

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ КАПСУЛИ СУГЛОБА ПІСЛЯ АНТЕНАТАЛЬНОЇ ДІЇ АНТИГЕНУ

Волошин М.А., Федотченко А.В.

Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя

Резюме. У роботі, застосовуючи морфометричний, гістологічний, гістохімічний та статистичний методи, досліджена динаміка становлення капсули кульшового суглоба білих лабораторних щурів протягом постнатального періоду після внутрішньо плідного введення антигену. Встановлено, що антенатальна дія антигену призводить до збільшення кількості лімфоцитів, зокрема PNA+ лімфоцитів у капсулі суглоба. На цьому тлі спостерігаються збільшення частки клітин, основної речовини та еластичних волокон при одночасному зменшенні вмісту колагенових волокон, порушення розподілу полісахаридів та фібробластів, що вказує на розвиток диспластичних процесів у кульшовому суглобі та може розглядатися як провідний рушійний фактор розвитку коксартрозу. Експериментально отримано доліхостеномелію як візуальний клінічний прояв дисплазії.

Ключові слова: кульшовий суглоб, капсула суглоба, дисплазія сполучної тканини, антиген.

PECULIARITIES OF JOINT CAPSULE FORMATION UNDER THE ANTENATAL ANTIGEN INFLUENCE

Voloshyn M.A., Fedotchenko A.V.

Zaporizhzhia State Medical University by the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia

Summary. Using morphometric, histological, histochemical and statistical methods the dynamics of hip joint capsule forming in white laboratory rats has been investigated in a postnatal period after the intra-foetal injection of antigen. It was established that the antenatal action of antigen led to an increase in the lymphocyte count, in particular of PNA+ ones in the joint capsule. Against this background, an increase in the percentage of cells, amorphous substance and elastic fibres along with the reduction in collagen fiber content and disorders of polysaccharide and fibroblast distribution which indicate the development of dysplastic processes in the hip joint and may be considered an underlying factor of coxarthrosis. Dolichostenomelia was experimentally obtained to provide a visual clinical manifestation of dysplasia.

Keywords: hip joint, joint capsule, connective tissue dysplasia, antigen.

Вступ

Остеоартроз посідає одне із провідних місць у структурі суглобової патології. Розвиток патологічних процесів у суглобовому хрящі поєднаний з порушенням структури капсули суглобу. При дослідженні суглобового хряща колінного суглоба щурів експериментально встановлено, що антенатальна дія антигенів є фактором ризику розвитку остеоартрозу [3]. Разом із цим, деякі вчені вважають, що саме дезорганізація капсули суглоба як органа відіграє провідну роль у пошкодженні суглобового хряща [11]. Будова капсули суглоба протягом тривалого часу була й залишається об'єктом дискусій. Зміни в капсулі суглоба після антенатальної дії антигенів вивчені недостатньо.

Мета дослідження. Встановити особливості формування капсули суглоба після антенатальної дії антигену.

Introduction

Osteoarthritis plays one of the leading roles in the structure of joint pathology. The development of pathological processes in the articular cartilage is accompanied by the disorders of joint capsule structure. In the study of articular cartilage of rat knee joint it was experimentally revealed that the antenatal antigen action is a risk factor for the development of osteoarthritis [3]. However, some scientists believe that joint capsule disorders promote the damage of articular cartilage [11]. Joint capsule structure has been a contentious issue of late and is likely to continue. Changes in the joint capsule under the antenatal antigen influence are pending a thorough investigation.

The aim of the study is to determine the peculiarities of joint capsule formation under the antenatal antigen influence.

Матеріал і методи дослідження

Об'єктом дослідження стали 168 кульшових суглобів білих лабораторних щурів. Досліджували три експериментальні групи тварин: I – інтактні щури; II – антигенпреміювані щури, яким вводили 0,05 мл імуноглобуліну людського нормального; III – контрольні щури, яким вводили 0,05 мл фізіологічного розчину. Введення антигенів та фізіологічного розчину проводили плодам на 18-ту добу внутрішньоутробного життя за методом Волошина М.А. [1]. Щурів виводили з експерименту під ефірним наркозом шляхом декапітації від 13.00 до 14.00 години на 1-шу, 7-му, 14-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту та 90-ту добу постнатального життя. У роботі з експериментальними тваринами керувалися «Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 18.03.1986). У щурів вимірювали куприково-тім'яну відстань, довжину стегна, гомілки та ступні (в міліметрах). Обчислювали відношення стегна, гомілки та ступні до куприково-тім'яної відстані. Фрагменти кульшових суглобів фіксували в рідині Буена, декальцинували в 20%-му розчині мурашиної кислоти та зневоднювали у висхідній батареї спиртів та хлороформів. Шматочки заливали в суміш парафін-віск-каучук у співвідношенні 20:1:1. Серійні гістологічні зрізи виготовляли завтовшки 3-5 мкм. Для оглядової мікроскопії зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином. Для встановлення відносної площі розподілу колагенових волокон, основної речовини та клітин зрізи забарвлювали за методом Малорі, а з метою виявлення еластичних волокон – за Хартон. Серед колагенових волокон виділяли оформлені (згруповані в пучки) та неформлені (незгруповані, поодинокі або орієнтовані хаотично, під кутом одне до одного). Увесь комплекс глікозаміногліканів (ГАГ) виявляли розчином альціанового синього при рН 2,6 із критичною концентрацією $MgCl_2$ 0,2 М. Диференціювання нессульфатованих і сульфатованих ГАГ проводили після обробки зрізів тестикюлярною гіалуронідазою. Виявлення PNA+ лімфоцитів проводили із застосуванням лектинів арахісу (PNA); вуглеводних залишків α -D-манози (Man) – горошку посівного (VSA); використовуючи стандартні набори лектинів науково-виробничого об'єднання «Лектінтест» (Львів). Контрольні зрізи інкубували в 1% розчині H_2SO_4 протягом 30-ти хвилин. Візуалізацію ділянок зв'язування лектинів про-

