© Волошин М. А., Абросімов Ю. Ю.

УДК 611.728.3.018:[612.65+[612.63:616-097.1]].08:599.323.45

Волошин М. А., Абросімов Ю. Ю.

ДИНАМІКА СПІВВІДНОШЕННЯ КЛІТИН ТА ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ МЕНІСКІВ КОЛІННОГО СУГЛОБА ЩУРІВ У ПОСТНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ В НОРМІ ТА ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО ВВЕДЕННЯ АНТИГЕНУ

Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)

abrosimov1387@mail.ru

Робота є фрагментом НДР кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету «Реактивність органів новонароджених після дії антигенів та факторів різної природи у внутрішньоутробному періоді» (2013-2018, № державної реєстрації 0115U003875).

Вступ. Наукові дослідження протягом останніх десятиріч встановили анатомічну, біомеханічну та функціональну важливість меніска для колінного суглоба [7]. Закриті пошкодження колінного суглоба в дитячому віці зустрічаються досить часто. Вони складають від 5 до 13% від усіх підлітків, які потребують екстреної госпіталізації. Пошкодження менісків колінного суглоба в дитячо-підлітковому віці є досить поширеною патологією (особливо у дітей, які професійно займаються ігровими видами спорту) [4].

Морфологічним субстратом для розвитку захворювань суглобів часто є диспластичні зміни, зокрема наявність синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини (НДСТ) [4]. Реактивні зміни у структурі меніска колінного суглобу при НДСТ є не вивченими. Дослідження співробітників кафедри анатомії людини Запорізького державного медичного університету довели, що внутрішньоплідна антигенна стимуляція у білих лабораторних щурів здатна моделювати синдром НДСТ [2,3,6].

Мета дослідження. Встановити особливості динаміки співвідношення клітин та екстрацелюлярного матриксу в структурі менісків колінного суглоба щурів в нормі та після внутрішньоутробного введення антигену з 21-ої до 90-ої доби життя.

Об'єкт і методи дослідження. В роботі досліджено 80 білих лабораторних щурів з 21-ої по 90-ту добу постнатального життя. I група – 30 інтактних щурів (INT). II група – 30 експериментальних щурів (SA), яким на 18 добу внутрішньоутробного періоду було введено крізьматочно, крізьоболонково, внутрішньоплідно анатоксин стафілококовий очищений рідкий (10-14 ОЗ у 1 мл, розведений у 10 разів, у кількості 0,05 мл) згідно з експериментальною моделлю для ініціації синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини у щурів (М.А. Волошин, 1981). 20 щурів III групи після введення фізіологічного розчину слугували контролем. Потомство народжувалось на 22-24-ту добу внутрішньоутробного періоду. Забій тварин здійснювали на 21-шу, 30-ту, 45-ту, 60-ту та 90-ту добу після народження. При роботі з тваринами керувалися «Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.86) та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV). Для дослідження забирали лівий колінний суглоб. Шматочки фіксували у 10%-му нейтральному формаліні. Декальцинацію проводили трилоном Б. Зневоднювали у висхідній батареї спиртів. Виготовляли парафінові блоки та робили гістологічні зрізи у фронтальній площині 5-6 мкм завтовшки, які забарвлювали альціановим синім при pH 2,6 з критичною концентрацією електроліту ($MgCl_2$) 0,2 М для виявлення всього комплексу глікозаміногліканів та диференціювання клітин та міжклітинної речовини. Для морфометричного аналізу використовували модифіковану окулярну сітку Глаголєва (зб. х 400). У зрізах досліджували відносну площу, що займають клітини та міжклітинна речовина в медіальному (MM) та латеральному менісках (LM). Площу зрізу меніска умовно поділяли на внутрішню (Int) та зовнішню (Ext) зони, спираючись на фенотип клітин. Клітини зовнішньої зони меніску мають видовжену овальну або веретеноподібну форму та фібробластоподібний фенотип, занурені у волокнисту міжклітинну речовину. Клітини внутрішнього відділу мають фенотип, подібний до хондроцитів, мають округлу форму, оточені матриксом за типом гіалінового хряща. Поряд з цим, відносна площа, що зайнята клітинами, як правило, переважає у внутрішній зоні обох менісків порівняно із зовнішньою.

Отримані дані оброблені статистичними методами. Достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Результати вважали достовірними при $p<0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Числові дані дослідження надані у **таблиці.** Достовірних відмінностей між показниками інтактної та контрольної груп виявлено не було.

