным остеоартрозом // Украинський морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 40-43.

В работе установлено, что у крыс с моделированным остеоартрозом наблюдается истончение, разволокнение и нарушение целостности покровного синовиального слоя суставного хряща. Изменяется распределение рецепторов к лектинам завязи пшеницы и чечевицы в покровном синовиальном слое суставного хряща, увеличивается экспрессия аннексина-5 и галектина-3 на цитоплазматической мембране хондроцитов.

Ключевые слова: суставной хрящ, остеоартроз, ретинола ацетат, лектины.

Григорьева Е.А., Волошин М.А. Лектингистохімічні особливості суглобового хряща щурів з остеоартрозом // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 40-43.

В роботі встановлено, що у щурів з остеоартрозом спостерігається витончення покривного синовіального шару суглобового хряща, його розриви та розволокнення, змінюється розподіл рецепторів до зародків пшениці та сочевиці у покривному синовіальному шарі суглобового хряща. На цитоплазматичній мембрані хондроцитів збільшується експресія анексина-5 та галектина-3.

Ключові слова: суглобовий хрящ, остеоартроз, ретинола ацетат, лектини.

Grygoryeva E. A., Voloshyn M. A. Lectin histochemical peculiarities of osteoarthritis articular cartilage in rats // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №2. – С. 40-43.

Morphological changes and their lectin histochemical characteristics in rats articular cartilage on the background of osteoarthritis are explained in the article.

Key words: articular cartilage, osteoarthritis, retinoic acid, lectins.

Введение. В структуре показателей первичной инвалидизации трудоспособного населения в мире и в Украине остеоартроз занимает ведущее место [7]. По прогнозам выявляемость остеоартроза в популяции к 2020 году может достичь 57 % [2]. Высокая социальная значимость остеоартроза указывает на необходимость разработки эффективных методов ранней диагностики, профилактики и лечения [5]. Заболевание все чаще встречается у молодых людей, в том числе и подростков [6]. В развитии дегенеративно-дистрофических изменений хряща в раннем возрасте играет роль первичная неполноценность хрящевой ткани, связанная с воздействием различных факторов внешней среды и метаболическими, иммунологическими, эндокринными и неврологическими нарушениями в пре- и постнатальном периоде [6].

Существуют различные способы моделирования остеоартроза у лабораторных животных [9]. Была выбрана модель остеоартроза путем двукратного внутрисуставного введения ретинола ацетата [15].

Ретиноевую кислоту часто используют для моделирования и изучения дегенеративных процессов хряща [16]. Ретиноевая кислота является растворимым медиатором, который в эмбриональном периоде уменьшает количество и размеры формирующихся хрящевых узелков, подавляет хондрогенез [22]. Добавление ретиноевой кислоты к культуре зрелых хондроцитов и внутрисуставное введение ретиноевой кислоты приводит к нарушению дифференцировки хондроцитов, т.е. приобретению фенотипа, характерного для незрелых хондроцитов [17]. Ретиноевая кислота увеличивает деградацию протеогликанов хряща путем активации металло-

протеаз и способна ускорять процесс минерализации хряща [13].

Лектины и их рецепторы обеспечивают межклеточные, клеточно-матриксные взаимодействия, регулируют процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток [1, 3]. Изучение распределения и динамики лектинов и рецепторов к ним в суставном хряще после рождения играет важную роль в понимании процессов морфогенеза. Изучение распределения и динамики рецепторов к лектинам в суставном хряще на фоне смоделированного остеоартроза позволит расширить представление о молекулярных механизмах формирования остеоартроза.

Цель: установить особенности распределения рецепторов к лектинам в суставном хряще крыс с моделированным остеоартрозом.

Материалы и методы. В работе исследован левый коленный сустав 15 белых крыс с моделированным остеоартрозом левого коленного сустава на 120-е сутки жизни, контролем служил правый коленный сустав, в который вводили в эквивалентном объеме физиологический раствор. Моделирование остеоартроза проведено путем двукратного введения в полость коленного сустава животных масляного раствора ретинола ацетата из расчета 40000 МЕ/кг или 13,76 мг/кг массы тела крысы. Использовали 3,44 % раствор ретинола ацетата в масле. Животных выводили из эксперимента на 7-е, 14-е, 28-е сутки путем декапитации под эфирным наркозом. При работе с экспериментальными животными руководствовались "Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях" (Страсбург, 18.03.86). Для обзорной

