

ВІКОВА ЛЕКТИНГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУГЛОБОВОГО ХРЯЩА ЩУРІВ

д. мед. н. Григор'єва О. А.,
к. мед. н. Ант О. А.,
к. мед. н. Камишина В. А.

Україна, м. Запоріжжя, Запорізький державний медичний університет,
кафедра анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії

Abstract. On the basis of the conducted complex of research methods (macro-microscopic, histological, histochemical, lectinohistochemical and immunohistochemical) the features of morphogenesis of rats' knee-joint from a moment of birth up to 120-th day of life are analysed. It is settled that articular cartilage after birth is passed by three stages of maturation: foetal, juvenil and definitive. It is settled that level of expression of receptors to peanut lectin on the chondrocytes' cytoplasm membrane reflects the degree of chondrocytes' cytoplasm vacuolisation in the process of cartilage development. Changes in expression of receptors to peanut agglutinin and to wheat germ agglutinin reflect the process of mineralization and development of subchondral bone.

Keywords: knee joint, articular cartilage, chondrocyte, lectins' receptors, hydrocarbonate residuals.

Вступ. На теперішній час, незважаючи на значний фактичний матеріал, питання про будову суглобової капсули, суглобового хряща, суглобової поверхні залишається суперечливим (Sandell, 2001; Rivas R., 2002; Horky T., 2002, 2004). Принциповим є те, що майже усі запропоновані терміни відносно будови суглобу наводяться без вказування віку, що викликає непорозуміння і протиріччя при описі одних і тих же структур. Протиріччя в описі будови суглобів у людини обумовлено відсутністю можливості прослідкувати етапи морфогенезу суглобів у зв'язку з наявністю супутньої патології та тривалим часом, який проходить від смерті до забору матеріалу. Тому вивчення закономірностей розвитку і будови суглобів в нормі можливо тільки в експерименті на лабораторних тваринах. Отримані експериментальні дані можуть слугувати підґрунтям для вивчення будови суглобів у людини.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктом експериментального дослідження стали колінні суглоби сингенних щурів (постачальник щурів "Біомодельсервіс" (м. Київ)) від народження до 120-ої доби життя. При роботі з експериментальними тваринами керувалися "Європейською конвенцією по захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних і інших наукових цілях" (Страсбург, 18.03.86). Догляд за тваринами здійснювали відповідно до норм і вимог, розроблених згідно з кодексом Ради Міжнародних медичних організацій "Міжнародні рекомендації для проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин". Тварин виводили з експерименту на 1-у, 7-у, 11-у, 14-у, 21-у, 30-у, 45-у, 60-у, 90-у, 120-у добу після народження під ефірним наркозом шляхом декапітації в другій половині дня, з 13⁰⁰ до 14⁰⁰, дотримуючись наказу "Про заходи по подальшому вдосконаленню організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин".

Для проведення стандартного гістологічного дослідження суглоби фіксували в рідині Буена протягом 24 годин. Рідина Буена є найбільш вдалим м'яким фіксатором. Шматочки зневоднювали у висхідній батареї спиртів. Зневоднення починали з 40⁰ етилового спирту для запобігання появи артефактів у вигляді пікнозу ядер лімфоцитів і синовіоцитів. Виготовляли парафінові блоки так, щоб суглоби були розташовані однаково, і так, щоб на зрізах відбивалася структура суглобового хряща стегнової кістки, надколінка, великогомілкової кістки, менісків, суглобової капсули. Серійні гістологічні зрізи виготовляли завтовшки 3-5 мкм. Для оглядової мікроскопії і морфометричного дослідження використовували стандартне забарвлення гістологічних препаратів гематоксилином і еозином. Анексин V виявляли по відкладенню бензидинової мітки при виявленні рецепторів до лектину зав'язі пшениці (WGA) (Gao C.-X., 2005), для виявлення галектина - 3 використовували лектингістохімічну реакцію з лектином арахісу (PNA) (Orazizadeh M., 2005), фібрoneктин виявляли за допомогою лектингістохімічної реакції з лектином арахісу з попередньою обробкою зрізів пепсином (Praetorius J., 2001). Також за допомогою лектингістохімічних реакцій вивчали розподіл рецепторів до лектинів насіння сої (SBA), сочевиці (LCA), конканаваліну А (Con A), білосніжки весняної (LVA), вікі посівної (VSA). Отримані результати оцінювали напівкількісно.

