

УДК 616-097:616-091.8

М.А. Волошин, О.А. Григор'єва, О.В. Моніна
Запорізький державний медичний університет

ОСОБЛИВОСТІ РЕАКТИВНОСТІ КОЛІННОГО СУГЛОБА ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЬОВАНОМУ ОСТЕОАРТРОЗІ

Показано, що у щурів після внутрішньосуглобового введення розчину ретиноевої кислоти спостерігається порушення будови усіх структур колінного суглоба, а також порушення цілісності покривного синовіального шару суглобової капсули; змінюється розподіл рецепторів до використаних лектинів, що відображає порушення механосенситивних і адгезивних властивостей клітин синовіального шару та суглобового хряща; спостерігається порушення архітектоніки перехідної частини суглобової капсули, що є основою для подальшого розвитку дистрофічних змін у суглобі як в органі.

Ключові слова: колінний суглоб, моделювання остеоартрозу, лімфатичні і венозні судини, інфільтрати.

Захворювання кісток і суглобів займають все більшу питому вагу в патології людей старше 50 років, до того ж, як свідчать демографічні дослідження, чисельність людей похилого і старечого віку збільшується. Крім того, захворювання все частіше зустрічаються у молодих людей [1–3]. Між тим, захворюванням суглобів не приділяється достатньої уваги у зв'язку з тим, що вони не є життєвоzagрозливими і традиційно вважаються пов'язаними з віком. Тим часом вартість лікування захворювань суглобового апарату є високою. Так виникла ідея організації Міжнародної декади кісток і суглобів (2000–2010) [4], ініціативу проведення якої підтримали ВООЗ і ООН.

Мета дослідження – встановити макрота мiкроскопічні особливості реактивності колінного суглоба після експериментального моделювання остеоартрозу.

Матеріал і методи. Моделювання остеоартрозу у щурів (постачальник щурів «Біомодельсервіс» (м. Київ) проводили за методом M. Boni et al. (1977) у модифікації Y. Kimura (1994) шляхом двократного (протягом двох днів) інтраартикулярного введення 3,44 % масляного розчину ретинолу ацетату. Ін'єкції масляного розчину вітаміну А в порожнину лівого колінного суглоба 120-добових щурів проводили з розрахунку 40000 МЕ/кг, або 13,76 мг/кг маси тіла щура. Правий колінний суглоб служив контролем. При роботі з експериментальними тваринами керувалися положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються

в експериментальних і інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Догляд за тваринами здійснювали відповідно до норм і вимог, розроблених згідно з кодексом Ради Міжнародних медичних організацій «Міжнародні рекомендації для проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин». Тварин виводили з експерименту на 7, 14 та 28-му добу після закінчення введення розчину ретинолу ацетату.

Парафінові блоки виготовляли так, щоб суглоби були розташовані однаково і щоб на зрізах відбивалася структура суглобового хряща стегнової кістки, надколінка, великогомілкової кістки, менісків, суглобової капсули. Серійні гістологічні зрізи виготовляли завтовшки 3–5 мкм для забарвлення гістологічних препаратів гематоксилином і еозином і постановки ШИК-реакції та завтовшки 7 мкм для виявлення рецепторів до лектинів (зрізи робляться дещо товще для кращої візуалізації відкладень бензидинової мітки). З одного блоку виготовляли 50–100 серійних зрізів. Вивчали розподіл рецепторів до лектинів арахісу (PNA), сої (SBA), посівного горошку (VSA), білосніжки весняної (LVA), зародків пшениці (WGA) та сочевиці (LCA). Облік результатів забарвлення лектиногістохімічного виявлення рецепторів до лектинів проводили напівкількісно: 0 – відсутнє забарвлення, + – забарвлення золотисто-коричневе, ++ – коричневе та +++ – темно-коричневе.

Результати. Макроскопічне дослідження. Колінний суглоб щурів через 7 днів після вве-

© М.А. Волошин, О.А. Григор'єва, О.В. Моніна, 2014

дення ретинолу ацетату дещо збільшений в розмірах. Зовні не деформований. По ходу кровоносних судин стегна визначається збільшена в діаметрі судина з молочно-білим вмістом. Капсула суглоба потовщена, гіперемована. При розтині суглоба визначається зрощення менісків із суглобовими хрящами стегнової і великогомілкової кісток, наявність набряклої рідини.