микроскопии использовали окраску гистологических препаратов гематоксилином и эозином. Аннексин V выявляли по отложению бензидиновой метки при выявлении рецепторов к лектину завязи пшеницы (WGA) [12], для выявления галектина-3 использовали лектингистохимическую реакцию с лектином арахиса (PNA) [4]. Выявление углеводных остатков β -D-галактозы, N-ацетилгалактозамина и α -D-маннозы проводили с применением лектинов арахиса (PNA), сои (SBA), чечевицы (LCA) и конканавалина A (ConA) по стандартной методике [1], с использованием стандартных наборов НПК "ЛектинТест" (г. Львов). Визуализацию участков связывания лектина проводили в системе диаминобензидин-перекись водорода. Интенсивность отложения бензидиновой метки оценивали полуколичественно в (+): +++ - сильная реакция (коричневый цвет); ++ - умеренная реакция (желто-коричневый цвет); + - слабая реакция (светло-коричневый или золотисто-желтый цвет); 0 - отсутствие реакции.

Результаты и их обсуждение. Макроскопическое исследование. После двукратного внутрисуставного введения масляного раствора ретинола ацетата у крыс развивается остеоартроз, макроскопически проявляющийся утолщением капсулы, ее гиперемией, разрастанием надмышцелков, наличием детрита в суставной полости, потускнением, узуррами и грануляциями суставных поверхностей бедренной и большеберцовой костей, срастанием суставных поверхностей костей с менисками, что соответствует данным В. Н. Коваленко и др. (2005) [7], использовавшими данную модель экспериментального остеоартроза. В течение месяца после окончания эксперимента наблюдается прогрессирующее деструктивное процесса.

Микроскопическое исследование. С 7-х по 14-е сутки после внутрисуставного введения ретинола ацетата в полости сустава выявляются обрывки тканей. Лимфатические и венозные сосуды суставной капсулы расширены, стенки вен отечны, вокруг сосудов определяется перивазальный инфильтрат, участки лимфоцитарной инфильтрации. Среди лимфоцитов выявляются PNA⁺, SBA⁺, VSA⁺ лимфоциты. Определяются формирующиеся лимфоидные узелки, расположенные около сосудов. Наблюдается разрастание и нарушение архитектоники волокон переходной зоны, формируется паннус, волокна содержат рецепторы к лектину белоснежки весенней (LVA⁺).

Покровный синовиальный слой суставного хряща разволокнен, истончен по сравнению с контрольными животными (рис. 1). Базальная пластинка тонкая прерывистая, PNA⁺ (+++), SBA⁺ (+++), VSA⁺ (+++), LVA⁺ (+++), WGA⁺ (+++), LCA⁺ (+++). Матрикс покровного синовиального слоя окрашен менее интенсивно. В отличие от контроля в покровном синовиальном слое суставного хряща с моделированным остеоартрозом отсутствует зональность распре-

деления рецепторов к лектинам чечевицы и завязи пшеницы и метка распределена равномерно. Четкой границы между морфофункциональными зонами суставного хряща не визуализируется. Межтерриториальный матрикс содержит углеводные остатки β -D-галактозы, N-ацетил-алактозамина, N-ацетилглюкозамина и α -D-маннозы. Хондроциты распределены неравномерно. Суставной хрящ приобретает мозаичную структуру. Наблюдается демаскировка коллагеновых волокон поверхностной зоны, в результате чего выявляются участки разволокнения межтерриториального матрикса. Волокна суставного хряща содержат рецепторы к лектину белоснежки весенней (LVA⁺). Определяется незначительное нарушение столбчатой структуры суставного хряща. В поверхностной зоне выявляются хондроциты с вакуолизированной цитоплазмой. На цитоплазматической мембране хондроцитов с вакуолизированной цитоплазмой всех зон определяются рецепторы к лектину арахиса и завязи пшеницы. Нежные мелкодисперсные PNA⁺, SBA⁺, VSA⁺, WGA⁺ внутрицитоплазматические включения определяются только в неизмененных хондроцитах поверхностной зоны. Демаркационная линия не контурируется. Экстрацеллюлярный матрикс вокруг перистальных почек склерозирован.