Materials and methods of research

Hip joints of white laboratory rats were chosen as materials of the present study. Three groups of animals were singled out: the first one made of the intact animals, the second – of the antigen-impacted animals (injected with 0.05 ml of normal human immunoglobulin), the third – of control rats (injected with 0.05 ml of physiological saline). Injections of antigens and physiological solution were performed on the foeti of the 18th day of antenatal life, under the aether anaesthesia and aseptic. After laparotomy of the female rats and direct intervention of the foeti, a trans-uterine injection of antigen in a dose of 0.05 ml was performed subcutaneously into the inter scapular region (the method of Voloshyn M.A. (1981)). The above procedure being accomplished, the operative wound was sewn. Rats were born on the 22-23 day after their conception. Animals were put to death at the end of the experiment by means of decapitation under aether anaesthesia, from 13.00 to 14.00 on the 1st, 7th, 14th, 30th, 45th, 60th and 90th days of their postnatal life (168 rats in total). Use of experimental animals was guided by the «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes» (Strasbourg, 18.III.1986). Parieto-coccygeal distance, length of thigh, leg and foot were measured in millimetres. The ratio of thigh, leg and foot toparieto-coccygeal distance was also calculated. Hip joint fragments were fixed in the Buen liquid, decalcinated in a 20%-formic acid solution and dehydrated in an ascending battery of alcohols and chloroforms. Pieces were immersed in a mixture of paraffin-wax-rubber (20:1:1 ratio). Serial histological sections were produced 3-5 micron thick.

For the overview microscopy haematoxylin and eosin stain were used. To detect and calculate the relative area of total cell population, collagen fiber distribution, amorphous substances and microcirculatory vessels the sections were stained according to Mallory's method, and Hart's staining was used for elastic fibres identification and counting. The total complex of glycosaminoglycans was revealed by alcianblau staining at pH 2.6 with a critical concentration of $MgCl_2$ 0.2M. Differentiation of non-sulfated glycosaminoglycans and sulfated glycosaminoglycans was performed after processing histological sections by mean softesticularhy aluronidase. Identification of PNA+ lymphocytes was accomplished by means of peanut agglutinin (PNA) while α -D-mannose

водили в системі діамінобензидин-перекис водню. Вміст полісахаридів та інтенсивність відкладення бензидинової мітки оцінювали напівкількісно (від «+» до «++++»). Товщину капсули суглоба вимірювали в області labrum acetabulare та шийково-діафізарній зоні при імерсійному збільшенні мікроскопа (в мікрометрах) за допомогою окуляр-мікрометра MP-12. Обчислення відсотка компонентів сполучної тканини капсули суглоба проводили за допомогою методу кількісного візуального обліку морфологічних структур Стефанова С.Б. Підрахунок клітин (юні, зрілі фібробласти, фіброцити, макрофаги та лімфоцити) проводили при імерсійному збільшенні мікроскопа за допомогою модифікованої окулярної сітки Глаголева на умовній одиниці площі з перерахуванням отриманих даних на 10000 мкм². Мікрофотографування виконано на відеосистемі «Axiolab» (Carl Zeiss, Німеччина) на об'єктиві ×10, ×40 та ×100. Обробку отриманих числових результатів проводили за допомогою статистичних методів з використанням комп'ютерної програми STATISTICA® for Windows 6.1 (Stat Soft Inc., №AXXR712D833214FAN5). Порівнювані результати вважали достовірними при $p < 0,05$.

У капсулі суглоба виділяли вісцеральну, парієтальну та перехідну частини. Парієтальна частина капсули суглоба представлена синовіальним та фіброзним шаром. У синовіальному шарі виділяли вистеляючі клітини, базальну пластинку та міжклітинну речовину. Синовіальний шар, покриваючи фіброзний шар, з парієтальної частини капсули надалі незмінно продовжувався на суглобові хрящі в якості вісцеральної частини капсули суглоба. Фіброзний шар межує з оточуючими тканинами та влітається в суглобовий хрящ та кістки, відповідно (терміни та класифікація капсули суглоба запропоновані нами) [2, 3, 6]. Усі дослідження проводили в парієтальній частині капсули.

