
МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

© Григор'єва О. А.

УДК: 616.72-018-092.9

Григор'єва О. А.

МЕТОДИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВИВЧЕННЯ РЕАКТИВНОСТІ КАПСУЛИ СУГЛОБА

Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)

mstesha@mail.ru

Вступ. Капсула суглоба є невід'ємним компонентом суглобу як органу і підтримує його цілісність. Пошкодження суглобової капсули деякого ґенезу (запалення, травма та ін.) призводять до порушення функції суглоба в цілому, що може привести до непрацездатності і майже до інвалідності людини, особливо, якщо розмова йде про великі суглоби (колінний, кульшовий). Існують суперечливі дані про первинну роль пошкоджень капсули суглоба у розвитку захворювань суглобів [18], але більшість робіт спрямована на вивчення пошкоджень капсули суглобів у дорослих, не звертаючи увагу на можливі передумови, пов'язані з особливостями формування суглобу у внутрішньоплідному періоді розвитку на тлі впливу чинників різного походження (антигенне навантаження, гормональний дисбаланс, алкоголь, та ін.) на систему мати-плацента-плід. У будь-якому разі до наступного моменту немає чіткого методичного підходу до морфологічного аналізу реактивності капсули суглобу.

Мета дослідження – визначити та обґрунтувати методи морфологічного дослідження реактивності капсули суглоба.

Об'єкт і методи дослідження. По-перше: при гістологічному дослідженні капсули суглоба для уникнення непорозуміння в термінології використовували наступні терміни: шари (*stratum*) (волокнистий і синовіальний), а не перетинки (*membrana*), тому що принципово мембрана – це безклітинна структура, яка складається з волокон і міжклітинної речовини, а шар – структура, в склад якої окрім волокон і міжклітинної речовини входять клітини. Дослівно: термін *Stratum* (лат.) – простираadlo, від *sternere*, *pp stratus* – розстилати – пласт, шар, один з шарів тої чи іншої диференційованої тканини; термін *Membrana* (лат.) – кожа, оболонка – мембрана, перетинка, плівка, оболонка. В синовіальному шарі розрізняли покривний шар (*intima of synovial membrane* в підручнику *Gray's Anatomy* (1973); або покривний шар синовіальної оболонки описаний В. М. Павловою (1980), який складається з синовіоцитів або вистеляючих клітин, міжклітинної речовини та базальної пластинки і підсиновіальний прошарок або основа

(*tela subsynoviale*), який розташований між синовіальним і фіброзним шарами. Цей прошарок відповідає термінам *subintima of synovial membrane* (*Gray's Anatomy*, 1973) або поверхневий та глибокий волокнисті шари синовіальної оболонки, які описані В. М. Павловою (1980) [10].

Також в суглобовій капсулі виділили пристінкову частину (*pars parietalis*), яка відділяє суглобову порожнину від навколишніх тканин; внутрішню частину (*pars visceralis*), яка покриває суглобовий хрящ і всі внутрішньосуглобові структури (зв'язки, меніски, диски та ін.) і перехідну частину (*pars intermedia*), яка розташована між пристінковою і внутрішньою частинами і в якій визначається перехід синовіоцитів з пристінкової частини капсули на внутрішню частину; колагенові та еластичні волокна переходять як в інші частини капсули, так і вплітаються в суглобовий хрящ, що забезпечує міцну фіксацію та підтримує цілісність суглоба як органу. Термін перехідна частина більш вдалий ніж проміжна тому, що він підкреслює не тільки топографічне положення частини між парієтальною та вісцеральною частинами, а і вказує на її функціональне значення [6,8].

По-друге: при опису синовіального шару суглобової капсули необхідно звертати увагу на формування, співвідношення та реактивні зміни його компонентів: волокон, судин мікроциркуляторного русла, клітин і міжклітинної речовини. Для вивчення особливостей розподілу і опису волокон різного типу гістологічні зрізи забарвлюють за Маллорі, за Ван-Гізеном, орсин-новим фуксином, проводять постановку реакції імпрегнації карбонатом срібла за Лейдлоу: волокна колагену I типу забарвлюються в золотисто-коричневий колір, волокна колагену III типу – в чорний. Колаген I типу також можливо виявляти лектингістохімічним методом з використанням лектину білосніжки весняної (LVA) (Патент України) [4].