Отримані результати. Глікокон'югати - основні компоненти зовнішньої поверхні клітини. Їх вуглеводна структура безповоротно змінюється в процесі розвитку. У складі внутрішньоцитоплазматичних включень клітин перихондральної зони епіфізарного хряща визначаються альціанофільні гранули, PNA⁺, WGA⁺, SBA⁺, LCA⁺, VSA⁺, Con A⁺, LVA⁺ -

сполуки. У міжклітинній речовині переважає гіалуронова кислота, визначаються PNA⁺-сполуки, що свідчать про наявність розчинної фракції фібронектину (Praetorius J., 2001). У прохондральній зоні збільшується, в порівнянні з перихондральною, відносна площа, зайнята міжклітинною речовиною (48,10±1,18 %). Розміри клітин збільшуються як за рахунок збільшення площі ядра, так і за рахунок об'єму цитоплазми. Ядерно-цитоплазматичне відношення вище, ніж в перихондральній зоні (0,61±0,029 і 0,51±0,017, відповідно). Характер розподілу рецепторів до лектинів на внутрішньоцитоплазматичних включеннях клітин прохондральної зони практично не змінюється, в порівнянні з перихондральною зоною. У метахондральній зоні розміри клітини збільшуються (39,78±1,38 мкм²). З'являються клітини з вакуолізованою цитоплазмою, в таких клітинах змінюється характер розподілу рецепторів до лектинів арахісу і зав'язі пшениці на цитоплазматичній мембрані. Галектин-3, зв'язуючий лектин арахісу (PNA) (Orazizadeh M., 2005), на цитоплазматичній мембрані локалізується переважно на поверхні, зверненій до матриксу, а анексин-5, що є рецептором до лектину зав'язі пшениці (WGA), - переважно на поверхні, зверненій до сусіднього хондроциту. Ця зміна локалізації рецепторів до лектинів арахісу і зав'язі пшениці, їх поява на цитоплазматичній мембрані вказує на початок підготовчого етапу процесу мінералізації (Gao C.-X., 2005) і створення умов для формування вторинного осередку окостеніння - субхондральної кістки.

Склад і розподіл глікозаміногліканів суглобового хряща дистального епіфізу стегнової кістки щурів у ранньому післянатальному періоді характеризується зональністю і динамічно змінюється упродовж перших чотирьох місяців життя, що пов'язано з процесом хондрогенезу, який триває і після народження, та збільшенням рівня рухової активності і навантаження на суглобову поверхню. Розподіл і склад глікозаміногліканів суглобового хряща відбивають міру його диференціювання і функціональної активності хондроцитів в процесі хондрогенезу.

Починаючи з 7-ої доби після народження, для формування вторинного осередку окостеніння в епіфізарних хрящах виявляються вростаючі з перехідної частини кровоносні судини, відносна площа яких збільшується з 7-ої по 11-у добу життя.