Результати дослідження

У роботі встановлено, що вплив антигена в новонароджених щурів призводить до підвищення загальної кількості лімфоцитів ($4,5 \pm 0,07$ та $2,8 \pm 0,07$; $p < 0,05$, відповідно). Пік вмісту загальної кількості лімфоцитів у капсулі у антигенпреміюваних спостерігається на 7-му ($7,7 \pm 0,1$ та $4,8 \pm 0,09$; $p < 0,05$, відповідно) та 14-ту добу ($7,5 \pm 0,05$ та $4,97 \pm 0,09$; $p < 0,05$, відповідно). До 90-ої доби в капсулі суглоба кількість лімфоцитів у антигенпреміюваних тварин зменшується, але залишається достовірно більшою від

(Man) residues – by viciasativa agglutinin (VSA), using standard lectin specimens with a horseradish peroxidase (HRP) produced by the «Lectintest» Scientific and Production Enterprise (Lviv, Ukraine). Control histological sections were incubated in a 1% solution of HSO₄ for 30 minutes. Visualization of lectin binding sites was carried out in the diaminobenzidin-hydrogen-peroxide system. The joint capsule thickness was measured by microscopic immersion magnification (in micrometers) with a MP-12 eyepiece micrometer. Rate of polysaccharide distribution and benzidine label deposits was evaluated semiquantitatively (from + to ++++). Calculation of cells, blood vessels, fibers and amorphous substances' percentage was carried out by the method of quantitative visual rating of morphological structures by Stefanov S.B. Cell count (young fibroblasts, mature fibroblasts, fibrocytes, macrophages, and lymphocytes) was performed by microscopic immersion magnification with Glagolev's modified ocular lattice on a conventional areal unit with the conversion of the obtained data to 10000 mkm². The microphotography was accomplished using «Axiolab» video system (Carl Zeiss, Germany) by means of x10, x40 and x100 lens magnification. Processing of the obtained numerical results was performed by statistical methods and STATISTICA® for Windows 6.1 software (Stat Soft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Compared results was considered statistically reliable at $p < 0.05$.

In the hip joint capsule we have distinguished the visceral part (pars visceralis, capsulae, articularis), parietal part (pars parietalis, capsulae, articularis) and pars intermediocapsulae, articularis (terms proposed by us) [2, 3, 6]. Pars parietalis capsulae articularis separates the joint cavity from the surrounding tissues. It includes the synovial and fibrous layers (stratum synoviale et stratum fibrosum). Stratum synoviale has three components: synovial lining cells, basal lamina and intercellular substance. Stratum synoviale covering all intra-articular structures of hip joint, among them – articular cartilages of caput femoris, labrum acetabulare, fossa acetabuli et ligamentum capitis femoris, continues as the visceral part (pars visceralis, capsulae, articularis) of joint capsule. Thus, the joint cavity of new-borns is lined with an uniform and indivisible synovial layer. Fibrous layer penetrates into the articular cartilage and bone, respectively. All investigations were carried out on the pars parietalis, capsulae, articularis.

контрольних ($6,1 \pm 0,07$ та $5,1 \pm 0,07$; $p < 0,05$, відповідно). Збільшення загальної кількості лімфоцитів у антигенпреміюваних тварин відбувається, головним чином, за рахунок збільшення популяції PNA+ лімфоцитів з максимумом на 7-му добу ($6,3 \pm 0,08$ та $2,9 \pm 0,05$; $p < 0,05$, відповідно). Із 14-ої доби кількість PNA+ лімфоцитів у антигенпреміюваних тварин починає зменшуватись, проте залишається більшою від контрольних ($5,9 \pm 0,06$ та $2,77 \pm 0,04$; $p < 0,05$, відповідно). Підвищений вміст PNA+ лімфоцитів у тварин, що зазнали дії антигенів, спостерігається до 90-ої доби включно ($3,1 \pm 0,07$ та $2,6 \pm 0,07$; $p < 0,05$, відповідно). На тлі підвищеної частки лімфоцитів кількість макрофагів у новонароджених антигенпреміюваних порівняно з контрольними збільшується ($7,4 \pm 0,47$ та $5,1 \pm 0,97$; $p < 0,05$, відповідно). До 7-ої доби включно кількість макрофагів у антигенпреміюваних залишається достовірно більшою від контрольних ($9,2 \pm 0,85$ та $6,3 \pm 0,47$; $p < 0,05$, відповідно).

На тлі статистично достовірного збільшення кількості лімфоцитів у антигенпреміюваних новонароджених тварин (табл. 1, рис.1) спостерігається збільшення відносного вмісту клітин ($39,1 \pm 0,6\%$ та $26,5 \pm 1,9\%$; $p < 0,05$) порівняно із тваринами інтактною та контрольною груп, що зберігається протягом усього періоду спостереження та має місце навіть на 90-ту добу ($9,0 \pm 0,5\%$ та $6,8 \pm 0,47\%$; $p < 0,05$). Відсоток основної речовини на 1-шу добу в антигенпреміюваних щурів також підвищений ($32,8 \pm 0,4\%$ та $28,8 \pm 0,42\%$; $p < 0,05$) й залишається більшим до 14-ої доби включно ($18,1 \pm 0,23\%$ та $13,0 \pm 0,31\%$; $p < 0,05$). У новонароджених тварин, що зазнали дії антигена, звертає на себе увагу значне, майже в 2,5 рази, збільшення відносної площі розподілу еластичних волокон ($4,2 \pm 0,1\%$ та $1,7 \pm 0,07\%$; $p < 0,05$), що зберігається до 45-ої доби включно ($44,0 \pm 0,98\%$ та $34,8 \pm 3,2\%$; $p < 0,05$) та починає знижуватись від 60-ої доби ($25,7 \pm 0,67\%$ та $47,5 \pm 2,78\%$; $p < 0,05$) і є достовірно меншим навіть на 90-ту добу ($30,6 \pm 0,74\%$ та $37,7 \pm 2,0\%$; $p < 0,05$). На цьому тлі у антигенпреміюваних тварин на 1-шу добу спостерігається суттєве, майже в 2 рази, зменшення відносної площі розподілу колагенових волокон ($23,0 \pm 1,1\%$ та $41,7 \pm 3,68\%$; $p < 0,05$), що має місце до 60-ої доби включно ($68,2 \pm 3,03\%$ та $73,6 \pm 2,4\%$; $p < 0,05$). Зменшення відсотка колагенових волокон відбувається, головним чином, за рахунок оформлених колагенових волокон як на 1-шу ($5,6 \pm 0,61\%$ та $10,5 \pm 1,61\%$; $p < 0,05$), так і