По-третє: лімфоцити, разом з антигенпрезентуючими клітинами, є одним з головних факторів морфогенезу [2]. Для кількісного і якісного вивчення розподілу лімфоцитів в синовіальному шарі капсули суглоба доцільно використовувати морфометричну

сітку С. Б. Стефанова [11]. Для виявлення натуральних килерних клітин зрізи можливо забарвлювати альціановим синім (критична концентрація $MgCl_2$ 0,6 M) [3]. Для виявлення в синовіальному шарі популяцій лімфоцитів, доцільно проводити дослідження із застосуванням лектинів арахісу, сочевиці і сої (PNA⁺, LCA⁺, SBA⁺) за методикою, описаною в роботах [9]. Обробку зрізів здійснюють кон'югатом лектин пероксидаза хрину протягом 2 годин при кімнатній температурі в темряві після попередньої інактивації ендогенної пероксидази. Контрольні зрізи інкубують у присутності 0,5-1,0 ммоль/л відповідного вуглеводу-інгібітору, виключаючи із схеми обробки препаратів один з компонентів (лектин, діамінобензидин, пероксидазу хрину). Лектингістохімічну реакцію вважають позитивною за наявності бензидинові мітки на поверхні цитоплазматичної мембрани. Морфометричний облік лімфоцитів, що мають на своїй поверхні пігментну бензидинову мітку, – кон'югатів лектину арахісу PNA⁺ ($\gamma\delta$ -Т-лімфоцити і імунологічно незрілі CD8⁺CD4⁺-лімфоцити), сочевиці LCA⁺ (Т-хелпери) [16], і сої SBA⁺ (В-лімфоцити) [19] проводять за допомогою окулярної сітки С. Б. Стефанова [11] на умовній одиниці площі 10000 мкм² при імерсійному збільшенні мікроскопа (об. х 100, ок. х 10).

По-четверте: у синовіальному шарі визначається популяція тучних клітин [20]. Тучні клітини є одним з факторів тканинного гомеостазу [12]. Переважно розташовуючись в сполучній тканині біля судин мікроциркуляторного русла, секретуючи найважливіші фактори ангіогенезу, такі як TGF- β , VEGF/VPF, FGF [17], тучні клітини впливають на тонус і проникність судин, можуть брати участь в будь-якому з етапів ангіогенезу, змінюючи щільність міжклітинної речовини, чинячи вплив на міграцію, проліферацію і диференціювання ендотеліоцитів [13]. Тучні клітини активізують функцію макрофагів, впливають на проліферацію лімфоцитів [12]. Вони постійно продукують, а частково і поглинають з довкілля, депонують і виділяють дві групи біологічно активних речовин регуляторного типу: глікозаміноглікани і біогенні аміни, – і управляють концентрацією цих речовин в міжклітинній речовині [14]. Важливою функціональною особливістю тучних клітин є здатність синтезувати, накопичувати і секретувати ряд біологічно активних речовин, що беруть участь в регуляції міжклітинних взаємодій, сприяючи взаємодії колагену з фібронектином і ламініном. Для аналізу розподілу, кількості та функціонального стану тучних клітин синовіального шару суглобової капсули доцільно забарвлювати гістологічні зрізи альціановим синім за Scott & Dorling [1].

По-п'яте: проліферативна активність – є важливим показником морфо функціонального стану та реактивності будь-якої тканини. Ядерний антиген Ki – 67 є важливим компонентом при формуванні веретена поділу і міцно асоціюється з проліферацією клітин, експресуючись в G₁, S, G₂, M – фазах клітинного циклу, але не в G₀ фазі і може бути використаний для визначення клітин, що діляться. Антиген Ki – 67 – короткоживучий протеїн, що руйнується упродовж 1-1,5 години, завдяки чому Ki – 67 вияв-

ляється тільки в клітинах, які діляться, оскільки не встигає накопичуватися і не залишається в клітинах у стадії інтерфази. Маркер Ki – 67, в цілому, відображає проліферативну активність тканини, не виділяючи певні популяції клітин. Клітини, що знаходяться в стадіях M, S, G₁ і G₂ клітинного циклу доцільно виявляти імуногістохімічним методом за допомогою моноклональних антитіл ki – 67 (LabVision, USA) [5].

По-шосте: статистичну обробку отриманих числових результатів доцільно проводити за допомогою методів варіаційного і кореляційного аналізів. Для перевірки наявності зв'язку між отриманими даними використовувати кореляційний аналіз (коефіцієнт кореляції Пірсона). Достовірність відмінностей між групами оцінювати за методом Стюдента-Фішера для рівня достовірності не менше 95%, що є загальноприйнятим для біологічних і медичних досліджень ($p < 0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення

За допомогою запропонованих методів дослідження був проведений аналіз реактивності капсули колінного суглоба щурів після внутрішньо плідного введення імуноглобуліну.