Через 14 діб після внутрішньосуглобового введення ретинолу ацетату спостерігається збільшення колінного суглоба в розмірах, визначаються періартикулярний набряк і розростання сполучної тканини капсули. При розтині суглобової порожнини поверхня суглобових хрящів тьмяна і нерівна, у порожнині суглоба визначаються фрагменти суглобового хряща, осередки зрощення менісків із суглобовими поверхнями стегнової і великогомілкової кісток. Синовіальна мембрана з осередками геморагії.

Через 28 діб після народження відбувається рубцювання періартикулярних тканин, капсула потовщена, визначаються ділянки бурого кольору, параартикулярні білуваті інфільтрати, спостерігається грануляційне розростання кісткової тканини надвиростків великогомілкової і стегнової кісток. При розтині суглобова поверхня нерівна, тьмяна, відмічаються осередки зрощення хряща з капсулою і меніском. У порожнині суглоба визначається детрит.

Мікроскопічне дослідження. На 7-му добу після закінчення експерименту в порожнині суглоба спостерігаються обривки тканин. Лімфатичні і венозні судини суглобової капсули розширені, їхні стінки набряклі, навколо судин виявляється перивазальний інфільтрат. Визначаються ділянки лімфоцитарної інфільтрації. Серед лімфоцитів виявляються PNA+, SBA+, VSA+-лімфоцити. Виявляються лімфоїдні вузлики, що формуються, вони розташовані біля судин синовіального шару суглобової капсули. Спостерігається розростання і порушення архітекtonіки LVA+ -волокон перехідної зони.

Визначається розволоknення синовіального шару вісцеральної частини суглобової капсули, його потоншення порівняно з контрольними тваринами. Базальна пластинка тонка, переривчаста, PNA+ (+++), SBA+ (+++), VSA+ (+++), LVA+ (+++), WGA+ (+++), LCA+ (+++). Матрикс синовіального шару забарвлений менш інтенсивно. На відміну від контрольних щурів у експериментальних тварин відсутня зональність розподілу рецепторів до лектинів сочевиці і зав'язі пшениці в синовіальному шарі

вісцеральної частини капсули, мітка розподілена рівномірно. Чіткої межі між морфофункціональними зонами суглобового хряща не визначається. Міжтериторіальний матрикс містить вуглеводні залишки галактози, галактозаміну, глюкозаміну і манози, що є рецепторами для усіх використаних в роботі лектинів. Хондроцити розподілені нерівномірно. Суглобовий хрящ набуває мозаїчної структури. Спостерігається демаскування колагенових волокон поверхневої зони, внаслідок чого виявляються ділянки розволоknення міжтериторіального матриксу. Волокна суглобового хряща LVA+. Визначається незначне порушення стовпчастості структури суглобового хряща. У поверхневій зоні виявляються хондроцити з вакуолізованою цитоплазмою. На цитоплазматичній мембрані хондроцитів з вакуолізованою цитоплазмою усіх зон визначаються рецептори до лектину арахісу і зав'язі пшениці. Ніжні дрібнодисперсні PNA+, SBA+, VSA+, WGA+ внутрішньоцитоплазматичні включення визначаються тільки в незмінених хондроцитах поверхневої зони. Демаркаційна лінія не контурує.

На 14-ту добу після закінчення експерименту дегенеративні зміни в колінному суглобі прогресують в порівнянні з 7-ою добою. Відмічається збільшення розростання грануляційної тканини капсули. Синовіальний шар набряклий. Судини розширені, їх стінки потовщені, виявляється лімфоцитарна перивазальна інфільтрація. Серед лімфоцитів визначаються PNA+, SBA+, VSA+-лімфоцити. У перехідній зоні архітекtonіка волокон порушена, LVA+ -волокна потовщені, влітають у матрикс суглобового хряща, змінюють його будову.

Покривний синовіальний шар суглобового хряща потовщується в порівнянні з 7-ою добою, але залишається достовірно тонкішим, ніж у контрольних щурів. Визначаються ділянки зрощення суглобового хряща з меніском і суглобовою капсулою. У місцях зрощення змінюється експресія рецепторів, що містять вуглеводні залишки. Стовпчаста структура суглобового хряща порушена. Екстрацелюлярний матрикс навколо вростаючих у хрящ кровоносних судин склерозований. Межа між морфофункціональними зонами не визначається. Цитоплазма хондроцитів усіх зон, у тому числі і поверхневої, вакуолізована. На цитоплазматичній мембрані хондроцитів усіх зон визначаються рецептори до лектину арахісу і зав'язі пшениці. Демаркаційна лінія не контурує.