Results of the study

Antigenic influence leads to an increase of the total lymphocyte count in new-born rats (4.5 ± 0.07 and 2.8 ± 0.07 ($p < 0.05$), respectively). Peak of total lymphocyte count in rats affected by antigens in parsparietalis was observed on the 7th (7.7 ± 0.1 and 4.8 ± 0.09 ($p < 0.05$), respectively) and on the 14th day (7.5 ± 0.05 and 4.97 ± 0.09 ($p < 0.05$), respectively). Up to 90th day in parsparietalis of the rats affected by antigens there was a continuing decrease of lymphocyte count though it remained considerably higher than that of the intact and control rats (6.1 ± 0.07 and 5.1 ± 0.07 ($p < 0.05$), respectively). The increase in the total lymphocyte count in the antigen-affected animals is mainly due to the increase of PNA+ lymphocyte count reaching maximum on 7th day (6.3 ± 0.08 and 2.9 ± 0.05 ($p < 0.05$), respectively). Since 14th day, the PNA+ lymphocyte count in the rats affected by antigens begins to decrease, however, remains higher in comparison with the intact and control animals (5.9 ± 0.06 and 2.77 ± 0.04 ($p < 0.05$), respectively). The increased number of PNA+ lymphocytes in the rats affected by antigens (in comparison with the intact and control animals) remains higher up to 90th day of their postnatal life (3.1 ± 0.07 and 2.6 ± 0.07 ($p < 0.05$), respectively). On the background of increased lymphocyte count, the macrophage count in the new-born rats affected by antigens (in comparison with the intact and control animals) increases up to 7.4 ± 0.47 and 5.1 ± 0.97 ($p < 0.05$), respectively, and remains higher up to 7th day (9.2 ± 0.85 and 6.3 ± 0.47 ($p < 0.05$), respectively).

Along with the statistically reliable increase of lymphocyte count in the new-born animals affected by antigen, (tabl. 1 and pict.1) an increase in the relative content of cells ($39.1 \pm 0.6\%$ and $26.5 \pm 1.9\%$ ($p < 0.05$)) was also established in comparison with the intact and control animals, observed throughout the entire period of monitoring and occurring even on 90th day ($9.0 \pm 0.5\%$ and $6.8 \pm 0.47\%$ ($p < 0.05$)). The relative area of amorphous substance on the 1st day in the rats affected by antigen was also increased ($32.8 \pm 0.4\%$ and $28.8 \pm 0.42\%$ ($p < 0.05$)) and remained much higher through 14th day ($18.1 \pm 0.23\%$ and $13.0 \pm 0.31\%$ ($p < 0.05$)). It is worthy of note that in the new-born antigen-impacted rats almost two and a half time increase in the relative area of elastic fiber distribution ($4.2 \pm 0.1\%$ and $1.7 \pm 0.07\%$ ($p < 0.05$)) was observed, and it remained unchanged up to 45th day inclusively ($44.0 \pm 0.98\%$ and $34.8 \pm 3.27\%$ ($p < 0.05$)), started to decrease from 60th day ($25.7 \pm 0.67\%$ and $47.5 \pm 2.78\%$ ($p < 0.05$))

на 60-ту добу (39,2±0,48% та 43,5±1,3%; p<0,05). Проте, відносна щільність неоформлених колагенових волокон у антигенпреміюваних тварин є меншою від показників контрольних тварин тільки на 1-шу добу (11,8±0,49% та 28,3±2,07%; p<0,05), а від 7-ої доби починає значно збільшуватися (27,5±0,62% та 24,5±0,61%; p<0,05) й залишається істотно вищою до 45-ої доби включно (35,5±0,61% та 27,7±3,14%; p<0,05).

У новонароджених антигенпреміюваних щурів на тлі статистично достовірного збільшення кількості лімфоцитів та частки загального клітинного компонента спостерігається значне зниження кількості юних фібробластів, (17,1±0,94 та 37,7±1,99; p<0,05, відповідно), збільшення вмісту зрілих фібробластів (114,7±1,1 та 92,3±2,67; p<0,05, відповідно) та підвищення частки фібро-

and remained significantly lower even on the 90th day (30.6±0.74% and 37.7±2.0% (p<0.05)). On this background in the antigen-impacted newborn animals we observed a significant, almost twice a decrease of relative area of collagen fiber distribution (23.0±1.1% and 41.7±3.68% (p<0.05)) which took place up to 60th day (68.2±3.03% and 73.6±2.4% (p<0.05)). The reduction in the percentage of collagen fibers occurred mainly due to the number of developed collagen fibers both on the 1st day (5.6±0.61% and 10.5±1.61% (p<0.05)) and remained the same up to the 60th day (39.2±0.48% and 43.5±1.38% (p<0.05)). However, the relative density of underdeveloped collagen fiber distribution in the animals affected by antigen was lower than in the control animals only on the 1st day (11.8±0.49% and 28.3±2.07% (p<0.05)), and since 7th day began