Дослідження проведені відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Стразбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

У щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну достовірно потовщується покривний синовіальний шар суглобової поверхні хряща упродовж перших десяти днів після народження і з 21-ої по 45-у добу життя, що пов'язано в першому випадку з акселерацією процесів диференціювання суглобового хряща, в цілому, викликаного виходом імунологічно незрілих лімфоцитів з тимуса і заселенням ними перехідної частини [7]. У другому випадку потовщення пов'язане з компенсацією функціональної незрілості екстрацелюлярного матриксу суглобового хряща, що не має можливості забезпечувати адекватну протидію тиску при наростаючому навантаженні [7].

У синовіальному шарі суглобової капсули антигенпреміюваних щурів змінюється функціональна активність фібробластів, впливаючи на рівень синтезу волокон і компонентів екстрацелюлярного матриксу, що проявляється зміною співвідношення між волокнами і екстрацелюлярним матриксом синовіального шару у бік переважання міжклітинної речовини. Змінений характер синтезу волокон синовіального шару колінного суглоба щурів після внутрішньоплідного введення антигену відповідає даним про дезорганізацію волокон в дермі при гіпермобільному синдромі [15]. З 11-ої доби в перехідній частині синовіального шару у антигенпреміюваних щурів вперше на відміну від інтактних та контрольних тварин виявляються орсеїнові еластичні волокна. Потовщується вісцеральна частина суглобової капсули ($11,59 \pm 0,51$ і $9,08 \pm 0,49$ мкм, відповідно). Зменшується як загальна щільність розподілу клітин на умовній одиниці площі в порівнянні

з контролем ($152,28 \pm 2,45$ і $181,17 \pm 2,27$, відповідно), так і абсолютна кількість фібробластів ($72,92 \pm 1,23$ і $97,74 \pm 1,56$, відповідно) і фіброцитів ($37,24 \pm 0,62$ і $48,11 \pm 0,78$, відповідно). Фібробластно-лімфоцитарний коефіцієнт мінімальний в порівнянні інтактними і контрольними тваринами.

У щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну процес волокнуотворення сповільнюється в порівнянні з контрольними і інтактними тваринами, на частку волокон припадає $19,54 \pm 1,07\%$ відносної площі волокнистих шарів. Якісний склад волокон відрізняється від контрольних тварин: волокна під синовіальної основи представлені переважно колагеновими волокнами III типу, в глибокому шарі, який прилягає до фіброзного шару капсули більшою мірою еластичними волокнами на вентральній поверхні капсули колінного суглоба, на дорзальній поверхні – волокна переважно колагенові.

В перехідній частині капсули колінного суглоба щурів визначаються лімфоцити, локалізовані переважно попарно біля кровоносних судин. Упродовж усього періоду спостереження визначається зміна співвідношення між лімфоцитами, фібробластами і фіброцитами. Спостерігається поступове хвилеподібне зменшення вмісту фібробластів на тлі хвилеподібного збільшення абсолютної кількості фіброцитів. У антигенпремійованих щурів амплітуда змін вмісту фібробластів, фіброцитів і щільності розподілу клітин на умовній одиниці площі менше, ніж у інтактних і контрольних щурів. У щурів після внутрішньоплідного введення антигена визначається достовірне в порівнянні з контролем зменшення вмісту фібробластів упродовж 2-х тижнів після народження, абсолютна кількість фіброцитів у новонароджених антигенпремійованих щурів достовірно вище, ніж в контролі, надалі їх вміст хвилеподібно змінюється. Відмінності в показниках вмісту фіброцитів і фібробластів у антигенпремійованих і контрольних щурів практично нівелюються на 120-у добу після народження.

Вміст лімфоцитів динамічно змінюється упродовж 4-х місяців після народження. Серед лімфоцитів виявляються одиничні широкоплазменні лімфоцити, PNA⁺ і LCA⁺ лімфоцити. Найбільша загальна кількість лімфоцитів в контролі і у інтактних щурів визначається на 7-у добу після народження. Вміст LCA⁺ лімфоцитів поступово знижується від моменту народження до кінця четвертого місяця життя. Вміст PNA⁺ лімфоцитів змінюється хвилеподібно, піки визначаються на 7-у і 30-у добу життя. У щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну досто-

вірно збільшується як загальний вміст лімфоцитів, так і PNA⁺ і LCA⁺ лімфоцитів. Відмінності в показниках щільності розподілу PNA⁺ лімфоцитів нівелюються на 120-у добу життя. Вміст LCA⁺ лімфоцитів залишається незначно вище упродовж усього періоду спостереження.