На 21-шу добу співвідношення відносної площі внутрішньої зони медіального меніска, що зайнята клітинами та матриксом, достовірно не відрізняється у всіх групах тварин. Разом з тим, в зовнішній зоні медіального меніска відбувається статистично достовірне збільшення відносної площі матриксного

Таблиця.

Динаміка відносної площі (M ± m, %), що зайнята міжклітинною речовиною та клітинами в зовнішній та внутрішній зонах менісків колінного суглоба щурів в нормі та експерименті

Доба життя	Група тварин	Медіальний менісk				Латеральний менісk			
		Внутрішня зона		Зовнішня зона		Внутрішня зона		Зовнішня зона	
		Клітини	Матрикс	Клітини	Матрикс	Клітини	Матрикс	Клітини	Матрикс
21	Int (n=6)	32,11 ± 0,35	67,89 ± 0,35	30,87 ± 0,71	69,13 ± 0,71	40,8 ± 1,19	59,2 ± 1,19	24,11 ± 0,87	75,89 ± 0,87
	SA (n=6)	33,33 ± 0,21	66,67 ± 0,21	12,5 ± 0,56*	87,5 ± 0,56*	36,67 ± 0,49*	63,33 ± 0,49*	16,67 ± 0,56*	83,33 ± 0,56*
	K (N=4)	33,33 ± 0,50	66,67 ± 0,50	31,94 ± 0,82	68,06 ±	41,67 ± 0,95	58,33 ± 0, 95	23,33 ± 0,61	76,67 ± 0,61
30	Int (n=6)	36,66 ± 1,41	63,34 ± 1,41	22,22 ± 0,64	77,78 ± 0,64	39,1 ± 2,38	60,9 ± 2,38	28,1 ± 1,41	71,9 ± 1,41
	SA (n=6)	47,92 ± 1,0*	52,09 ± 1,0*	31,25 ± 1,28*	69,47 ± 1,28*	42,16 ± 2,28	57,84 ± 2,28	28,4 ± 1,35	71,6 ± 1,35
	K (n=4)	40,91 ± 1,73	59,09 ± 1,73	24,07 ± 1,43	75,93 ± 1,43	40,91 ± 1,73	59,09 ± 1,73	27,97 ± 1,40	72,03 ± 1,40
45	Int (n=6)	34,26 ± 1,41	65,74 ± 1,41	25,21 ± 0,55	74,79 ± 0,55	23,86 ± 0,51	76,14 ± 0,93	20,24 ± 1,4	79,76 ± 1,4
	SA (n=6)	39,05 ± 2,49	60,95 ± 2,49	33,33 ± 0,84*	66,67 ± 0,84*	35,83 ± 0,93*	64,17 ± 0,93*	25,0 ± 0,37*	75,0 ± 0,37*
	K (n=4)	37,5 ± 2,09	62,5 ± 2,09	26,43 ± 0,76	73,57 ± 0,76	23,06 ± 0,93	76,04 ± 0,93	20,0 ± 1,09	80,0 ± 1,09
60	Int (n=6)	37,04 ± 2,26	62,96 ± 2,26	22,22 ± 0,64	77,78 ± 0,64	22,18 ± 1,25	77,82 ± 1,25	31,66 ± 1,02	68,34 ± 1,02
	SA (n=6)	45,83 ± 1,01*	54,17 ± 1,01*	21,11 ± 1,33	78,89 ± 1,33	40,02 ± 1,55*	59,98 ± 1,55*	37,88 ± 1,20*	62,12 ± 1,2*
	K (n=4)	36,04 ± 2,38	61,96 ± 2,38	23,23 ± 1,36	76,77 ± 1,36	20,6 ± 1,56	79,4 ± 1,56	32,55 ± 0,95	67,45 ± 0,95
90	Int (n=6)	32,37 ± 0,91	67,63 ± 0,91	22,22 ± 0,64	77,78 ± 0,64	23,0 ± 1,15	77,0 ± 1,15	29,5 ± 1,39	70,5 ± 1,39
	SA (n=6)	35,35 ± 1,11	64,65 ± 1,11	24,7 ± 1,2	75,6 ± 1,2	25,0 ± 1,37	75 ± 1,37	25,92 ± 0,96	74,08 ± 0,96
	K (n=4)	32,35 ± 1,31	67,65 ± 1,31	23,81 ± 1,21	76,19 ± 1,21	22,55 ± 1,20	77,45 ± 1,20	27,27 ± 1,18	72,73 ± 1,18

Примітка: Int – інтактні щури; SA – щури після внутрішньоплідного введення стафілококового анатоксину; K – контрольна група
* – відмінності між показниками статистично достовірні при порівнянні з інтактною та контрольною групами ($p<0,05$).

