

М.А.Волошин
Ю.Ю.Абросімов

Запорізький державний
медичний університет

Ключові слова: меніск, колінний суглоб, щури, внутрішньоплідне введення антигену, недиференційована дисплазія сполучної тканини.

Надійшла: 28.08.2016
Прийнята: 10.09.2016

УДК 611.728.3-018.3-018.1+[616-097.1:611-053.13]-053.35:599.323.4

ОСОБЛИВОСТІ СПІВВІДНОШЕННЯ КЛІТИН ТА МІЖКЛІТИННОЇ РЕЧОВИНИ У МЕНІСКАХ ЩУРІВ ПРИ СТАНОВЛЕННІ РУХОВОЇ АКТИВНОСТІ ПРОТЯГОМ ПЕРШИХ ДВОХ ТИЖНІВ ПОСТНАТАЛЬНОГО ЖИТТЯ В НОРМІ ТА ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОПЛІДНОГО ВВЕДЕННЯ АНТИГЕНУ

Робота є фрагментом НДР «Реактивність органів новонароджених після дії антигенів та факторів різної природи у внутрішньоутробному періоді» (2013-2018, номер державної реєстрації 0115U003875).

Реферат. В роботі досліджено особливості динаміки співвідношення клітин та міжклітинної речовини в структурі менісків колінного суглоба щурів в нормі та після внутрішньоплідного введення антигену з 1-ої до 14-ої доби життя. Встановлено, що пренатальна дія антигенів призводить до порушення темпів та термінів морфогенезу при становленні рухової активності, що проявляється змінами у співвідношенні клітин та матриксу порівняно з нормою.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 81-85.

© М.А.Волошин, Ю.Ю.Абросімов, 2016

✉ abrosimov1387@mail.ru

Voloshyn M.A., Abrosimov Yu.Yu. Features of cells and extracellular matrix ratio in rat meniscus for motor activity formation during the first two weeks of postnatal life in norm and after intrafetal antigen injection.

ABSTRACT. Background. Diseases of the musculoskeletal system and connective tissue are included in the most common among school-age children. Undifferentiated connective tissue dysplasia syndrome is the morphologic basis for their progress. 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 menisci of rat knee joint in norm and after intrafetal antigen injection from the 1st to the 14th day of life. **Methods.** 80 white laboratory rats were studied. 30 rats were intact. 30 rats underwent transuterine, transmembranous, intrafetal injection of liquid purified staphylococcal anatoxin (10-14 binding units in 1 ml, tenfold diluted, 0.05 ml) on the 18th day of prenatal period according to the method of M.A. Voloshyn. 20 rats after injection of saline solution served as control. Paraffin sections of left knee joint were made and stained with alcian blue (pH 2,6, MgCl₂ critical concentration 0,2 M). In the sections the relative area of cells and matrix in the inner and outer zones of medial and lateral meniscus were measured. Zones were divided according to their cells types: fibroblast-like cells in the outer zone and chondrocyte-like cells in the inner one. Results were considered significant at $p < 0.05$. The differences between the averages were evaluated using Student's t-test. **Results.** On the 1st day of experiment in both zones of the medial meniscus the relative area of cells increases as compared to the norm. During two weeks it decreases, except for the day 11th when it is significantly more in the outer zone. In the inner zone of the lateral meniscus cells relative area is less on the 11th day of the experiment, but more on the 1st and 14th. During the 1st week of postnatal life in the experiment the amount of extracellular matrix in the outer zone is significantly higher than in norm, and later, during the second week, it was not significantly different. **Conclusion.** It was established that the prenatal action of antigens leads to the disorder of the rate and terms of morphogenesis during the formation of motor activity, which is manifested by the changes in the ratio of cells and matrix as compared to the norm.

Key words: meniscus, knee joint, rats, intrauterine injection of antigen, undifferentiated connective tissue dysplasia.

Citation:

Voloshyn MA, Abrosimov YuYu. [Features of cells and extracellular matrix ratio in rat meniscus for motor activity formation during the first two weeks of postnatal life in norm and after intrafetal antigen injection]. *Morphologia.* 2016;10(3):81-5. Ukrainian.

Вступ

За сучасними статистичними даними, захворювання кістково-м'язової системи та сполучної

тканини входять до найбільш поширених серед дітей шкільного віку [1]. Морфологічною основою для прогресу багатьох з них є досить поши-

рений стан, що має назву синдром недиференційованої дисплазії сполучної тканини [2]. Реактивні зміни у структурі меніска колінного суглоба при НДСТ на сьогодні є не достатньо вивченими. Численні дослідження колективу кафедри анатомії людини Запорізького державного медичного університету протягом останніх десятиріч довели, що внутрішньооплідна антигенна стимуляція у білих лабораторних щурів здатна моделювати синдром НДСТ[3-6].

Мета дослідження: Встановити особливості динаміки співвідношення клітин та міжклітинної речовини в структурі менісків колінного суглоба щурів в нормі та після внутрішньооплідного введення антигену з 1-ої до 14-ої доби життя.