Встановлено, що у новонароджених антигенпремійованих щурів в перехідній частині визначається найбільший вміст як лімфоцитів в цілому, так і PNA⁺ лімфоцитів, що пов'язано з виходом імунологічно незрілих лімфоцитів з тимуса на периферію і заселення ними периферичних лімфоїдних і нелімфоїдних органів [2]. Функціональна активність PNA⁺ лімфоцитів викликає зміну функціонування, дисбаланс формування клітин мікрооточення, синтезу міжклітинної речовини, волокон екстрацелюлярного матриксу, що призводить до порушення морфофункціонального стану органів, в цілому. У потомства щурів після введення гідрокортизону самкам в третьому періоді вагітності в перехідній частині зменшується вміст лімфоцитів в цілому і PNA⁺ – лімфоцитів, зокрема, що пов'язане із загибеллю кортизончутливих лімфоцитів в тимусі.

Проліферативна активність клітин синовіального шару суглобової капсули антиген премійованих щурів зростає у порівнянні з контролем особливо у ранні терміни після народження, що підтверджується збільшенням вмісту кі-67+ клітин.

Динамічна зміна абсолютної кількості тучних клітин у тканині синовіального шару колінного суглоба щурів упродовж чотирьох місяців після народження свідчить про високий рівень лабільності популяції. У щурів після внутрішньоплідного введення імуноглобуліну упродовж чотирьох місяців після народження визначається збільшення вмісту тучних клітин в синовіальному шарі капсули колінного суглоба в порівнянні з контролем.

Висновок. Таким чином, запропонований алгоритм вивчення реактивності капсули суглобу на прикладі моделі внутрішньо плідного введення антигену щурам дозволяє отримати цілісну якісну картину майже усіх змін, які відбуваються у процесі реактивності капсули суглобу у відповідь на вплив будь-якого екзо- або ендогенного чинника.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується доведення обґрунтування вибору методу лектинової гістохімії (зі зазначенням панелі лектинів рослинного походження) для вивчення реактивності сполучної тканини на прикладі експериментальної моделі синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини.

Література

1. Авцын А. П. Принципы и методы гистохимического анализа в патологии / А. П. Авцын, А. И. Струков, Б. Б. Фукс. – Л. : Медицина, 1971. – 368 с.
2. Внутритробная антигенная стимуляция как модель для изучения симптомокомплекса висцеромегалии / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева, М. С. Щербakov [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Т.9, № 4. – С. 57-59.
3. Волосовець О. П. Цитоморфометрична оцінка лімфоцитів периферичної крові у дітей з алергічним ринітом / О. П. Волосовець, М. А. Волошин, С. В. Насіковська // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2002. – Вип. 2(4), Т. (2). – С. 86-89.
4. Волошин М. А. Спосіб виявлення волокон колагену I типу у лабораторних тварин в гістологічних зрізах / М. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Патент на корисну модель № 39538 G01N21/00 25.02.2009. Бюл. № 4.

5. Волошин Н. А. Особенности пролиферативной активности хондроцитов суставного хряща крыс в раннем постнатальном периоде / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Галицкий лікарський вісник. – 2010. – Т. 17, № 2 (ч. 2). – С. 39-41.
6. Волошин Н. А. Суставная поверхность: противоречия, факты, гипотезы / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Морфологічний стан тканин і органів систем організму в нормі та патології: науково-практична конференція: матеріали. – Тернопіль : Укр-медкнига, 2009. – С. 26 – 28.
7. 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.
8. Волошин Н. А. Строение сустава как органа: новый взгляд на проблему ткани / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. – 2010. – Т. 146, часть V. – С. 54-58.
9. Луцки А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцкий, Е. С. Детюк, М. Д. Луцкий. – Львов : Вища школа, 1989. – 140с.
10. Павлова В. Н. Синовиальная среда суставов / В. Н. Павлова. – М.: Медицина, 1980. – 295 с.
11. Стефанов С. Б. Ускоренный способ количественного сравнения морфологических признаков / С. Б. Стефанов, Н. С. Кухоренко. – Благовещенск, 1988. – 29 с.
12. Юрина Н. А. Морфо-функциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани / Н. А. Юрина, А.И. Радостина // М.: Изд-во УДН, 1990. – 322 с.
13. Azizkhan R. G. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro / R. G. Azizkhan, J. C. Azizkhan, B.R.Zetter // J.Exp.Med. – 1980. -Vol. 152. – P. 931-944.
14. Blair R. J. Human mast cells stimulate vascular tube formation / Robin J. Blair, Hong Meng, Mary J. Marchese // Journal of clinical investigations. – 1997. - Vol. 99, N 11. – P. 2691-2700.
15. Kobayasi T. Dermal elastic fibres in the inherited hypermobile disorders / T. Kobayasi // J. Dermatol. Sci. – 2006. – Vol. 41(3). – P.175-85.
16. Nakano T. Induction and separation of mouse helper – T-cells by lectins / T. Nakano, Y. Oguchi, Y. Imai // Immunology. – 1980. - V.40, N 2. - P. 217-222.
17. Qu Z. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma / Z. Qu, J.M. Leibler, M. R. Powers // Am. J. Pathol. – 1995. – Vol. 147. – P.564-573.
18. Ralphs J. R. The joint Capsule: structure, Composition, Ageing and disease / J. R. Ralphs & M. Benjamin // J. Anat. – 1994. – №184. – P. 503-509.
19. Reisner Y. Separation of antibody helper and antibody suppressor human T cells by using soybean agglutinin / Y. Reisner, J. W.Chiao, N. Sharon // J. Natl. Acad. Sci USA. – 1980. -Vol. 77(11). – P. 6778-6782.
20. Shina K. Lymphocyte-independent connective tissue mast cells populate murine synovium / K. Shina, M. Gurisha, D. Frienda // Arthritis & Rheumatism. – 2006. – Vol. 54. – P. 2863 – 2871.

