

Н.А.Волошин, Е.А. Григорьева

Экспериментальная модель развития синдрома недифференцированной дисплазии соединительной ткани

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: внутриматочное введение антигена, PNA⁺-лимфоциты, синовиальная оболочка, суставной хрящ.

В работе установлено, что содержание PNA⁺-лимфоцитов в суставном аппарате динамически изменяется на протяжении двух месяцев после рождения. Внутриматочное введение иммуноглобулина увеличивает содержание PNA⁺-лимфоцитов в синовиальной оболочке крыс. На фоне увеличенного содержания PNA⁺-лимфоцитов в синовиальной оболочке крыс у антигенпремированных животных определяется более раннее формирование субхондральной кости, изменяется толщина суставного хряща, темпы его формирования и истончения, изменяется характер синтеза и распределения волокон синовиальной оболочки.

Експериментальна модель розвитку синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини

М.А.Волошин, О.А.Григор'єва

В роботі встановлено, що вміст PNA⁺-лімфоцитів в суглобовому апараті щурів динамічно змінюється протягом двох місяців після народження. Внутрішньоматочне введення антигену збільшує вміст PNA⁺-лімфоцитів в синовіальній оболонці щурів. У щурів після внутрішньоматочного введення антигену визначається більш раннє формування субхондральної кістки, змінюється товщина суглобового хряща та строки його формування, змінюється характер синтезу і розподілу волокон синовіальної оболонки.

Ключові слова: внутрішньоматочне введення антигену, PNA⁺-лімфоцити, синовіальна оболонка, суглобовий хрящ.

Патологія. – 2009. – Т.6., №1. – С. 39-42

Experimental model of undifferentiated connective tissue dysplasia syndrome

N.A.Voloshyn, E.A.Grygoryeva

It is settled that amount of PNA⁺-lymphocytes in synovial membrane changes during two months after birth. Intranatal antigen injection increases the amount of of PNA⁺-lymphocytes in rats' synovial membrane. In antigenprimed rats subchondral bone appears earlier, than in controlled ones, thickness of articular cartilage and terms of its development, process of synovial fibers synthesis and their localization also change in experimental conditions.

Key words: intranatal antigen injection, PNA⁺-lymphocytes, synovial membrane, articular cartilage.

Patologia. 2009;6(1): 39-42

Начиная с эмбрионального периода развития вследствие сложных межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий соединительная ткань оказывает влияние на дифференцировку и организацию тканей и органов на протяжении онтогенеза [9]. В последние два десятилетия наблюдается рост числа случаев недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ) в структуре пограничных состояний с доминированием синдрома гипермобильности суставов [7]. Этиопатогенетические причины НДСТ до настоящего времени не ясны и вызывают дискуссию. Для установления морфологического субстрата НДСТ необходимо разработать экспериментальную модель, что позволит усовершенствовать профилактические мероприятия и прогнозировать развитие как воспалительных, так и дистрофических заболеваний суставного аппарата у лиц с признаками НДСТ. Лимфоциты, наряду с антигенпрезентирующими клетками, являются одним из главных факторов морфогенеза [3]. Изменение процессов пролиферации, дифференцировки, миграции лимфоцитов после внутриутробного введения антигенов различной природы, приводит к заселению периферических лимфоидных органов PNA⁺-лимфоцитами [2], среди которых наряду с иммунологически незрелыми лимфоцитами присутствуют γ/δ -Т-лимфоциты. Ранее установлено, что увеличение содержания PNA⁺-лимфоцитов и их функциональная активность вызывает дисбаланс формирования клеток микроокружения, синтеза межклеточного вещества, волокон экстрацеллюлярного матрикса, что

приводит к нарушению морфофункционального состояния органов, в целом [3]. Динамика PNA⁺ лимфоцитов суставного аппарата в раннем постнатальном периоде на фоне внутриутробной антигенной стимуляции не описана.

Цель: изучить распределение и динамику PNA⁺ лимфоцитов в синовиальной оболочке в сопоставлении с изменениями со стороны суставного аппарата коленного сустава крыс в раннем постнатальном периоде.