Таблиця 1. Динаміка розподілу клітин, основної речовини та волокон у капсулі кульшового суглоба
Table 1. The dynamics of cell, amorphous substance and fiber distribution in the hip joint capsule

Доба, групи	Структури капсули кульшового суглоба						
	Клітини, %	Основна речовина, %	Колагенові волокна, %			Еластичні волокна, %	
			Сумарна кількість, %	Оформлені, %	Неоформлені, %		
Day, groups	Hip joint capsule components						
	cells, %	amorphous substance, %	Collagen fibers, %			elastic fibers, %	
			total number, %	arranged, %	disarranged, %		
1	I	26,3±2,6	29,6±0,7	41,7±3,68	10,5±1,61	28,3±2,07	1,7±0,07
	II	39,1±0,6*	32,8±0,4*	23,0±1,1*	5,6±0,61*	11,8±0,49*	4,2±0,1*
	III	26,5±1,9	28,8±0,42	41,8±3,49	10,8±1,2	29,3±2,32	1,8±0,067
7	I	26,6±0,15	11,4±0,36	57,0±2,82	32,5±2,2	24,5±0,61	5,0±0,57
	II	30,3±0,48*	16,8±0,24*	48,7±3,68*	21,2±3,1*	27,5±0,62*	11,5±0,22*
	III	26,5±1,9	12,7±0,3	56,3±2,83	33,0±2,1	23,3±0,73	5,1±0,4
14	I	22,5±1,87	12,8±0,46	58,8±3,45	40,3±1,78	18,5±0,67	15,6±1,93
	II	26,8±0,37*	18,1±0,23*	48,1±1,5*	23,6±0,6*	25,5±0,98*	24,4±0,24*
	III	22,7±1,4	13,0±0,31	58,2±2,89	40,1±1,5	18,1±0,39	15,7±2,03
30	I	16,8±0,88	11,9±0,74	63,9±3,04	41,6±1,96	22,3±1,08	33,1±1,68
	II	24,6±0,61*	12,7±1,75*	54,9±4,48*	31,3±2,88*	23,7±1,6*	43,1±0,42*
	III	16,7±1,08	11,8±2,12	63,8±3,16	41,8±1,92	22,1±1,24	35,1±3,6
45	I	14,7±2,16	11,4±1,59	68,9±4,74	41,2±1,6	27,7±3,14	33,2±3,31
	II	20,8±1,47*	12,2±1,5*	60,8±1,52*	25,3±0,91*	35,5±0,61*	44,0±0,98*
	III	14,8±2,0	11,7±1,91	68,8±5,02	41,3±1,6	27,5±3,42	34,8±3,27
60	I	10,2±0,72	10,9±1,39	73,6±2,4	43,5±1,38	30,1±1,02	45,6±4,22
	II	16,8±0,72	10,5±1,67	68,2±3,03	39,2±0,48	29,0±2,55	25,7±0,67
	III	10,8±0,88	10,8±1,33	73,7±2,06	42,3±1,03	31,3±1,03	47,5±2,87
90	I	6,8±0,47	9,3±0,52	80,2±3,38	40,5±1,38	39,7±2,0	35,5±2,13
	II	9,0±0,5	9,6±0,97	78,0±2,48	40,1±1,2	38,9±1,28	30,6±0,74
	III	6,2±0,17	9,2±1,17	80,1±3,16	40,4±1,5	39,7±1,66	37,7±2,0

Примітки: I – інтактна група; II – імуноглобулінпреміювані щури; III – контрольна група; * – результати, достовірні порівняно між інтактними (контрольними) та антигенпреміюваними щурами при p<0,05.

Notes: I – an intact group; II – immunoglobulin-injected rats; III – control group; * – the results are statistically reliable in the antigen-affected rats in comparison with the intact and control rats at p<0.05.

цитів ($14,4 \pm 0,97$ та $8,5 \pm 1,36$; $p < 0,05$, відповідно). Зміни в популяції клітин фібробластичного ряду спостерігаються протягом всього експерименту й залишаються навіть на 90-ту добу у вигляді зниження кількості юних фібробластів ($8,0 \pm 1,43$ та $12,04 \pm 1,64$; $p < 0,05$, відповідно), збільшення вмісту зрілих фібробластів ($70,4 \pm 3,53$ та $51,1 \pm 2,22$; $p < 0,05$, відповідно) та зниження кількості фіброцитів ($19,1 \pm 2,1$ та $32,9 \pm 1,7$; $p < 0,05$, відповідно). Від 1-ої до 14-ої доби постнатального життя в капсулі суглоба тварин, що зазнали дію антигена, встановлено збільшення частки гіалуронової кислоти та зменшення вмісту сульфатованих глікозаміногліканів і залишків α -D-манози.