На 28-му добу після закінчення експерименту в колінному суглобі визначаються грубі зміни, що проявляються розвитком фіброзу

суглобової капсули, розростанням сполучної тканини, збільшенням діаметром лімфатичних і венозних судин, чий стінки потовщені і інфільтровані, зурами суглобового хряща, порушенням його архітектоніки внаслідок вакуолізації цитоплазми хондроцитів і порушення властивостей матриксу. Покривний синовіальний шар суглобового хряща товщає порівняно з 14-ою добою експерименту, але залишається вужчим, ніж у контрольних тварин.

Таким чином, після дворазового внутрішньосуглобового введення масляного розчину ретинолу ацетату у щурів розвивається остеоартроз, що макроскопічно проявляється потовщенням капсули, її гіперемією, розростанням надвиростків, наявністю детриту в суглобовій порожнині, потьмянінням, зурами і грануляцією суглобових поверхонь стегнової і великогомілкової кісток, зрощенням суглобових поверхонь кісток з менісками. Протягом місяця після закінчення експерименту спостерігається прогрес дегенеративного процесу. При мікроскопічному дослідженні колінного суглоба щурів з модельованим остеоартрозом визначається порушення цілісності синовіального шару вісцеральної частини капсули суглоба, його розволокнення і потоншення в порівнянні з контролем, інфільтрація лімфоцитами. Базальна пластинка синовіального шару вісцеральної частини капсули суглоба містить вуглеводні залишки α -D-манози, β -D-галактози, N-ацетилглюкозаміну, N-ацетилгалактозаміну, що є рецепторами для досліджуваних лектинів (LCA, VSA, LVA, PNA, WGA та SBA). Проте на відміну від контролю розподіл рецепторів до лектинів зав'язі пшениці і сочевиці (WGA і LCA) не проявляє зональності. Порушується стовпчаста структура суглобового хряща. Хондроцити діляться переважно перпендикулярно суглобовій поверхні, тоді як в контролі таке ділення визначається тільки в поверхневій зоні, а в глибоких шарах утворюються ізогенні групи по 2–3 хондроцити, що розташовані у вигляді стовпчиків або променів. Цитоплазма більшості хондроцитів усіх морфофункціональних зон вакуолізована, що властиво ювенільному хрящу. На цитоплазматичній мембрані хондроцитів проміжної і базальної зон на 7-му добу після закінчення експерименту і усіх зон починаючи з 14-ої доби визначається експресія рецепторів до лектинів арахісу і зав'язі пшениці, що відбиває екстерналізацію галектину-3 і анексину-5 на цитоплазматичній мембрані. Порушується архітектоніка перехідної зони, що проявляється

ся потовщенням, звивістю волокон, котрі влітають в матрикс хряща і деформують його. На волокнах визначаються рецептори до лектину білосніжки весняної (LVA). У суглобовій капсулі відбуваються збільшення діаметра венозних і лімфатичних судин, поступове потовщення і лімфоцитарна інфільтрація їхньої стінки. Синовіальний шар набряклий, визначаються осередки лімфоцитарної інфільтрації і лімфоїдні вузлики, що формуються. Серед лімфоцитів визначаються PNA+, SBA+, VSA+–лімфоцити. Спостерігається збільшення шаруватості синовіального шару і зрощення його з суглобовим хрящем.

Обговорення. Встановлено, що у щурів із змодельованим остеоартрозом порушуються цілісність покривного синовіального шару суглобового хряща, що пов'язано з цитотоксичною дією ретиноевої кислоти на синовіоцити і з виділенням ними металопротеаз і інших лізосомальних ферментів. Це призводить до деструкції матриксу і базальної пластинки покривного синовіального шару, що у свою чергу відкриває доступ як синовіальній рідині, так і ретиноевій кислоті, що міститься в ній до хондроцитів суглобового хряща. Спостерігається розволокнення і стоншення покривного синовіального шару суглобового хряща, його інфільтрація лімфоцитами. Базальна пластинка покривного синовіального шару містить вуглеводні залишки α -D-манози, β -D-галактози, N-ацетилглюкозаміну, N-ацетилгалактозаміну. Проте на відміну від контролю розподіл рецепторів до лектинів зав'язі пшениці і сочевиці не має зональності, що, мабуть, впливає на механосенситивність компонентів покривного синовіального шару суглобового хряща і хондроцитів поверхневої зони при остеоартрозі [5]. До механорецепторів відноситься конексин-43, ендогенний лектин із сімейства колектинів, що являються манозозв'язуючими лектинами [6]. Конексин-43 експресований на цитоплазматичній мембрані хондроцитів, бере участь в їх диференціюванні і впливає на рівень синтетичної активності хондроцитів залежно від навантаження [7]. Також конексин-43 опосередковує зв'язок хондроцитів з кератансульфатом екстрацелюлярного матриксу, котрий є основним компонентом, що забезпечує еластичні і пружні властивості суглобового хряща. На цитоплазматичній мембрані вистеляючих клітин покривного шару оголюються молекули фібронектину, що виявляються за допомогою лектину арахісу [8]. Фібронектин посилює адгезію різних

