

О.А. Григор'єва, М.А. Волошин

## Експериментальне моделювання синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини шляхом порушення антигенного гомеостазу в системі мати-плацента-плід

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** недиференційована дисплазія сполучної тканини, лімфоцити, внутрішньоплідне введення антигену, суглоб.

Експериментально встановлено зміни у антигенпреміюваних щурів у вигляді порушення розподілу волокон у суглобовій капсулі, більш ранньої появи субхондральної кістки з подальшим порушенням формування кісток кінцівок є малими стигмами синдрому НДСТ, що виникають на фоні внутрішньоплідного проникнення антигену.

### Экспериментальное моделирование синдрома недифференцированной дисплазии соединительной ткани путем изменения антигенного гомеостаза в системе мать-плацента-плод

Е.А. Григорьева, Н.А. Волошин

Экспериментально установленные изменения у антигенпремированных крыс в виде нарушения распределения волокон суставной капсулы, более раннего появления субхондральной кости с дальнейшим нарушением формирования костей конечностей являются малыми стигмами синдрома НДСТ, которые возникают на фоне внутриплодного введения антигена.

**Ключевые слова:** недифференцированная дисплазия соединительной ткани, лимфоциты, внутриплодное введение антигена, сустав.

*Патология.* – 2011. – Т.8, №2. – С. 39–42

### Experimental model of undifferentiated dysplasia of connective tissue syndrome on the background of changing antigen homeostasis in system mother-placenta-fetus

О.А. Grygorieva, М.А. Voloshyn

Experimentally revealed changes in rats after intranatal antigen administration notably derangement of joint capsule fibers distribution, more earlier formation of subchondral bone with further limbs' bones formation violation are small stigmas of undifferentiated dysplasia of connective tissue syndrome which arise against the background of intranatal antigen administration.

**Key words:** undifferentiated dysplasia of connective tissue syndrome, lymphocytes, intrafetal antigen injection, joint.

*Pathologia.* 2011; 8(2): 39–42

Погіршення екологічного стану в Україні, вплив різноманітних чинників на організм вагітної призводять до зростання перинатальної патології [1,7,15]. У кагамнезі матерів, у дітей яких діагностована недиференційована дисплазія сполучної тканини (НДСТ), відзначаються гестози 1–2 половини вагітності, спадкові захворювання, серед яких можна виділити зміни гормонального й антигенного гомеостазу плоду і матері [10,12]. У діагностиці НДСТ провідну роль відіграє одномоментне вивчення стану ізольованих органів у різні вікові періоди [9,11]. Безпосередні фактори, що призводять до цього стану, і динаміку формування НДСТ вивчено недостатньо.

Відсутність системного підходу до вивчення проблеми недиференційованої дисплазії сполучної тканини не дозволяє отримати надійні результати, тому виникає необхідність у проведенні фундаментальних досліджень закономірностей системних змін сполучної тканини та її реактивності як у нормі, так і після дії різних чинників. Вивчення морфологічних основ розвитку захворювань сполучної тканини, профілактика захворювань сполучної тканини загалом і кісткової системи зокрема, відповідно до рекомендацій ВООЗ, є важливою складовою частиною Національних програм охорони здоров'я населення

і основою планування медичної допомоги [15].

#### Мета роботи

Розробити експериментальну модель формування недиференційованої дисплазії сполучної тканини на прикладі колінного суглоба щурів шляхом внутрішньоплідного введення антигену.

#### Матеріали і методи дослідження

Для вивчення морфогенезу і системних реакцій сполучної тканини обрано колінний суглоб, оскільки, будучи складним і комплексним, він складається зі структур, взаємовідношення між якими в цілому відображають реактивність сполучної тканини організму. Неможливість прослідкувати розвиток суглоба як органу у людини в ранньому періоді онтогенезу пов'язана з різною супутньою патологією загинувших дітей і з біоетичними проблемами, що вимагає вивчення особливостей морфогенезу суглобів в експерименті на лабораторних тваринах.