компоненту в експерименті, порівняно з нормою, та відповідне зменшення площі, що зайнята клітинами (MM_{Ext}: в експерименті клітини займають 12,5±0,56% площі проти 30,87±0,71% в інтактній групі). Аналогічні зміни спостерігаються і в обох зонах латерального меніска (LM_{Int}: 36,67±0,49% та 40,8±1,19%; LM_{Ext}: 16,67±0,56% та 24,11±0,87%, відповідно).

На 30-ту добу навпаки спостерігається зсув співвідношення клітини/матрикс в групі щурів, що зазнали внутрішньоплідного введення антигену, в бік клітин. Ці зміни достовірні для обох зон присереднього меніска (MM_{Int}: 36,66±1,41% в інтактній групі та 47,92±1,0% в експериментальній; MM_{Ext}: 22,22±0,64% та 31,25±1,28%, відповідно). Показники латерального меніска вирівнюються з аналогічними в контрольній групі та статистично не відрізняються.

На 45-ту добу вищезазначена тенденція зберігається, та відмічається збільшення відносної площі, що займають клітини, в антигенпремійованих щурів, статистично достовірне для зовнішньої зони медіального меніска (MM_{Ext}: 25,21±0,55% в нормі та 33,33±0,84% в експерименті), внутрішньої (LM_{Int}: 23,86±0,51% та 35,83±0,93%, відповідно) та зовнішньої зон латерального (LM_{Ext}: 20,24±1,4% та 25,0±0,37%, відповідно). Аналогічні зміни спостерігаються в експериментальній групі на 60-ту добу постнатального життя. Зафіксовано зміщення клітинно-матриксного співвідношення у бік клітинного компоненту. Різниця між середніми показниками відносної площі, що зайнята клітинами, є статистично достовірною при цьому для внутрішньої частини медіального меніска (MM_{Int}: 37,04±2,26% в інтактній групі та 45,83±1,01% в експерименті) та обох зон латерального (LM_{Int}: 22,18±1,25% та 40,02±1,55%; LM_{Ext}: 31,66±1,02% та 37,88±1,20%, відповідно).

Надалі, протягом третього місяця постнатального життя вказана вище тенденція нівелюється, та статистично достовірна різниця між показниками відносної площі зникає.

Зміни в клітинно-матриксному співвідношенні відбуваються через переміни у руховій активності тварин. Її становлення припадає на третій тиждень постнатального життя – повзання замінюється бігом та стрибками. Тобто з 21-ої доби мають місце зміни у характері навантаження на меніски. У щурів інтактної та контрольної груп відбувається поступове збільшення кількості клітин з 21-ої до 60-ої доби життя у внутрішній зоні медіального меніска з відповідним зменшенням відносної площі, що зайнята міжклітинною речовиною. У зовнішній зоні спостерігається зміщення клітинно-матриксного співвідношення в бік міжклітинної речовини. Для латерального меніска, на протилежність цьому, має місце зменшення частки клітинного компоненту у внутрішній зоні та його збільшення у зовнішній.

Внутрішньоутробне антигенне навантаження призводить до змінення описаних вище процесів становлення меніску, що проявляється збільшенням кількості міжклітинної речовини в експерименті порівняно з нормою на 21-шу добу та її зменшенням протягом другого місяця постнатального життя. Це доповнює та пояснює отримані нами раніше дані про те, що внутрішньоплідне введення антигену призводить до потовщення менісків на 21-шу добу постнатального життя та стоншення впродовж другого місяця [1]. В комплексі з описаними вище даними це дозволяє зробити висновок про незрілість та неспроможність екстрацелюлярного матриксу менісків у тварин експериментальної групи, зменшення його кількості та відповідне стоншення менісків у відповідь на змінення навантаження на суглоб. Зміни, що спостерігаються, вказують на формування проявів НДСТ. Підґрунтям для описаних процесів є наслідок внутрішньоутробної антигенної стимуляції у вигляді передчасного заселення периферійних органів імунологічно незрілими лімфоцитами та зміни співвідношення між ними та структурними елементами тканин, що їх оточують. Внаслідок цього змінюється синтетична та проліферативна активність клітин меніска. Описана морфологічна картина узгоджується з даними, що отримані О.А. Григор'євою та А.В. Федотченком щодо формування суглобового хряща та капсули [3,6] та з концепцією «лімфоцит – фактор морфогенезу» [2].