ділянок синовіального шару (капсульної, хрящової, меніскової), схоже збільшення експресії фібронектину спостерігали при плевритах, спайковій хворобі [9].

В умовах моделювання остеоартрозу привертає увагу порушення стовпчастої структури суглобового хряща. Хондроцити в усіх морфологічних зонах діляться переважно перпендикулярно суглобовій поверхні, тоді як в контролі таке ділення спостерігається тільки в поверхневій зоні, а в глибоких шарах утворюються ізогенні групи по 2–3 хондроцити, розташовані у вигляді стовпчиків або променів. Порушення архітекtonіки суглобового хряща при цій моделі остеоартрозу може бути пов'язане зі зміною напрямку формування веретена ділення в хондроцитах внаслідок безпосередньої дії ретиноевої кислоти, що забезпечує в ембріональному періоді ділення хондроцитів кінцівки в передньозадньому напрямку [10].

У щурів із модельованим остеоартрозом цитоплазма більшості хондроцитів усіх морфологічних зон вакуолізована. На цитоплазматичній мембрані хондроцитів проміжної і базальної зон на 7-му добу після закінчення експерименту і усіх зон починаючи з 14-ої доби визначається експресія рецепторів до лектинів арахісу і зав'язі пшениці, що віддзеркалює екстерналізацію галектину-3 і анексину-5 на цитоплазматичній мембрані, яка призводить до запуску каскаду реакцій, спрямованих на прискорення процесів мінералізації екстрацелюлярного матриксу хряща [11] і апоптозу хондроцитів [12].

Порушується архітекtonіка перехідної частини, що проявляється потовщенням, звистістю волокон, які влітають в матрикс хряща і деформують його. На волокнах визначаються рецептори до лектину білосніжки весняної (LVA), що дозволяє віднести їх до колагенових волокон I типу [13]. Волокна, що визначаються в матриксі хряща, внаслідок їх демаскування, пов'язаного із зменшенням глікозування [14], також є колагеновими во-

локнами I типу, які виявляються за допомогою лектину белосніжки весняної. Подібні зміни колагенового складу суглобового хряща при остеоартрозі у бік колагену I типу спостерігали при імуногістохімічному вивченні суглобового хряща мишей з модельованим остеоартрозом [15].

У суглобовій капсулі визначаються збільшення розмірів венозних і лімфатичних судин, поступове потовщення і лімфоцитарна інфільтрація їх стінки. Розростання сполучної тканини навколо стінки венозних і лімфатичних судин призводить до розвитку тканинної гіпоксії капсули, її набряку внаслідок порушення відтоку. Збільшення рівня гіпоксії, у свою чергу, призводить до активації ендотеліального судинного фактора зростання, що ще більше посилює процес деструкції [16]. Синовіальний шар капсули набряклий, визначаються осередки лімфоцитарної інфільтрації і лімфоїдні вузлики, що формуються. Серед лімфоцитів визначаються PNA+, SBA+, VSA+–лімфоцити. Спостерігається збільшення шаруватості покривного шару, синовіального шару, формування панусу і зрощення його з суглобовим хрящем.

Висновки

У щурів після внутрішньосуглобового введення розчину ретиноевої кислоти спостерігається порушення будови усіх структур колінного суглоба. Виявлено порушення цілісності покривного синовіального шару суглобової капсули, змінюється розподіл рецепторів до використаних лектинів, що відображає порушення механосенситивних і адгезивних властивостей клітин синовіального шару та суглобового хряща; спостерігається порушення архітекtonіки перехідної частини суглобової капсули, що є основою для подальшого розвитку дистрофічних змін у суглобі як в органі.

Перспективи подальшої роботи. На наступному етапі буде вивчено особливості реактивності субхондральної кістки в умовах експериментального остеоартрозу.