У антигенпремійованих тварин на тлі змін розподілу клітин, волокон та основної речовини встановлено порушення динаміки товщини капсули суглоба, зокрема її істотне потоншення на 14-ту добу як у шийково-діафізарній зоні ($92,5 \pm 2,43$ та $106,2 \pm 3,27$; $p < 0,05$), так і в області labrum acetabulare ($53,0 \pm 2,37$ та $64,2 \pm 2,23$; $p < 0,05$). Одночасно в цій групі тварин виявлено порушення темпів приросту відділів тазової кінцівки, що особливо проявляється щодо ступні, а саме збільшення її абсолютної довжини на 1-шу добу ($10,2 \pm 0,3$ та $8,1 \pm 0,2$ ($p < 0,05$), відповідно) та на 45-ту ($33,6 \pm 2,1$ та $27,8 \pm 1,8$; $p < 0,05$) відповідно, а також збільшення співвідношення ступня – куприково-тім'яна відстань на 1-шу добу ($0,243$ та $0,235$), 14-ту ($0,4$ та $0,356$), 30-ту ($0,396$ та $0,361$), 45-ту ($0,42$ та $0,355$) та 90-ту доби ($0,333$ та $0,318$).

to increase ($27.5 \pm 0.62\%$ and $24.5 \pm 0.61\%$ ($p < 0.05$)) and remained much higher until 45th day inclusively ($35.5 \pm 0.61\%$ and $27.7 \pm 3.14\%$ ($p < 0.05$)).

In the new born antigen-affected rats, on the background of statistically reliable increase of lymphocyte quantity and percentage of the total cellular component there was a significant reduction of young fibroblast number, (17.1 ± 0.94 and 37.7 ± 1.99 ($p < 0.05$), respectively), increased content of mature fibroblast (114.7 ± 1.1 and 92.3 ± 2.67 ($p < 0.05$), respectively) and increase of fibrocyte number (14.4 ± 0.97 and 8.5 ± 1.36 ($p < 0.05$), respectively). Changes in the fibroblastic cell population were observed during the whole experiment, even on the 90th day, same as reduction of the young fibroblast number (8.0 ± 1.43 and 12.04 ± 1.64 ($p < 0.05$), respectively), increased content of mature fibroblasts (70.4 ± 3.53 and 51.1 ± 2.22 ($p < 0.05$), respectively) and decrease of fibrocyte number (19.1 ± 2.1 and 32.9 ± 1.7 ($p < 0.05$), respectively). From the 1st to 14th day of postnatal life, the joint capsule of antigen-affected animals revealed increase of hyaluronic acid and reduction of sulphated glycosaminoglycans as well as of α -D-manoseresidues.

In the antigen-affected animals, besides the above-mentioned changes, we've established disorders of joint capsule thickness, in particular – its significant thinning on the 14th day in the area between collum femoris and diaphysis (92.5 ± 2.43 and 106.2 ± 3.27 ($p < 0.05$)), and at labrum acetabulare (53.0 ± 2.37 and 64.2 ± 2.23 ($p < 0.05$)). At the same time, in this group of animals the rate of pelvic limb growth, especially the feet, was proved to be compromised, showed signs of absolute length increase

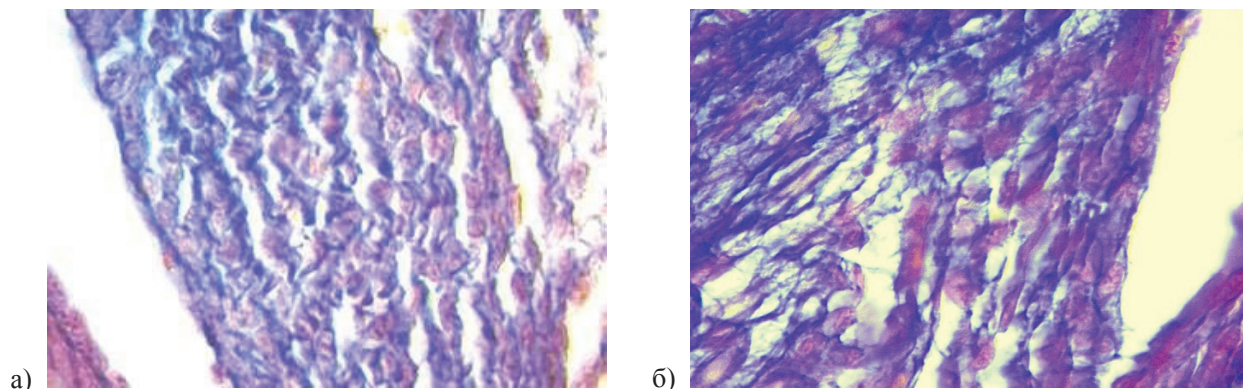


Рис. 1. Фрагмент капсули кульшового суглоба: а) інтактної тварини, б) антигенпремійованої тварини, 1-ша доба життя. Забарвлення за Малорі, ок. $\times 10$, об. $\times 100$.

Pict. Fragment of hip joint capsule: a) the intact animal, b) the animal, affected by antigen, 1st day of postnatal life. Mallory's stain, Oc. $\times 10$, Ob. $\times 100$.