На 11-у добу після народження в епіфізарному хрящі диференціюються поверхнева і проміжна зона, характерні для ювенільного суглобового хряща. Хондроцити поверхневої зони округлої форми, 45,83±1,07 мкм², розташовані в 3-4 ряди поодиночі або попарно. Визначаються ki-67⁺-клітини, локалізовані переважно в 2 - 3-му ряду поверхневої зони в ділянках, розташованих ближче до перехідної зони. Вісь ділення хондроцитів розташована переважно перпендикулярно суглобовій поверхні. Переважає відносна площа, зайнята хондроцитами (62,0±3,08 %). В хондроцитах поверхневої зони виявляються дрібнодисперсні PNA⁺, WGA⁺, SBA⁺, LCA⁺, VSA⁺ -внутрішньоцитоплазматичні включення. У міжклітинній речовині переважає гіалуронова кислота, виявляються речовини, що містять вуглеводні залишки β-D-галактози, α-D-манози, NacDGlc, NacDGal, в міжтериторіальному матриксі тангенціального шару поверхневої зони визначаються хондроїтинсульфати. У проміжній зоні розміри хондроцитів збільшуються (78,66±2,61 мкм²) переважно за рахунок вакуолізації цитоплазми, ядерно-цитоплазматичний індекс низький (0,23±0,01). Виявляються ki-67⁺ клітини, проте їх щільність розподілу нижча, ніж у поверхневій зоні. Починають формуватися ізогенні групи, утворені 3-5 хондроцитами у вигляді розетки, оточеної переривчастим територіальним слабо SBA⁺-матриком. Змінюється характер розподілу внутрішньоцитоплазматичних гранул і їх якісний склад. PNA⁺, WGA⁺, SBA⁺, LCA⁺ гранули стають більшими. PNA⁺ і LCA⁺-рецептори, окрім внутрішньоцитоплазматичних гранул, експресуються на цитоплазматичній мембрані, на боці, зверненому до міжклітинної речовини. Виявлена динаміка розподілу рецепторів до лектину сочевиці (LCA) на хондроцитах суглобового хряща в процесі його онтогенезу співпадає з описаним M.J. Howard (2004) розподілом манозозв'язуючого лектину в суглобовому хрящі мишей лінії CBA, що дозволяє використовувати лектин сочевиці для ідентифікації endo-180 в суглобовому хрящі і, тим самим і судити про міру зрілості і диференціювання хондроцитів. WGA⁺-рецептори визначаються на поверхні цитоплазматичної мембрани, зверненої до сусідніх хондроцитів, а VSA⁺ -сполуки розподілені на мембрані рівномірно. Ця зміна розподілу галектину-3, анексину-5 і глікопротеїну endo-180 свідчить про процеси дозрівання, диференціювання і кальцинації хондроцитів суглобового хряща, який формується. У центрі епіфізарного хряща визначається рівновіддалене від суглобової поверхні скупчення хондроцитів з вакуолізованою цитоплазмою і ядрами з ознаками деструкції. На таких хондроцитах рецептори до лектину арахісу визначаються переважно на цитоплазматичній мембрані, на поверхні, зверненій до міжтериторіального матриксу, а рецептори до лектинів зав'язі пшениці (WGA) і посівного горошку (VSA) - рівномірно на цитоплазматичній мембрані. Розподіл рецепторів до лектинів на цитоплазматичній мембрані хондроцитів і в міжклітинній речовині суглобового хряща та суглобової поверхні характеризується зональністю (рис. 1) і відображає ступінь диференціювання хондроцитів.