Реактивність структур суглоба вивчали з використанням моделі внутрішньоплідного введення антигену, здійснюване на 18 добу плодового періоду за способом М.А. Волошина (1981). Забій тварин (на 1, 7, 11, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120 добу) проводили шляхом декапітації після ефірного наркозу. Тварин зважували, вимірювали куприково-тім'яну відстань, довжину лівої стегнової

і лівої великогомілкової кістки, коло грудної клітки, міжтім'яну відстань, обчислювали масо-ростовий коефіцієнт.

У гістологічних зрізах вивчали динаміку співвідношення волокон, судин мікроциркуляторного русла, клітин і міжклітинної речовини синовіального шару суглобової капсули, клітин і міжклітинної речовини в морфофункціональних зонах суглобового хряща, їх товщину. Для вивчення особливостей розподілу та опису волокон гістологічні зрізи фарбували за Малорі, за Ван Гізеном, орсин-новим фуксином, проводили постановку реакції імпрегнації карбонатом срібла за Лейдлоу. Коллаген І типу також виявляли лектингістохімічним методом з використанням лектину білосніжки весняної (отримано патент України) [2]. Імуногістохімічним методом за допомогою моноклональних антитіл ki-67 (LabVision, USA) виявляли клітини, що проліферують. Використовували стрептавідин-біоцинову систему візуалізації антитіл LSAB2 (LabVision, USA). Підраховували відносну кількість ki-67<sup>+</sup>клітин у морфофункціональних зонах суглобового хряща. Для кількісного і якісного вивчення розподілу лімфоцитів у суглобовій капсулі колінного суглоба використовували модифіковану морфометричну сітку Глаголева. Для виявлення натуральних кілерних клітин зрізи забарвлювали альціановим синім (критична концентрація хлориду магнію 0,6М) з дофарбуванням ядер гематоксилином. Для виявлення в синовіальному шарі суглобової капсули лімфоцитів, фенотипово помітних за вуглеводними залишками, проводили дослідження із застосуванням лектинів арахісу, сочевиці та сої (PNA<sup>+</sup>, LCA<sup>+</sup>, SBA<sup>+</sup>) з використанням стандартних наборів «Лектинь». Лектингістохімічну реакцію вважали позитивною за наявності бензидинової мітки на поверхні цитоплазматичної мембрани. Статистичну обробку отриманих числових результатів проводили методами варіаційної статистики на персональному комп'ютері з використанням, у тому числі, стат. пакету ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Достовірність різниці між групами оцінювали за методом Ст'юдента-Фішера для порогу вірогідності результатів не менше 95%.

### Результати та їх обговорення

Встановлено, що у новонароджених антигенпреміюваних щурів у перехідній частині суглобової капсули визначається найбільший вміст як лімфоцитів загалом, так і PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів зокрема, що пов'язано з виходом імунологічно незрілих лімфоцитів з тимуса на периферію і заселення ними периферичних лімфоїдних і нелімфоїдних органів [3,6]. Пік вмісту PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів у перехідній зоні суглобової капсули в інтактних, контрольних і антигенпреміюваних щурів спостерігається на 7 добу життя. До кінця четвертого місяця життя щільність розподілу PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів хвилеподібно зменшується, але вони не зникають, що відповідає даним про присутність серед PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів популяції  $\gamma/\delta$ -Т лімфоцитів, які виконують морфогенетичну та імунорегуляторну функції [14,16].

У антигенпреміюваних щурів раніше, ніж у контролі, на 11 добу після народження на фоні підвищеного, в порівнянні з контролем, вмісту як загальної кількості лімфоцитів ( $8,65 \pm 0,38$  і  $7,03 \pm 0,64$  клітин на ум. од. площі, відповідно), так і PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів ( $5,95 \pm 0,28$  і  $3,75 \pm 0,15$  клітин на ум. од. площі відповідно), формується субхондральна кістка.