Обговорення отриманих результатів

Таким чином, капсула суглоба – це складна структура, що забезпечує нормальне функціонування суглоба як органу. Встановлено, що антенатальна дія антигена може спричинити порушення розподілу клітин (зокрема фібробластичного ряду), основної речовини, волокон, полісахаридів. Одночасно експериментально отримано доліхостеномелію (подовження відділів кінцівок). Отримані дані співвідносяться з поняттям «дисплазія сполучної тканини» [4]. Антиген, що був введений плодам, є неспецифічним подразником для сполучної тканини. Його введення призводить до збільшення загальної кількості лімфоцитів, зокрема PNA+ лімфоцитів, які мігрують з тимуса на периферію [1]. Популяція PNA+ лімфоцитів – це як імунологічно незрілі CD8+/CD4+ лімфоцити, так і γ/δ -T-лімфоцити. Останні, після стимуляції антигеном T-клітинного рецептора, здатні продукувати інтерлейкін-17, γ -інтерферон та TNF- α , які впливають на клітини, зокрема на фібробласти [10, 12, 14, 16]. Фібробласти та секреторні синовіоцити – головний тип клітин капсули суглоба, що виділяють гіалуронову кислоту, завдяки ферменту гіалуронат-синтазі, який значно активується при стимуляції інтерферонами та TNF- α . Відомо, що гіалуронова кислота стимулює проліферацію та міграцію клітин, а також є потужним активатором біосинтезу еластичних волокон. Разом із цим, γ -інтерферон, активізуючи синтез еластичних волокон, одночасно гальмує продукцію колагену фібробластами. З іншого боку – макрофаги в підвищеній кількості також можуть гальмувати синтез колагену фібробластами шляхом виділення α - і β -інтерферонів. Останні сприяють секреції простагландину E2, який є з одного боку специфічним інгібітором біосинтезу колагену, а з іншого – стимулює синтез гіалуронової кислоти. Окрім того, макрофаги здатні до секреції протеаз, які сприяють деградації колагену. Гальмування формування колагенових волокон можна пояснити також дефіцитом вмісту манозокон'югатів та сульфатованих глікозаміногліканів [7, 8, 13, 15].

Збільшений відсоток еластичних волокон, неформлених колагенових волокон, основної речовини та потоншення капсули суглоба є морфологічною картиною синдрому гіпермобільності суглобів (СГС). Зменшення частки оформлених колагенових волокон (які забезпечують міцність сполучної тканини) та сульфатованих глікозаміногліканів дає можливість зрозуміти швидко

on the 1st day (10.2 ± 0.3 and 8.1 ± 0.2 ($p < 0.05$), respectively) and 45th day (33.6 ± 2.1 and 27.8 ± 1.8 ($p < 0.05$), respectively), and an increase in the ratio of foot – parieto-coccygeal distance on the 1st day (0.243 and 0.235), 14th day (0.4 and 0.356), 30th day (0.396 and 0.361), 45th day (0.42 and 0.355) and 90th day (0.333 and 0.318).

Discussion of the results

The joint capsule was proved to be a complex structure in charge of normal joint functioning. It was established that the antenatal antigen influence might cause disorders of cell (in particular, fibroblasts), amorphous substance, fibers, and polysaccharides' distribution.

At the same time, we have experimentally obtained dolicho stenomelia (extension of parts of the limbs), which corresponds to the term «connective tissue dysplasia» [4]. The antigen is a nonspecific irritant for connective tissue. Its injection leads to the increase of total lymphocyte (in particular PNA+) count, and their migration from the thymus to the periphery [1]. Population of PNA+ lymphocytes is made up of the immunologically immature CD8+/CD4+ cells and γ/δ -T cells. The latter, on antigen's stimulation of T-cell receptor, are able to produce interleukin-17, γ -interferon and TNF- α which affect the cells, fibroblasts in particular [10, 12, 14, 16]. Fibroblasts and fibroblast-like synoviocytes are the principal cells of the joint capsule secreting hyaluronic acid due to the hyaluronate synthase enzyme, which is significantly activated by interferon and TNF- α stimulation. Hyaluronic acid is known to stimulate the proliferation and migration of cells as well as elastic fiber synthesis. Further, γ -interferon activating the elastic fiber synthesis, at the same time, inhibits the production of collagen by fibroblasts. Increased rate of macrophages may also inhibit the collagen synthesis by fibroblasts through α - and β -interferon production. The latter promote prostaglandin E2 secretion, which, on the one hand, is a specific inhibitor of the collagen biosynthesis and on the other, – stimulates the hyaluronic acid synthesis. In addition, macrophages are capable of protease secretion contributing to the collagen degradation. Inhibition of the collagen fiber formation can also be attributed to the deficiency of mannose conjugates and sulfated glycosaminoglycan content [7, 8, 13, 15].

Increased percentage of elastic fibers, underdeveloped collagen fibers, amorphous substance and thinning of the joint capsule constitute the morphological pattern of the joint hypermobility syndrome (JHS). The decrease of developed collagen fiber percentage (providing the strength of connective tissue)

стомлюваність, фізичну слабкість, періодичні немотивовані артралгії, деформації скелета при СГС. Вищезазначені порушення, зокрема, передчасне зниження щільності розподілу еластичних волокон після антигенного навантаження (див. табл. 1), пояснюють як вищу частоту, так і передчасний розвиток остеоартрозу в дітей із СГС, останній може розвиватися в дітей, що зазнали антенатального антигенного навантаження [5]. До того ж, у етіології гонартрозу провідне місце посідає саме диспластичний компонент [9]. Тому, антенатальне введення антигенів може застосовуватися з метою моделювання як доліхостеномелії, так і дисплазії компонентів кульшового суглоба з метою їх подальшого вивчення.

Висновок

Таким чином, антенатальна дія антигенів може призвести до розвитку диспластичних змін у капсулі кульшового суглоба, що проявляється у вигляді порушення розподілу полісахаридів, фіброblastів, збільшення відсотка клітин, основної речовини, зменшення частки колагенових волокон, гіпереластичності сполучної тканини та до більш раннього зменшення частки еластичних волокон, що може бути провідним рушійним фактором розвитку коксартрозу.