Материалы и методы исследования

В работе исследованы 3 группы животных от момента рождения до 45-х суток жизни. Первая группа – интактные крысы линии Вистар. Животным второй группы на 18 сутки внутриутробного периода развития чрезматочно чрезоболочечно подкожно вводился иммуноглобулин человеческий по методу Н.А.Волошина (1981). Контролем служили крысы, которым на 18-е сутки внутриутробного периода развития чрезматочно чрезоболочечно подкожно вводился физиологический раствор. При работе с экспериментальными животными руководствовались “Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях” (Страсбург, 18.03.86). Крысята рождались доношенными на 22-23 сутки. Забой животных осуществляли: 1, 7, 11, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120 сутки после рождения. Измеряли длину большеберцовой кости крыс. Методика изготовления гистологических препаратов сустава описана в работе [4]. В срезах изучали динамику толщины суставного хряща

дистального эпифиза бедренной кости, распределение коллагеновых волокон синовиальной оболочки. Выявление углеводных остатков β -D-галактозы проводили с применением лектина арахиса (PNA⁺) по стандартной методике [8], с использованием стандартных наборов НПК «ЛектинТест» (г.Львов). Контрольные срезы инкубировали с конъюгатом PNA-HRP в присутствии 0,4% раствора лактозы. определяли абсолютное содержание PNA⁺ лимфоцитов на условной единице площади синовиальной оболочки (10000 мкм²). Данные обработаны методами вариационной статистики при $p \leq 0,05$.

Результаты собственных исследований

У крыс процесс кавитации сустава происходит в течение первой недели после рождения, когда на микроскопическом уровне определяются суставные хрящи, характеризующиеся еще как эмбриональные, синовиальная оболочка с начинающимися формироваться ворсинками, мениски, надколенник, в котором не определяется точка оссификации (рис. 1, цв. вкладка 3).

У экспериментальных новорожденных крыс большеберцовая кость длиннее, чем у контрольных животных. Суставной хрящ характеризуется как эмбриональный. В составе синовиальной оболочки антигенстимулированных крыс содержание волокон достоверно ниже, чем у контрольных. Среди лимфоцитов синовиальной оболочки (рис. 2, цв. вкладка 3) выявляются PNA⁺-лимфоциты (рис.3, цв. вкладка 3). У новорожденных экспериментальных животных определяется $5,0 \pm 0,29$ PNA⁺-лимфоцитов на условной единице площади, что составляет 80,65 % от всех лимфоцитов синовиальной оболочки, у контрольных крыс содержание PNA⁺ лимфоцитов в синовиальной оболочке ниже – $4,0 \pm 0,31$, что составляет 76,92 % от всех лимфоцитов синовиальной оболочки. PNA⁺-лимфоциты расположены преимущественно в переходной зоне, около сосудов, в основании формирующихся менисков и ворсин, также они определяются в участках сращения мениска с суставным хрящом, по-видимому, контролируя процесс резорбции ткани.

К седьмым суткам после рождения плотность распределения PNA⁺ лимфоцитов в синовиальной оболочке несколько возрастает по сравнению с новорожденными животными, составляя $4,6 \pm 0,19$ лимфоцитов в контроле и $6,0 \pm 0,35$ лимфоцитов на условной единице площади у экспериментальных животных, что составляет 59,74 % и 66,67 % от всех лимфоцитов синовиальной оболочки, соответственно.

На 11-е сутки после рождения длина большеберцовых костей практически одинакова во всех группах животных (табл. 1). У антигенстимулированных крыс субхондральная кость сформирована, в то время, как у контрольных и интактных крыс на месте будущей субхондральной кости определяется зона хондроцитов с вакуолизированной цитоплазмой, и суставной хрящ соответствует эмбриональному (рис. 4, цв. вкладка 3). По ходу врастающих сосудов, участвующих в формировании субхондральной кости определяются единичные PNA⁺ лимфоциты. У интактных

и контрольных животных наблюдается уменьшение плотности распределения PNA⁺-лимфоцитов в синовиальной оболочке коленного сустава по сравнению с 7-ми сутками ($3,8 \pm 0,21$ клетки, что составляет 52,77 % от всех лимфоцитов синовиальной оболочки), а у экспериментальных крыс их количество практически не изменяется по сравнению с 7-ми сутками жизни ($5,9 \pm 0,28$ лимфоцита на условной единице площади, что составляет 67,82 % от всех лимфоцитов). У антигенстимулированных крыс содержание волокон в синовиальной оболочке достоверно ниже, чем у интактных и контрольных животных.