Висновки

Таким чином, внутрішньоутробне введення антигену призводить до змін у співвідношенні клітин та екстрацелюлярного матриксу в структурі менісків колінного суглоба щурів, що проявляється збільшенням відносної площі, що займає міжклітинна речовина, на 21-шу добу постнатального життя, в порівнянні з інтактними та контрольними тваринами, та збільшенням кількості клітин впродовж другого місяця.

Перспективи подальших досліджень

В подальшому планується дослідити особливості розподілу глікозаміногліканів та волокнистих структур у міжклітинній речовині тканини менісків колінного суглоба щурів в постнатальному періоді в нормі та після внутрішньоутробного введення антигенів.

Література

1. Абросімов Ю.Ю. Динаміка товщини менісків колінного суглоба щурів у нормі та після внутрішньоплодового введення антигену / Ю.Ю. Абросімов // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2016. – Т. 15, №1. – С. 20-23.
2. Волошин М.А. Лімфоцит – фактор морфогенезу / М.А. Волошин // Запорожский медицинский журнал. – 2005. – № 2. – С. 122.
3. Волошин Н.А. Экспериментальная модель развития синдрома недифференцированной дисплазии соединительной ткани / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева // Патология. – 2009. – Т. 6, № 1. – С. 39-42.
4. Герасименко М.А. Современные подходы к лечению повреждений мениска в детском возрасте / М.А. Герасименко, А.О. Одинцов // Медицинский журнал. – 2011. – № 1. – С. 42-45.
5. Нестеренко З.В. Дисплазия соединительной ткани – медико-социальный феномен XXI века / З.В. Нестеренко // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2012. – №1 (5) – С. 17-23.
6. Федотченко А.В. Особливості формування капсули суглоба після антенатальної дії антигену / А.В. Федотченко // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2014. – №4 (16). – С. 79-86.
7. Makris E.A. The knee meniscus: Structure–function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration / E.A. Makris, P. Hadidi, K.A. Athanasiou // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32., № 30. – P. 7411-7431.

УДК 611.728.3.018:[612.65+[612.63:616-097.1]].08:599.323.45

ДИНАМІКА СПІВВІДНОШЕННЯ КЛІТИН ТА ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ МЕНІСКІВ КОЛІННОГО СУГЛОБА ЩУРІВ У ПОСТНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ В НОРМІ ТА ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО ВВЕДЕННЯ АНТИГЕНУ

Волошин М. А., Абросімов Ю. Ю.

Резюме. В роботі досліджено особливості динаміки співвідношення клітин та екстрацелюлярного матриксу в структурі менісків колінного суглоба щурів в нормі та після внутрішньоутробного введення антигену з 21-ої до 90-ої доби життя. Встановлено, що внутрішньоутробне введення антигену призводить до змін у співвідношенні клітин та екстрацелюлярного матриксу в структурі менісків колінного суглоба щурів, що проявляється збільшенням відносної площі, що займає міжклітинна речовина, на 21-шу добу постнатального життя, в порівнянні з інтактними та контрольними тваринами, та збільшенням кількості клітин впродовж другого місяця.

Ключові слова: меніск, колінний суглоб, антиген, внутрішньоутробне введення, щури, недиференційована дисплазія сполучної тканини.

УДК 611.728.3.018:[612.65+[612.63:616-097.1]].08:599.323.45

ДИНАМИКА СООТНОШЕНИЯ КЛЕТОК И ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСА МЕНИСКОВ КОЛЕННОГО СУСТАВА КРЫС В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ В НОРМЕ И ПОСЛЕ ВНУТРИУТРОБНОГО ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНА

Волошин Н. А., Абросимов Ю. Ю.

Резюме. В работе исследованы особенности динамики соотношения клеток и экстрацеллюлярного матрикса в структуре менисков коленного сустава крыс в норме и после внутриутробного введения антигена с 21-х по 90-е сутки жизни. Установлено, что внутриутробное введение антигена приводит к изменениям в соотношении клеток и экстрацеллюлярного матрикса, что проявляется увеличением относительной площади, занимаемой межклеточным веществом, на 21-е сутки постнатальной жизни, по сравнению с интактными и контрольними животными, и увеличением количества клеток в течение второго месяца.

Ключевые слова: мениск, коленный сустав, антиген, внутриутробное введение, крысы, недифференцированная дисплазия соединительной ткани.