Збільшений вміст PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів у синовіальному шарі суглобової капсули, можливо, змінює активність ендотеліоцитів, збільшуючи синтез VEGF, що відіграє одну з ключових ролей у процесі енхондрального окостеніння [15,19]. Це призводить до більш ранньої судинної інвазії та передчасного утворення субхондральної кістки та суглобового хряща, хондроцити якого є функціонально незрілими. Це проявляється нижчим, у порівнянні з контролем, вмістом сульфатованих глікозаміногліканів, їх накопиченням у складі внутрішньоцитоплазматичних включень і порушенням екскреції в міжклітинне середовище, що, у свою чергу, змінює еластопружні властивості суглобового хряща. Низький вміст сульфатованих глікозаміногліканів полегшує вrostання кровоносних судин з проміжної зони [18]. Окрім цього, в антигенпреміюваних щурів рівень вмісту фібронектину в матриксі, що оточує врастаючі кровоносні судини, вищий, ніж у інтактних і контрольних тварин. Цей факт збільшення вмісту фібронектину в міжклітинній речовині сприяє прискореним темпам судинної інвазії [20] і руйнуванню функціонально незрілого хряща металопротеазами, синтезованими макрофагами, розташованими по ходу врастаючих судин. У стінці врастаючих кровоносних судин визначаються волокна колагену III типу, PNA<sup>+</sup>-лімфоцити. Зазнаючи агресивної дії з боку остеобластів субхондральної кістки, разом зі зростаючим механічним навантаженням, суглобовий хрящ антигенпреміюваних щурів, будучи, по суті, функціонально незрілим, спочатку компенсаторно потовщується (до  $619,41 \pm 11,41$  мкм на 14 добу після народження), а надалі безповоротно стоншується (до  $110,32 \pm 4,67$  мкм на 90 добу життя), що може бути морфологічним підґрунтям для розвитку синдрому НДСТ.

З боку хряща формуванню вторинного осередку окостеніння сприяє наростання обсягу клітинної маси. Цитоплазма хондроцитів вакуолізується, що є ознакою апоптозу. На цитоплазматичній мембрані хондроцитів експресовані молекули галектину-3, що виявляються за допомогою лектину арахісу (PNA) [5]. Відносна кількість хондроцитів з PNA<sup>+</sup>-внутрішньоцитоплазматичними включеннями в поверхневій зоні впродовж 4 місяців після народження досить стабільна. Встановлено, що у антигенпреміюваних щурів на 11 і 14 добу після народження визначається достовірне збільшення вмісту хондроцитів з PNA<sup>+</sup>-внутрішньоцитоплазматичними включеннями. До кінця першого місяця життя цей показник зменшується і стає достовірно нижчим, ніж у контролі, починаючи з 45 доби після народження різниця в показниках нівелюється. Отриманий факт, імовірно, пов'язаний з прискореним процесом диференціювання

хряща в антигенпреміюваних щурів, прискоренням процесу кавітації, що полягає в регуляції процесу елімінації Col II<sup>+</sup>-клітин центрального шару інтерзони первинного суглоба, викликаний збільшенням кількості PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів у перехідній частині капсули. Окрім цього, у новонароджених антигенпреміюваних щурів на фоні збільшення кількості PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів у перехідній частині капсули визначається найбільший відносний вміст ki-67<sup>+</sup>-клітин у перихондральній зоні суглобового хряща [4], що є основою для прискорення темпів диференціювання хондроцитів і формування суглобового хряща у щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну.

Разом з цим, у антигенпреміюваних тварин виявлена зміна пропорцій тіла в порівнянні з контрольними тваринами, що проявляється зміною довжини гомілки в ранньому післянатальному періоді [8]. У новонароджених антигенпреміюваних щурів довжина гомілки достовірно більша, ніж у контролі (9,0±0,83 мм і 7,45±0,15 мм, відповідно). Надалі, з 7 до 45 доби після народження, визначається тенденція до вкорочення довжини гомілки антигенпреміюваних щурів, а з 60 доби життя до кінця періоду спостереження визначається достовірно вкорочення гомілки у щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну.