УДК: 616.72-018-092.9

МЕТОДИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВИВЧЕННЯ РЕАКТИВНОСТІ КАПСУЛИ СУГЛОБА

Григор'єва О. А.

Резюме. В роботі надано алгоритм гістологічного вивчення морфогенезу і реактивності капсули суглобу, який дозволяє визначити ступень реактивності всіх компонентів суглобової капсули. Запропонований алгоритм супроводжується результатами вивчення реактивності капсули суглоба в експериментальних умовах (внутрішньо плідне введення антигену).

Ключові слова: капсула суглоба, реактивність, синовіальний слой, судини мікроциркуляторного русла, лімфоцити.

УДК: 616.72-018-092.9

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ РЕАКТИВНОСТИ КАПСУЛЫ СУСТАВА

Григорьева Е. А.

Резюме. В работе приводится обоснованный алгоритм гистологического исследования морфогенеза и реактивности суставной капсулы, позволяющий оценить степень реактивности всех компонентов капсулы сустава. Предложенный алгоритм сопровождается результатами изучения реактивности капсулы сустава в эксперименте на лабораторных животных (внутриплодное введение антигена).

Ключевые слова: капсула сустава, реактивность, синовиальный слой, сосуды микроциркуляторного русла, лимфоциты.

UDC: 616.72-018-092.9

METHODOICAL PECULIARITIES OF JOINT CAPSULE REACTIVITY INVESTIGATION

Grygorieva O. A.

Abstract. Articular capsule is an important integral part of the joint, it provides maintenance of joint integrity. Different capsule's impairments lead to the development of joint diseases, which may cause disability and even patient's invalidation especially if we discuss impairment of a hip or a knee joint.

The great number of works is devoted to the morphological researches of joint capsule in adult patients with joint diseases. The investigation of joint capsule in newborns that were undergone different harmful influences during intranatal period are worth carrying out in order to define a morphological background of different joint diseases.

Nowadays, the exact algorithm of joint capsule reactivity investigation is absent. That is why different unclear spots remain; that complicates the understanding of the problem by specialists of different areas (clinical investigators and laboratory (morphological) researchers).

МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

The purpose of the work is to define and substantiate methods of morphological investigation of a joint capsule reactivity.

Methods. In the first place, while conducting histological investigation it is necessary to determine common histological terms of different layers and parts of articular capsule according to the modern anatomical and histological nomenclatures. It is proposed to define fibrous and synovial layers of joint capsule, visceral, parietal and intermediate parts of synovial layer. In the second place, while discussing the process of capsule's reactivity it is necessary to define interaction between its compounds: microcirculatory vessels, fibers, cells and extracellular matrix. For this purpose it is possible to use Mallory, Van Hysen reactions, impregnation of histological samples with argentum carbonate or nitrate, etc.

In the third place, it is obvious analysis of lymphocytes and dendritic cells population.

In the fourth place – the analysis of mast cells population.

In the fifth place – the analysis of proliferative activity.

And after all, it is perfectly necessary to use modern adequate statistical analysis.

Results. The reactivity of newborns' knee joint capsule after intranatal antigen injection was investigated in the work with the help of proposed algorithm. The analysis of obtained data gave total integral illustration of joint capsule morphogenesis and reactivity after intranatal antigen injection.

Keywords: joint capsule, reactivity, synovial layer, microcirculatory vessels, lymphocytes.

Рецензент – доц. Пелипенко О. В.

Стаття надійшла 07.10.2015 р.