На 14-е сутки после рождения определяется укорочение большеберцовой кости экспериментальных крыс по сравнению с контролем (табл. 1), что, связано с более ранним появлением субхондральной кости. Суставной хрящ дистального эпифиза бедренной кости крыс после внутриматочного введения иммуноглобулина на 60,01 % толще, чем в контроле. Содержание волокон в синовиальной оболочке экспериментальных крыс достоверно ниже, чем у контрольных животных (табл.1). До 21-х суток жизни в синовиальной оболочке всех групп животных количество как PNA⁺, так и всех лимфоцитов снижается (табл. 1).

К концу первого месяца жизни содержание лимфоцитов, в целом, и PNA⁺ лимфоцитов, в частности, несколько возрастает по сравнению с 21-ми сутками. Плотность распределения лимфоцитов в синовиальной оболочке крыс после внутриматочного введения иммуноглобулина выше, чем у контрольных животных ($5,56 \pm 0,29$ и $3,61 \pm 0,28$ PNA⁺ лимфоцитов, соответственно, что составляет 79,43 % и 64,29 % от всех лимфоцитов синовиальной оболочки экспериментальных и контрольных животных). На этом фоне определяется истончение суставного хряща экспериментальных крыс по сравнению с контрольными (табл. 1). Истончение происходит преимущественно за счет промежуточной и базальной зоны суставного хряща, что было описано нами ранее [1]. В синовиальной оболочке экспериментальных животных наблюдается увеличение плотности распределения волокон (табл. 1).

В дальнейшем, до конца второго месяца жизни общее содержание лимфоцитов в синовиальной оболочке коленного сустава контрольных крыс практически не изменяется, а содержание PNA⁺ лимфоцитов уменьшается (табл. 1). У экспериментальных животных общее содержание лимфоцитов в полтора раза выше, чем в контроле, а содержание PNA⁺ лимфоцитов постепенно снижается, но остается выше, чем в контроле. Толщина суставного хряща дистального эпифиза бедренной кости достоверно меньше, чем в контроле, а содержание волокон в синовиальной оболочке – выше, чем у контрольных крыс (табл. 1).

Таким образом, в синовиальной оболочке крыс в раннем постнатальном периоде среди лимфоцитов выявляются PNA⁺-лимфоциты. Пик содержания последних приходится на 7-е сутки жизни, после чего, к концу второго месяца жизни их плотность распределения PNA⁺

Таблица 1

Динамика морфометрических показателей крысы в раннем постнатальном периоде после внутриплодного введения иммуноглобулина