На фоні збільшення вмісту PNA<sup>+</sup>-лімфоцитів у перехідній частині суглобової капсули антигенпреміюваних щурів змінюється функціональна активність фібробластів, що проявляється зміною співвідношення між волокнами й екстрацелюлярним матриксом синовіальної оболонки у бік переважання міжклітинної речовини.

З 11 доби в перехідній частині суглобової капсули в антигенпреміюваних щурів вперше, на відміну від інших груп тварин, виявляються орсеїнові еластичні волокна. На збільшення кількості еластичних волокон

в дермі при гіпермобільному синдромі вказано в роботі [17]. Зменшується як загальна щільність розподілу клітин на умовній одиниці площі в порівнянні з контролем (152,28±2,45 і 181,17±2,27 відповідно), так і абсолютна кількість фібробластів (72,92±1,23 і 97,74±1,56 відповідно) і фіброцитів (37,24±0,62 і 48,11±0,78 відповідно). Фібробластно-лімфоцитарний коефіцієнт мінімальний у порівнянні з іншими групами.

У новонароджених щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну процес волокнутворення сповільнюється в порівнянні з контрольними й інтактними тваринами, на частку волокон припадає 18,57±2,37% відносної площі синовіального шару, а відносна площа, зайнята міжклітинною речовиною, збільшується в порівнянні з контролем (40,47±2,96% і 33,56±1,33%, відповідно). У щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну достовірно потовщується синовіальний шар вісцеральної частини суглобової капсули впродовж перших одинадцяти днів після народження і з 21 до 45 доби життя, що пов'язано в першому випадку з акселерацією процесів диференціювання суглобового хряща, у другому випадку потовщення пов'язане з компенсацією функціональної незрілості екстрацелюлярного матриксу суглобового хряща, який не має можливості забезпечувати адекватну протидію тиску при наростаючому навантаженні.

Отже, експериментально встановлені зміни в антигенпреміюваних щурів у вигляді порушення розподілу волокон у суглобовій капсулі, потовщення суглобового хряща на 14 добу і його подальше стоншування до 60 доби, більш рання поява субхондральної кістки з подальшим порушенням формування кісток кінцівок, є малими стигмами синдрому НДСТ, що виникають на фоні внутрішньоплідного проникнення антигену (рис. 1).



Рис. 1. Експериментальна модель розвитку синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини. Схема.

## Висновки

У щурів після внутрішньоплідного введення антигену на фоні підвищеного вмісту PNA+-лімфоцитів перехідної частини суглобової капсули визначається більш раннє (11 доба після народження), в порівнянні з контрольними тваринами (14 доба після народження), утворення субхондральної кістки, чому передує достовірне, в порівнянні з контролем, збільшення відносної площі, зайнятої врослаючими з перехідної зони в хрящ кровоносними судинами на 7 ( $5,00 \pm 0,11\%$  і  $3,33 \pm 0,12\%$  відповідно) і 11 ( $7,84 \pm 0,21\%$  і  $4,85 \pm 0,12\%$  відповідно) добу після народження, збільшується вміст фібронектину і зменшується вміст сульфатованих глікозаміногліканів у міжклітинній речовині, що оточує врослаючі судини.

У щурів, які внутрішньоплідно отримали імуноглобулін, визначається достовірна впродовж 30-ти діб після народження зміна лімфоцито-фібробластичного коефіцієнта перехідної зони у бік переважання лімфоцитів, і раніше на 3 доби ніж у контролі з'являються еластичні волокна.

Комплекс змін, отриманий після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну, відповідає морфологічним ознакам синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини, що дозволяє використовувати запропоновану модель як експериментальну модель недиференційованої дисплазії сполучної тканини.