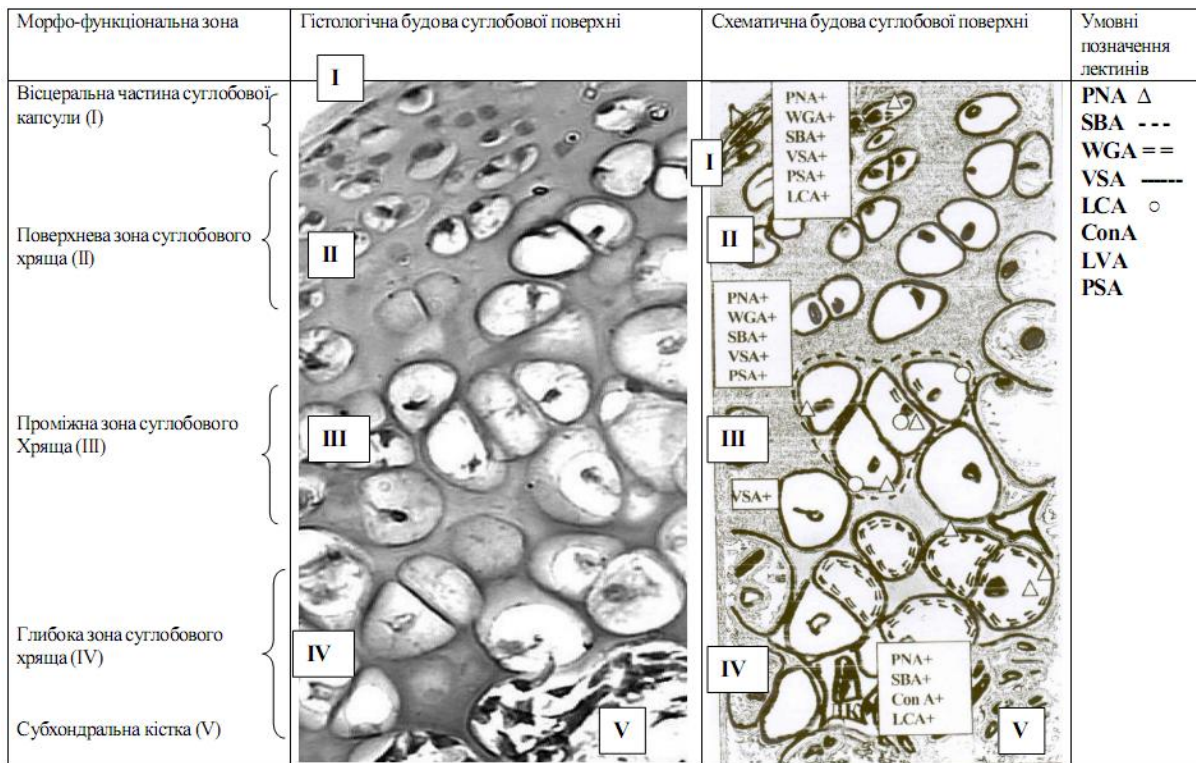


Рис.1. Особливості розподілу рецепторів до лектинів в суглобової поверхні

На 120-у добу після народження у суглобовому хрящі помітна стовпчаста структура проміжної зони. У глибокій зоні диференціюється демаркаційна лінія, зона некальцинованого і кальцинованого хряща. Встановлено, що демаркаційна лінія представлена короткими PNA⁺, WGA⁺, SBA⁺-волоконками, орієнтованими перпендикулярно до суглобової поверхні. PNA⁺, WGA⁺, SBA⁺-структури демаркаційної лінії описано нами вперше. На нашу думку, вуглеводні компоненти демаркаційної лінії служать не лише для забезпечення міцності кістково-хрящового з'єднання, але і є анатомо-фізіологічним і неспецифічним імунологічним бар'єром між хрящем і субхондральною кісткою.

Висновки. Таким чином, в роботі встановлено, що розподіл рецепторів до лектинів у суглобовому хрящі щурів характеризується зональністю та змінюється відповідно до розвитку хряща. Найбільш інформативним з'являється зміна розподілу рецепторів до лектину арахісу (PNA), сочевиці (LCA) та зародків пшениці (WGA), що відображає процеси диференціювання, мінералізації хряща та формування вторинного осередку окостеніння – субхондральної кістки. Ці процеси супроводжуються змінами розмірів хондроцитів, їх вакуолізацією та зруйнуванням.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gao C.-X. Bisecting GlcNAc mediates the binding of annexin V to Hsp47 / C.-X. Gao, E. Miyoshi, N. Uozumi // *Glycobiology*.-2005.-№ 15.-P.1067- 1075.
2. Horky D. Submicroscopic structure of canine articular cartilage / D. Horky, F. Tichy // *Acta Vet. Brno*. - 2002. – Vol. 71. - P.151 - 157.
3. Horky D. Submicroscopic structure of equine articular cartilage / D. Horky, F. Tichy // *Vet. Med.-Czech*. – 2004. - Vol. 49 (6). - P. 207-216.
4. Howard M. J. Distribution of Endo 180 receptor and ligand in developing articular cartilage / M. J. Howard, M. G. Chambers, R. M. Mason // *Osteoarthritis and cartilage*. – 2004. – Vol. 12, N 1. – P. 74 – 82.
5. Orazizadeh M. Differential immunohistochemical expression pattern of galectin-3 in normal and osteoarthritic articular cartilage / M. Orazizadeh, D. M. Salter // *IJI*. - 2005. - N 2. - P. 78-86.
6. Praetorius J. Specific lectin binding to beta1 integrin and fibronectin on the apical membrane of madin-darby canine kidney cells / J. Praetorius, P. Backlund, A. L. Yergey // *J. Membr. Biol*. – 2001. - № 184. - P.273-281.
7. Rivas R. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit / R. Rivas, F. Shapiro // *J. Bone Joint Surg. Am*. - 2002. – Vol. 84. - P. 85 - 100.
8. Sandell L. J. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis / L. J. Sandell, T. Aigner // *Arthritis research*.- 2001 a.- Vol. 3, N 2.- P. 342 - 347.