Показатель	Гр. животных	Возраст, сутки						
		1-е	11-е	14-е	21-е	30-е	45-е	60-е
Длина большеберцовой кости, мм	1	7,5 ± 1,19	12,94 ± 1,19	15,29 ± 1,22	18,29 ± 1,19	22,0 ± 2,69	22,45 ± 1,93	27,43 ± 2,69
	2	9,0 ± 0,83	12,2 ± 1,1	13,0 ± 1,34	16,77 ± 0,55	20,45 ± 0,86	22,21 ± 1,34	25,72 ± 1,93
Толщина суставного хряща, мкм	1	Суставной хрящ эмбриональный		423,21 ± 12,67	379,17 ± 19,92	484,55 ± 13,45	332,33 ± 16,87	216,11 ± 11,57
	2	Суставной хрящ эмбриональный	507,5 ± 21,43	681,43 ± 39,83*	422,50 ± 16,53	390,77 ± 15,99*	311,86 ± 12,67	156,69 ± 13,53*
Содержание волокон в синовиальной оболочке коленного сустава, %	1	24,64 ± 1,68	25,56 ± 2,00	26,97 ± 1,68	28,26 ± 1,66	30,00 ± 1,18	36,67 ± 2,67	34,76 ± 2,37
	2	18,57 ± 1,78*	19,54 ± 1,78*	16,6 ± 1,51*	33,85 ± 2,59*	34,29 ± 1,78	35,24 ± 2,37	41,67 ± 2,14*
Абсолютное количество лимфоцитов на усл.ед.пл.	1	5,2 ± 0,06	7,22 ± 0,27	6,0 ± 0,27	5,2 ± 0,17	5,6 ± 0,16	5,3 ± 0,16	5,6 ± 0,17
	2	6,2 ± 0,04*	8,7 ± 0,29*	8,0 ± 0,24*	6,7 ± 0,29*	7,0 ± 0,13*	8,6 ± 0,16*	9,09 ± 0,11
Абсолютное количество PNA ⁺ лимфоцитов	1	4,0 ± 0,31	3,8 ± 0,21	3,16 ± 0,21	2,85 ± 0,17	3,61 ± 0,28	3,05 ± 0,28	2,9 ± 0,29
	2	5,0 ± 0,29	5,9 ± 0,28*	5,2 ± 0,30*	4,3 ± 0,34*	5,56 ± 0,29*	5,63 ± 0,29*	4,5 ± 0,21*

Примечание: 1- контрольная группа крыс; 2 – крысы после внутриплодного введения иммуноглобулина; * - достоверно при $p \geq 0,05$ по отношению к контрольной группе.

-лимфоцитов волнообразно уменьшается, но они не исчезают, что соответствует данным, о присутствии среди PNA⁺-лимфоцитов популяции γ/δ -Т лимфоцитов, выполняющих иммунорегуляторную функцию [2, 12]. Эти клетки выявляются среди иных популяций лимфоцитов синовиальной оболочки [10].

Внутриплодное введение иммуноглобулина приводит к увеличению общего содержания лимфоцитов в синовиальной оболочке, как всех, так и PNA⁺-лимфоцитов. Функциональная активность PNA⁺-лимфоцитов вызывает изменение функционирования, дисбаланс формирования клеток микроокружения, синтеза межклеточного вещества, волокон экстрацеллюлярного матрикса, что приводит к нарушению морфофункционального состояния органов в целом. У таких новорожденных развивается синдром висцеромегалии, проявляющийся гепатомегалией, спленомегалией, тимомегалией, более ранними сроками становления дефинитивной коры надпочечников с нарушением пропорций между паренхимой и остовом, удлинением кишечника [2].

Увеличенное содержание PNA⁺-лимфоцитов в синовиальной оболочке изменяет функциональную активность фибробластов, оказывая влияние на уровень синтеза волокон и компонентов экстрацеллюлярного матрикса, что проявляется изменением соотношения между волокнами и экстрацеллюлярным матриксом (гликозаминогликанами

и гликопротеидами) синовиальной оболочки в сторону преобладания межклеточного вещества. Измененный характер синтеза волокон синовиальной оболочки коленного сустава крыс после внутриплодного введения антигена соответствует данным о дезорганизации волокон в дерме при гипермобильном синдроме [13]. Данный факт необходимо учитывать при развитии воспаления у детей раннего возраста, подвергшихся антигенной нагрузке во внутриутробном периоде развития.

Увеличенное содержание PNA⁺ лимфоцитов в синовиальной оболочке возможно изменяет активность эндотелиоцитов, увеличивая синтез VEGF, играющего одну из ключевых ролей в процессе энхондрального окостенения [11, 14]. Это приводит к более ранней сосудистой инвазии и преждевременному образованию субхондральной кости и суставного хряща, хондроциты которого являются функционально незрелыми. Испытывая агрессивное воздействие со стороны остеобластов субхондральной кости, наряду с возрастающей механической нагрузкой, суставной хрящ антигенпремированных крыс, являясь, по сути, функционально незрелым, сначала компенсаторно утолщается, а в дальнейшем необратимо истончается, что является предпосылкой развития первичного остеоартроза. Наряду с этим, у антигенпремированных животных выявлено изменение пропорций тела по сравнению с контрольными животными, что проявляется укорочением

голении в раннем постнатальном периоде [5].