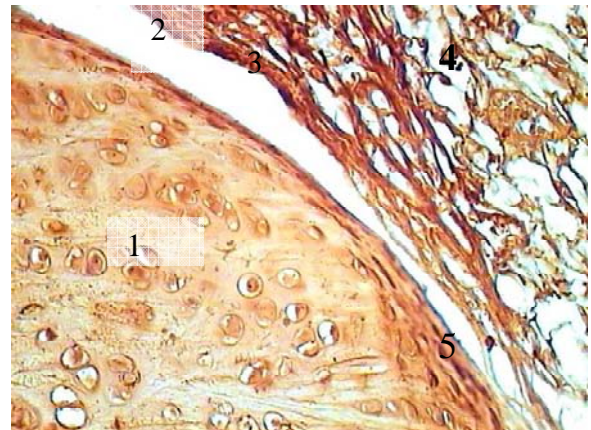


Рис. 1. Распределение рецепторов к лектину арахиса в коленном суставе крысы с моделированным остеоартрозом на 14-е сутки после окончания эксперимента. Ок. x 10, об. x 40. 1 - суставной хрящ, 2 - покровный синовиальный слой суставного хряща; 3 - суставная полость, 4 - синовиальная оболочка; 5 - переходная зона.

На 28-е сутки после окончания эксперимента в коленном суставе определяются грубые изменения, проявляющиеся развитием соединительной ткани суставной капсулы, разрастанием паннусов, увеличенным диаметром лимфатических и венозных сосудов, чьи стенки утолщены и инфильтрированы, узуррами суставного хряща, нарушением его архитектоники за счет вакуолизации цитоплазмы хондроцитов и нарушения свойств матрикса. Покровный синовиальный слой суставного хряща утолщается по сравнению с 14-ми сутками эксперимента, но остается уже, чем у контрольных животных (рис. 2).

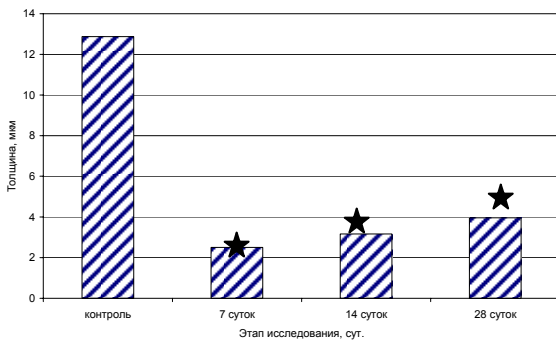


Рис. 2. Динамика изменения толщины покровного синовиального слоя суставного хряща дистального эпифиза бедренной кости крыс с моделированным остеоартрозом.

* - результат достоверен по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Таким образом, у крыс с моделированным остеоартрозом определяется нарушение целостности покровного синовиального слоя суставного хряща, что связано с цитотоксическим действием, оказываемым ретиноевой кислотой на синовиоциты и выделением ими металлопротеаз и других лизосомальных ферментов [22]. Это приводит к деструкции матрикса и базальной пластинки покровного синовиального слоя, что в свою очередь открывает доступ, как синовиальной жидкости, так и содержащейся в ней ретиноевой кислоты к хондроцитам суставного хряща. Покровный синовиальный слой суставного хряща, в норме отделяющий суставной хрящ от полости сустава, разволокнен, истончен по сравнению с контролем, на периферии инфильтрирован лимфоцитами. Базальная пластинка покровного синовиального слоя содержит углеводные остатки α -D-маннозы, β -D-галактозы, N-ацетилгалактозамина, N-ацетилгалактозамина, являющиеся рецепторами для лектинов чечевицы (LCA), посевного горошка (VSA), белоснежки весенней (LVA), арахиса (PNA), завязи пшеницы (WGA) и сои (SBA). Однако, в отличие от контроля распределение рецепторов к лектинам завязи пшеницы и чечевицы не проявляет зональности, что видимо влияет на механосенситивность компонентов покровного синовиального слоя суставного хряща и хондроцитов поверхностной зоны при развивающемся остеоартрозе [21]. К механорецепторам относится коннексин-43, эндогенный лектин из семейства коллектинов, являющихся маннозосвязывающими лектинами [18]. Коннексин-43 экспрессируется на цитоплазматической мембране хондроцитов, принимает участие в их дифференцировке и влияет на уровень синтетической активности хондроцитов в зависимости от выпадаемой нагрузки [16]. Также коннексин-43 опосредует связь хондроцитов с кератансульфатом экстрацеллюлярного матрикса, являющегося основным компонентом, обеспечивающим эластические и упругие свойства суставного хряща. На цитоплазматической мембране выстилающих клеток покровного слоя обнажаются молекулы фибронектина, выявляемые с помощью лектина арахиса [20], что усиливает адгезию

различных участков синовиальной оболочки (капсульной, хрящевой, менисковой), схожее увеличение экспрессии фибронектина наблюдали при плевритах, спаечной болезни [11].