Література

1. Гайко Г.В. Остеоартроз – медико-соціальна проблема та шляхи її вирішення / Г.В. Гайко // Вісник ортопедії, травматології та протезування. – 2003. – № 4. – С. 5–8.
2. Механізми формування остеоартрозу в підлітків / І.С. Лебець, Н.С. Шевченко, О.В. Матвієнко [та ін.] // Український ревматологічний журнал. – 2007. – № 4 (30). – С. 3–6.

3. *Моїсеєнко О.С.* Особливості реакції кісткової та хрящової тканин на термічне ураження та вживання солей важких металів у старечому віці / О.С. Моїсеєнко // Вісник морфології. – 2006. – Т. 12, № 2. – С. 229–231.
4. *Родіонова Н.В.* Морфологічні особливості взаємодії клітин під впливом радонових ванн / Н.В. Родіонова, О.М. Нестеренко // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Т. 9, № 3. – С. 146–148.
5. *Ramage L.* Signaling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading / L. Ramage, G. Nuki, D.M. Salter // Scand J. Med. Sci. Sport. – 2009. – № 19 (4). – P. 457–469.
6. *Lu J.* Collectins: collectors of microorganisms for the innate immune system / J. Lu // BioEssays. – 1997. – Vol. 19. – P. 509–518.
7. *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, M. Garcia // J. Anat. – 2009. – № 214 (2). – P. 275–283.
8. *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.
9. *Albelda S.M.* Integrins and other cell adhesion molecules / S.M. Albelda, C.A. Back // FASEB. J. – 1990. – Vol. 4. – P. 2868–2880.
10. *Соколов В.В.* Морфофункциональная характеристика ангиоархитектоники капсулы коленного сустава человека / В.В. Соколов, А.В. Маркевич // Таврический медико-биологический вестник. – 2004. – Т. 7, № 4. – С. 279–282.
11. *Kim H.J.* Collagen / Annexin V Interactions regulate chondrocyte mineralization / H.J. Kim, Thorsten Kirsch // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, Is. 16. – P. 10310–10317.
12. *Orazizadeh M.* Differential immunohistochemical expression pattern of galectin-3 in normal and osteoarthritic human articular cartilage / M. Orazizadeh, D.M. Salter // IJL. – 2005. – № 2. – P. 78–86.
13. Патент на корисну модель № 39538 G01N21/00. Спосіб виявлення волокон колагену I типу у лабораторних тварин в гістологічних зрізах / М.А. Волошин, О.А. Григор'єва. Заявл. 11.11.2008; опубл. 25.02.2009. – Бюл. № 4.
14. *Пальцев М.А.* Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов. – М.: Медицина, 1995. – 224 с.
15. *Welch I.D.* The retinoic acid binding protein CRABP2 is increased in murine models of degenerative joint diseases / I.D. Welch, M.F. Cowan, F. Beier // Arthritis research and therapy. – 2009. – № 11. – P. 1186–1194.
16. *Zelzer E.* VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development / E. Zelzer, R. Mamluk, N. Ferrara // Development. – 2004. – Vol. 131. – P. 2161–2171.

М.А. Волошин, Е.А. Григор'єва, Е.В. Монина

ОСОБЕННОСТИ РЕАКТИВНОСТИ КОЛЕННОГО СУСТАВА КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАННОМ ОСТЕОАРТРОЗЕ

Показано, что у крыс после внутрисуставного введения раствора ретиноевой кислоты наблюдается нарушение строения всех структур коленного сустава. Обнаружено нарушение целостности покровного синовиального слоя суставной капсулы, изменяется распределение рецепторов к использованным лектинам, что отображает нарушение механосенситивных и адгезивных свойств клеток синовиального слоя и суставного хряща; наблюдается нарушение архитектоники переходной части суставной капсулы, которая является основой для дальнейшего развития дистрофических изменений в суставе как в органе.

Ключевые слова: коленный сустав, моделирование остеоартроза, лимфатические и венозные сосуды, инфильтраты.

М.А. Voloshyn, O.A. Grygorieva, O.V. Monina

PECULIARITIES OF THE KNEE JOINT REACTION IN EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS

Impairment of the covering synovial layer of the articular joint was revealed in the research, it was accompanied by a variety of changes in lectins' receptors localization and level of their expression; all these define impairment of mechanic sensitivity and adhesive properties of the synovial and cartilage cells. Impairment of the transitional zone of the articular capsule promotes further dystrophic changes in the joint.

Key words: knee joint, design of osteoarthrosis, lymphatic and venous vessels, infiltrats.

Поступила 24.07.14