Экспериментально установленные изменения в виде нарушения распределения волокон в суставной капсуле, утолщение суставного хряща на 14-е сутки и его последующее истончение к 60-м суткам, более раннее появление субхондральной кости с последующим нарушением формирования костей конечностей - являются малыми стигмами синдрома НДСТ, которые возникают на фоне внутриутробного проникновения антигена.

Выводы

Содержание PNA⁺-лимфоцитов динамически изменяется на протяжении двух месяцев после рождения. Внутриплодное введение иммуноглобулина увеличивает содержание PNA⁺-лимфоцитов в синовиальной оболочке крыс.

На фоне увеличенного содержания PNA⁺-лимфоцитов в синовиальной оболочке крыс у антигенстимулированных животных определяется более раннее формирование субхондральной кости, изменяется толщина суставного хряща, темпы его формирования и истончения, изменяется характер синтеза и распределения волокон синовиальной оболочки.

Литература

1. Волошин Н. А. Влияние внутриутробного антигенного воздействия на формирование морфофункциональных зон суставного хряща дистального эпифиза бедренной кости крыс в раннем постнатальном периоде / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Укр. Мед. Альманах.- 2006.- Т.4, № 2.- С. 31-34.
2. Волошин Н. А. Внутриутробная антигенная стимуляция как модель для изучения симптомокомплекса висцеромегалии / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева, М. С. Щербаков // Таврический медико-биологический вестник.- 2006.-Т.9, № 4.- С. 57-59
3. Волошин Н. А. Внутриутробная антигенная стимуляция как модель для изучения морфогенеза органов / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева, О. Г. Куц // Морфологические ведомости.-

2006.- № 1-2, приложение 1.- С. 57-59.

4. Григорьева Е.А. Методические особенности изучения строения суставного хряща крыс в раннем постнатальном периоде онтогенеза / Е. А. Григорьева // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. - 2006. - Т. 142, № 1.- С. 13-15.

5. Григорьева Е.А. Особенности динамики массо-ростовых показателей крыс в раннем постнатальном периоде в норме и после внутриутробного введения иммуноглобулина и гидрокортизона / Е.А. Григорьева, А. В. Шестакова // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики.- 2005.- вип. XIV.- С.181-185.

6. Клеменов А. В. Недифференцированная дисплазия соединительной ткани: клинические проявления, возможности диагностики и патогенетического лечения / А. В. Клеменов // М.: ООО «Информтех», 2005. - 136 с.

7. Корж Н. А. Дисплазия соединительной ткани и патология опорно-двигательной системы: обзор / Н. А. Корж, С. А. Сердюк, Н. В. Дедух // Ортопедия, травматология и протезирование.- 2002.- № 4.- С.150-154.

8. Луцук А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцук, Е. С. Детюк, М. Д. Луцук. - Львов: Вища школа, 1989.- 140с.

9. Юрина Н. А. Морфо-функциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани / Н.А. Юрина, А.И. Радостина // М.: Изд-во УДН, 1990.- 322 с.

10. Behar S. M. Mechanisms of autoimmune disease induction. The role of the immune response to microbial pathogens / S. M. Behar, S.A. Porcelli // Arthr. Rheum. - 1995. - Vol. 38, N 4.- P. 458 - 476.

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

12. Hayday A. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ -T cells / A. Hayday, R. Tigelaar // Nat. Rev. Immunol. - 2003. - № 3.- P. 233-242.

13. Kobayasi T. Dermal elastic fibres in the inherited hypermobile disorders // J Dermatol. Sci. - 2006.- Vol. 41(3).- P. 175-85.

14. Maes C., Stockmans I., Moermans K. Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival // J. Clin. Invest.-2004.- Vol. 113.- P.188-199.

Адрес для переписки: г.Запорожье, 69035, пр. Маяковского – 26, тел. (8061)2333356, e-mail: mstesha@mail.ru