Обращает внимание нарушение столбчатой структуры суставного хряща. Хондроциты во всех морфо-функциональных зонах делятся преимущественно перпендикулярно суставной поверхности, в то время как в контроле такое деление определяется только в поверхностной зоне, а в глубоких слоях образуются изогенные группы по 2-3 хондроцита, расположенные в виде столбиков или лучей. Нарушение архитектоники суставного хряща при данной модели остеоартроза может быть связано с изменением направления формирования веретена деления в хондроцитах, связанного с непосредственным действием ретиноевой кислоты, обеспечивающей в эмбриональном периоде деление хондроцитов формирующейся конечности в передне-заднем направлении [10].

У крыс с моделированным остеоартрозом цитоплазма большинства хондроцитов всех морфофункциональных зон вакуолизована. На цитоплазматической мембране хондроцитов промежуточной и базальной зоны на 7-е сутки после окончания эксперимента и всех зон, начиная с 14-х суток определяется экспрессия рецепторов к лектинам арахиса и завязи пшеницы, отражающая экстернализацию галектина-3 и аннексина-5 на цитоплазматической мембране, что приводит к запуску каскада реакций направленных на ускорение процессов минерализации экстрацеллюлярного матрикса хряща [14] и апоптоза хондроцитов [19].

Нарушается архитектура переходной зоны, что проявляется утолщением, извитостью волокон, влетающих в матрикс хряща и деформирующих его. На волокнах определяются рецепторы к лектину белоснежки весенней (LVA), позволяющих их отнести к коллагеновым волокнам 1 типа (Патент на корисну модель № 39538 G01N21/00 25.02.2009. Бюл.№ 4). Волокна, определяемые в матриксе хряща, вследствие их демаскировки, связанной с уменьшением гликозилирования [9], также являются коллагеновыми волокнами 1 типа, выявляемые с помощью лектина белоснежки весенней. Подобные изменения коллагенового состава суставного хряща при остеоартрозе в сторону коллагена 1 типа наблюдали при иммуногистохимическом изучении суставного хряща мышцей с моделированным остеоартрозом [22].

В суставной капсуле определяется увеличение размеров венозных и лимфатических сосудов, постепенное утолщение и лимфоцитарная инфильтрация их стенки. Утолщение стенки венозных и лимфатических сосудов приводит к развитию тканевой гипоксии капсулы, ее отеку вследствие нарушения оттока. Увеличение уровня гипоксии в свою очередь приводит к активации эндотелиального сосудистого фактора роста, что еще больше усугубляет процесс деструкции [23]. Синовиальная оболочка отечна,

определяются очаги лимфоцитарной инфильтрации и формирующиеся лимфоидные узелки. Среди лимфоцитов определяются PNA⁺, SBA⁺, VSA⁺ лимфоциты. Наблюдается увеличение слоистости покровного слоя синовиальной оболочки, формирование паннуса и срастание его с суставным хрящом.

Выводы:

1. У крыс с моделированным остеоартрозом наблюдается истончение, разволокнение и нарушение целостности покровного синовиального слоя суставного хряща.

2. У крыс с моделированным остеоартрозом изменяется локализация и интенсивность распределения рецепторов к лектинам завязи пшеницы и чечевицы в покровном синовиальном слое суставного хряща.

3. На цитоплазматической мембране хондроцитов с вакуолизированной цитоплазмой всех морфофункциональных зон увеличивается экспрессия рецепторов к лектину арахиса и завязи пшеницы.