UDC 611.728.3.018:[612.65+[612.63:616-097.1]].08:599.323.45

DYNAMICS OF CELLS AND EXTRACELLULAR MATRIX RATIO IN THE MENISCI OF RATS' KNEE JOINT IN THE POSTNATAL PERIOD IN NORM AND AFTER INTRAFETAL ANTIGEN INJECTION

Voloshyn M. A., Abrosimov Yu. Yu.

Abstract. Dysplastic changes, including the syndrome of undifferentiated connective tissue dysplasia, are the basis of many diseases of the joints. Previous researches showed that intrafetal antigen injection can be used for its modeling. Reactivity of the knee joint meniscus is not studied in this condition.

Objective. To establish the features of the dynamics of cells and extracellular matrix ratio in the structure of the menisci of rats' knee joint in norm and after intrauterine antigen injection from the 21st to the 90th day life.

Methods. 80 white laboratory rats from the 21st till the 90th day of life were studied. The first group included 30 intact rats. 30 rats of the second group underwent transuterine, transmembranous, intrafetal injection of liquid purified staphylococcal anatoxin (10-14 binding units in 1 ml, 10 fold diluted, 0.05 ml) on the 18th day of prenatal period according to the method of M.A. Voloshyn (1981). 20 rats of the third group after injection of saline solution served as control. The progeny was born on the 22nd-24th day of prenatal period. Research was performed on the 21st, 30th, 45th, 60th and 90th days after birth. When working with experimental animals we were guided by the "European Convention for the protection of vertebrate animals ..." (Strasbourg, 18.03.86) and the Law of Ukraine "About protection of animals from cruel treatment" (№ 3447-IV). For the research left knee joint was taken, fixed in 10% neutral formalin. Decalcification was carried out using Trilon B, dehydration – in ethanol of rising concentration. Paraffin sections were made and stained with alcian blue (pH 2,6, $MgCl_2$ critical concentration 0,2 M) for the identification of the whole complex of glycosaminoglycans and differentiation of cells and extracellular matrix. In the sections the relative area of cells and matrix in internal and external zones of medial (MM_{Int}, MM_{Ext}) and lateral meniscus (LM_{Int}, LM_{Ext}, respectively) was measured. Zones were divided according to cells phenotype: fibroblast-like cells in outer zone and chondrocyte-like cells in inner one. The obtained data were processed using methods of variation statistics. Results were considered significant at $p<0.05$. The differences between the averages were evaluated using Student's t-test.

Results. On the 21st day statistically significant decrease of the area occupied by cells occurs (MM_{Ext}: in experiment 12,5±0,56% and 30,87±0,71% in intact group; LM_{Int}: 36,67±0,49% and 40,8±1,19%; LM_{Ext}: 16,67±0,56% and 24,11±0,87%, respectively).

On the 30th day, on the contrary, the shift of the cell-matrix ratio in the medial meniscus towards the cells is observed in the group of rats subjected to intrafetal antigen injection. (MM_{Int}: 36,66±1,41% in intact group and 47,92±1,0% in experiment; MM_{Ext}: 22,22±0,64% and 31,25±1,28%, respectively). Indicators of lateral meniscus are equal to those in the control group and they are not statistically different.

On the 45th day the aforementioned tendency remains, and there is an increase of the relative area occupied by cells in antigen-injected rats (MM_{Ext}: 25,21±0,55% in norm and 33,33±0,84% in experiment; LM_{Int}: 23,86±0,51% and 35,83±0,93%; LM_{Ext}: 20,24±1,4% and 25,0±0,37%, respectively). Similar changes are observed in the experimental group on the 60th day of postnatal life (MM_{Int}: 37,04±2,26% in intact group and 45,83±1,01% in experiment; LM_{Int}: 22,18±1,25% and 40,02±1,55%; LM_{Ext}: 31,66±1,02% and 37,88±1,20%, respectively). Subsequently, during the third month of postnatal life the aforementioned trend is leveled, and statistically significant difference between the indices of relative area disappears.

Conclusion. Thus, intrauterine antigen injection results in changes in the ratio of cells and extracellular matrix, which manifests in the increase of relative area of matrix on the 21st day of postnatal life as compared to the intact and control animals and increase in number of cells during the second month.

Keywords: meniscus, knee joint, antigen, intrauterine injection, rats, undifferentiated connective tissue dysplasia.

Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.

Стаття надійшла 01.03.2016 року