## Література

1. Вельтищев Ю.Е. Экологически детерминированные нарушения состояния здоровья детей / Ю.Е. Вельтищев // Рос. педиатрический журнал. – 1999. – №3. – С. 7–8.
2. Пат. на корисну модель № 39538 G01N21/00 25.02.2009. Спосіб виявлення волокон колагену I типу у лабораторних тварин в гістологічних зрізах / М.А. Волошин, Е.А. Григор'єва – Бюл. №4.
3. Волошин Н.А. Внутриутробная антигенная стимуляция как модель для изучения симптомокомплекса висцеромегалии / Н.А. Волошин, Е.А. Григор'єва, М.С. Щербаков // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Т. 9, №4. – С. 57–59.
4. Волошин Н.А. Особенности пролиферативной активности хондроцитов суставного хряща крыс в раннем постнатальном периоде / Н.А. Волошин, Е.А. Григор'єва // Галицкий лікарський вісник. – 2010. – Т. 17, №2 (ч. 2). – С. 39–41.
5. Волошин Н.А. Лектингистохимическая характеристика клеток суставного хряща крыс в раннем постнатальном периоде в норме и эксперименте / Н.А. Волошин, Е.А. Григор'єва // Таврический медико-биологический вестник. – 2008. – Т. 11, №3, ч. 1. – С. 28–30.
6. Волошин Н.А. Экспериментальная модель развития синдрома недифференцированной дисплазии соединительной ткани / Н.А. Волошин, Е.А. Григор'єва // Патология. – 2009. – Т. 6, №1. – С. 39–42.
7. Гречанина О.Я. Катастрофы перинатального периода / О.Я. Гречанина // Соціальна педіатрія. – К., 2001. – С. 69–74.
8. Григор'єва Е.А. Особенности динамики массо-ростовых показателей крыс в раннем постнатальном периоде в норме и после внутриутробного введения иммуноглобулина и гидрокортизона / Е.А. Григор'єва, А.В. Шестакова // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2005. – Вип. XIV. – С. 181–185.
9. Кадурина Т.И. Наследственные коллагенопатии / Т.И. Кадурина. – СПб.: Невский диалект, 2000. – 271 с.
10. Клеменов А.В. Недифференцированная дисплазия соединительной ткани: клинические проявления, возможности диагностики и патогенетического лечения / А.В. Клеменов – М.: ООО «Информтех», 2005. – 136 с.
11. Корнев Н.М. Клинико-иммунологические особенности гипермобильного синдрома у детей и подростков / Н.М. Корнев, Н.А. Костюрина // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2001. – №2. – С. 70–73.
12. Лукьянова О.М. Проблемы здоровья дитини та наукові аспекти профілактики його порушень / О.М. Лукьянова // Містечтво лікування. – 2005. – №2. – С. 6–15.
13. Моисеенко Р.А. Охрана здоровья детей и матерей в Украине: проблемы и перспективы / Р.А. Моисеенко // Здоровье женщины. – 2003. – №3. – С. 8–16.
14. 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, №4. – P. 458–476.
15. Gerber H.P. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation / H.P. Gerber // Nat. Med. – 1999. – Vol. 5. – P. 623–628.
16. Hayday A. Immunoregulation in the tissues by  $\gamma$ -T cells / A. Hayday, R. Tigelaar // Nat. Rev. Immunol. – 2003. – №3. – P. 233–242.
17. Kobayasi T. Dermal elastic fibres in the inherited hypermobile disorders / T. Kobayasi // J. Dermatol. Sci. – 2006. – Vol. 41 (3). – P. 175–185.
18. Liu Y. Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and chondroitin sulfate A on human monocytic THP-1 cell migration / Y. Liu, H. Yang, K. Otaka // Colloids Surf. B. Biointerfaces. – 2005. – Vol. 10; 43 (3–4). – P. 216–220.
19. Maes C. Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival / C. Maes, I. Stockmans, K. Moermans // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 113. – P. 188–199.
20. McCarthney-Francis N. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase / N. McCarthney-Francis, J.B. Allen, D.E. Mizel // J. Exp. Med. – 1993. – Vol. 178. – P. 749–754.

## Відомості про авторів:

Григор'єва О.А., д. мед. н., доцент каф. анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії ЗДМУ.

Волошин М.А., д. мед. н., професор, зав. каф. анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії ЗДМУ.

## Адреса для листування:

Григор'єва Олена Анатоліївна. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, ЗДМУ.

Тел.: (061) 233 33 56. E-mail: mstesha@mail.ru