Перспективы дальнейшей работы. В дальнейшем будет произведено изучение особенностей строения суставного хряща при моделированном остеоартрозе коленного сустава потомства крыс на фоне гормональных изменений в системе мать-плацента-плод.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк.- Львів: ПП "Кварт", 2005.- 554 с.
2. Артеменко Н. А. Особенности прогрессирования и лечения остеоартроза / Н. А. Артеменко, М. А. Чвамания // Человек и лекарство. 2005. - № 7, Т. 13. - С. 403-407.
3. Волошин Н. А. Лектины животного и растительного происхождения: роль в процессах морфогенеза / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Журн. АМН України.- 2005.- Т. 11, № 2.- С. 223-237.
4. Волошин Н. А. Лектингистохимическая характеристика клеток суставного хряща крыс в раннем постнатальном периоде в норме и эксперименте / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Таврический медико-биологический вестник.- 2008.- Т.11, № 3, ч.1.- С. 28-30.
5. Гайко Г. В. Остеоартроз – медико-социальная проблема та шляхи її вирішення / Г. В. Гайко // Вісник ортопедії, травматології та протезування. – 2003. - № 4. – С. 5 - 8.
6. Механізми формування остеоартрозу в підлітків / Лебець І. С., Шевченко Н. С., Матвієнко О. В. [та інші.] // Український ревматологічний журнал. – 2007. - № 4 (30). – С. 3- 6.
7. Морфологические аспекты экспериментального моделирования остеоартроза / В. Н. Коваленко, Н. А. Корж, Н. В. Дедух [и др.] // Украинський ревматологічний журнал. – 2005. – № 2 (20). – С. 18-22.
8. Особенности некоторых биохимических и влагообменных характеристик суставного хряща человека при остеоартрозе / С. С. Николаева, А. А. Рощина, Ким Зон Чхол [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002.-№ 5, Т. 133.–С.559– 563.
9. Панков Е. Я. Сравнительное морфологическое изучение различных моделей деформирующего остеоартроза / Е. Я. Панков, И. Фелдшп, Н. В. Де дух // Ортопедия, травматология и протезирование.–1988.-№6.–С.61-70.
10. Садлер Т. В. Медична ембріологія за Лангманом / Томас В. Садлер. – Львів: «Наутилус», 2001. – 550 с.
11. Albelda S. M. Integrins and other cell adhesion molecules / S. M. Albelda, C. A. Back // FASEB. J. – 1990. – Vol. 4. – P. 2868-2880.
12. Gao C.-X. Bisecting GlcNAc mediates the binding of annexin V to Hsp47 / C.-X. Gao, E. Miyoshi, N. Uozumi // Glycobiology.-2005.-№ 15.-P.1067-1075.
13. Iwamoto M. Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes / M. Iwamoto, I. M. Shapiro, K. Yamagami // Exp. Cell Research. – 1993. – N 207. – P. 413-420.
14. Kim H. J. Collagen/Annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization / H. J. Kim, T. Kirsch // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, Is. 16. - P. 10310 – 10317.
15. Kimura Y. Morphological changes in the joint of rat by intraarticular injection of vitamin A / Y. Kimura // Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi. – 1994. – N 7, Vol. 68. – P. 572 – 584.
16. Knight M. M. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors – a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium / M. M. Knight, S. R. McGlashan, Garcia M. // J. Anat. – 2009. – N 214 (2). – P. 275 -283.
17. Lapadula G. Early ultrastructural changes of articular cartilage and synovial membrane in experimental vitamin A – induced osteoarthritis / G. Lapadula, B. Nico, F. P. Cantatore // J. Rheumatol. – 1995. – N 10 (22). – P. 1913 – 1921.
18. Lu J. Collectins: collectors of microorganisms for the innate immune system / J. Lu // BioEssays.-1997.- Vol.19.- P.509-518.
19. Orazizadeh M. Differential immunohistochemical expression pattern of galectin-3 in normal and osteoarthritic human articular cartilage / M. Orazizadeh, D. M. Salter // IJI. - 2005. - N 2. - P. 78 - 86.
20. 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.
21. Ramage L. Signaling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading / L. Ramage, G. Nuki, D. M. Salter // Scand J. Med. Sci. Sports. – 2009. – N 19 (4). – P. 457-469.
22. Welch I. D. The retinoic acid binding protein CRABP2 is increased in murine models of degenerative joint diseases / Ian D. Welch, M. F. Cowan, F. Beier // Arthritis research and therapy. – 2009. – N 11. – P. 1186-1194.
23. Zelzer E. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development / E. Zelzer, R. Mamluk, N. Ferrara // Development. - 2004. – Vol. 131. - P. 2161 -2171.