Література

1. Волошин Н.А., Григор'єва Е.А., Щербаків М.С. Внутривушечна антигенна стимуляція як модель для изучения симптомокомплекса висцеромегалії // Таврический медико-биологич. вестник. – 2006. – 9, №4. – С. 57-59.
2. Волошин М.А., Григор'єва О.А. Сучасний погляд на будову та класифікацію структур суглоба // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – 1, №2. – С. 56-59.
3. Григор'єва О.А. Закономірності морфогенезу та реактивності колінного суглоба після антигенного та гормонального впливу (анатомо-експериментальне дослідження): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. мед. наук: спец. 14.03.01 «нормальна анатомія». – Київ, 2011. – 31 с.
4. Нечаева Г.И., Викторова И.В., Друк И.М. Дисплазия соединительной ткани: распространенность, фенотипические признаки, ассоциации с другими заболеваниями // Врач. – 2006. – №1. – С. 19-23.
5. Поворозник В.В., Подлианова О.И. К вопросу о синдроме гипермобильности суставов // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2012. – 5, №1. – С. 28-32.
6. Феодотченко А.В. Закономірності будови кульшового суглоба в постнатальному періоді в нормі та після внутрішньооплідного введення антигенів: (анатомо-експериментальне дослідження): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня кан. мед. наук: спец. 14.03.01 «нормальна анатомія». – Запоріжжя, 2012. – 21 с.
7. Юрина Н.А., Радостина А.И. Морфо-функциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани / М.: Изд-во УДН, 1990. – 322 с.

and sulfated glycosaminoglycans explains the fatigue, physical weakness, periodic unmotivated arthralgia, skeletal deformities accompanying JHS. The aforesaid disorders, in particular – the premature decrease of elastic fiber distribution density in the antigen-impacted rats (table 1), explain both frequent occurrence and premature development of osteoarthritis in children with JHS, as the latter may occur in the children been subjected to the antenatal antigen influence [5]. Moreover, the dysplastic component plays a leading role in the gonarthrosis' etiology [9]. Therefore, the intra-foetal antigen injection may be used for modeling both dolichostenomelia and hip joint dysplasia for the purpose of their further study.

Conclusion

The antenatal antigen influence may lead to the development of dysplastic changes in the hip joint capsule which manifest themselves as disorders of polysaccharides and fibroblasts' distribution, an increase of cells and amorphous substance relative number, a decrease of collagen fiber percentage, hyper elasticity of connective tissue and premature decrease of elastic fiber relative count, bringing in their wake coxarthrosis.

8. Evanko S.P., Tammi M.I. Hyaluronan-dependent pericellular matrix // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – 59 (13). – P. 1351-1365.
9. Ganz R., Leunig M., Leunig-Ganz K., Harris W. The etiology of osteoarthritis of the hip // *Clin Orthop. Relat. Res.* – 2008. – 466 (2). – P. 264-272.
10. Klatt N. Mechanisms underlying γ/δ T-cell subset perturbations in SIV-infected Asian rhesus macaques // *Blood*. – 2010. – 116 (20). – P. 4148-4157.
11. McGonagle D., Tan A.L., Carey J., Benjamin M. The anatomical basis for a novel classification of osteoarthritis and allied disorders // *J Anat. Mar.* – 2010. – 216 (3). – P. 279-291.
12. Meraviglia S., El Daker S. γ/δ T-cells cross-link innate and adaptive immunity in Mycobacterium tuberculosis Infection (Review Article) // *Clinical and Developmental Immunology*. – 2011. – Article ID 587315. – P. 1-11.
13. Noble P.W., Liang J., Jilang D. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases // *Physiological Reviews*. – 2011. – 91 (1). – P. 221-264.
14. Plattner B.L., Hostetter J.M. Comparative gamma/delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle (review article) // *Veterinary Medicine International*. – 2011. – Article ID 214384. – P. 1-8.
15. Rozario T., De Simone D.W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view // *Developmental Biology*. – 2010. – 341 (1). – P. 126-140.
16. Strauchen J.A. Lectin receptors as markers of lymphoid cells. Demonstration in tissue section by peroxidase technique // *American Journal of Pathology*. – 1984. – 116. – P. 297-304.

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ КАПСУЛЫ СУСТАВА ПОСЛЕ АНТЕНАТАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИГЕНА

Волошин М.А., Федотченко А.В.

Запорожский государственный медицинский университет МОЗ Украины, Запорожье

Резюме. В работе путем применения морфометрического, гистологического, гистохимического и статистического методов исследована динамика становления капсулы тазобедренного сустава белых лабораторных крыс в течение постнатального периода после внутриплодного введения антигена. Установлено, что антенатальное действие антигена приводит к увеличению количества лимфоцитов, в частности PNA⁺ лимфоцитов в капсуле сустава. На этом фоне наблюдаются увеличение доли клеток, основного вещества и эластических волокон при одновременном уменьшении содержания коллагеновых волокон, нарушение распределения полисахаридов и фибробластов, что указывает на развитие диспластических процессов в тазобедренном суставе и может рассматриваться как ведущий фактор развития коксартроза. Экспериментально получено долихостеномелию как визуальное клиническое проявление дисплазии.

Ключевые слова: тазобедренный сустав, капсула сустава, дисплазия соединительной ткани, антиген.