Матеріали та методи

В роботі досліджено 80 білих лабораторних щурів з 1-ої по 14-ту добу постнатального життя. I група – 30 інтактних щурів (INT). II група – 30 експериментальних щурів (SA), яким на 18 добу внутрішньоутробного періоду було введено кризьматочно, кризьоболонково, внутрішньооплідно 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. 20 щурів III групи після введення фізіологічного розчину слугували контролем. Потомство народжувалося на 22-24-ту добу внутрішньоутробного періоду. Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 5-ту, 7-му, 11-ту та 14-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» (Закон від 21.02.2006 № 3447-IV, редакція від 09.12.2015, підстава 766-19). 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 Глаголева (зб. х 700). У зрізах досліджували відносну площину, що займають клітини та міжклітинна речовина в медіальному та латеральному менісках. Площу зрізу меніска умовно поділяли на фенотип клітин та структурну організацію матриксу [7]. Клітини зовнішньої зони меніска мають видовжену овальну або ве-

ретеніформну форму та фібробластоподібний фенотип (fibroblast-like cells), занурені у волокнисту міжклітинну речовину. Також в цій зоні клітинна популяція представлена лімфоцитами, макрофагами, ендотеліоцитами. Клітини внутрішнього відділу (fibrochondrocytes) мають фенотип, подібний до хондроцитів, мають округлу форму, оточені матриксом за типом гіалінового хряща [8].

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

Результати та їх обговорення

Числові дані дослідження надані у табл. 1. Достовірних відмінностей між показниками інтактної та контрольної груп виявлено не було.

Протягом всіх термінів спостереження у всіх зонах всіх груп відносна площина, зайнята міжклітинною речовиною, переважає площину, що зайнята клітинним компонентом.

На 1-шу добу у медіальному меніску відсоток площі, що зайнята клітинами, у антигенпремійованих тварин достовірно перевищує аналогічний показник у нормі у внутрішній ($38,89 \pm 1,82\%$ та $30,14 \pm 1,71\%$) та зовнішній зонах ($42,64 \pm 1,84\%$ та $25,28 \pm 1,62\%$, відповідно). Достовірна відмінність спостерігається і в латеральному меніску. Клітинний компонент в експерименті займає більшу частину порівняно з інтактною групою у внутрішній зоні ($35,69 \pm 1,79\%$ та $28,19 \pm 1,68\%$, відповідно) та меншу у зовнішній ($28,89 \pm 1,69\%$ та $45,0 \pm 1,85\%$, відповідно).

На 5-ту добу в інтактній та контрольній групах щурів відбувається зміщення клітинно-матриксного співвідношення у бік площі, що зайнята клітинами в обох зонах медіального меніска та у внутрішній зоні латерального. У зовнішній зоні латерального меніска співвідношення майже не змінюється, порівняно з попереднім строком спостереження. Натомість, у експериментальній групі має місце збільшення відсотку площі матриксного компоненту та зменшення клітинного порівняно з попереднім строком та з інтактною групою, достовірно у медіальному меніску (площа клітин у експериментальній та інтактній групі, відповідно – $31,53 \pm 1,73\%$ та $41,67 \pm 1,84\%$ у внутрішній зоні; $33,33 \pm 1,76\%$ та $45,0 \pm 1,85\%$ у зовнішній зоні). У внутрішній зоні латерального меніска достовірних відмінностей між групами не зафіксовано. У зовнішній зоні латерального меніска суттєвих змін порівняно з 1-ою добою у нормі не відбувається, а в експериментальній групі збільшується відсоток площі клітин. Але зберігається характерна для попереднього строку спостереження різниця у бік зменшення цього показника в експерименті ($36,39 \pm 1,79\%$) порівняно з інтактною групою ($43,33 \pm 1,85\%$).

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

Доба життя	Група тварин	Медіальний меніск				Латеральний меніск			
		Внутрішня зона		Зовнішня зона		Внутрішня зона		Зовнішня зона	
		Клітини	Мат-рикс	Клітини	Мат-рикс	Клітини	Мат-рикс	Клітини	Мат-рикс
1	Int (n=6)	30,14 ± 1,71	69,86 ± 1,71	25,28 ± 1,62	74,72 ± 1,62	28,19 ± 1,68	71,81 ± 1,68	45,0 ± 1,85	55,0 ± 1,85
	K (N=4)	32,36 ± 1,74	67,64 ± 1,74	29,31 ± 1,70	70,69 ± 1,70	30,69 ± 1,72	69,31 ± 1,72	43,06 ± 1,85	56,94 ± 1,85
	SA (n=6)	38,89 ± 1,82*	61,11 ± 1,82*	42,64 ± 1,84*	57,36 ± 1,84*	35,69 ± 1,79*	64,31 ± 1,79*	28,89 ± 1,69*	71,11 ± 1,69*
5	Int (n=6)	41,67 ± 1,84	58,33 ± 1,84	45,0 ± 1,85	55,0 ± 1,85	38,06 ± 1,81	61,94 ± 1,81	43,33 ± 1,85	56,67 ± 1,85
	K (N=4)	39,86 ± 1,82	60,14 ± 1,82	43,33 ± 1,85	56,67 ± 1,85	36,81 ± 1,80	63,19 ± 1,80	43,33 ± 1,85	56,67 ± 1,85
	SA (n=6)	31,53 ± 1,73*	68,47 ± 1,73*	33,33 ± 1,76*	66,67 ± 1,76*	33,33 ± 1,76	66,67 ± 1,76	36,39 ± 1,79*	63,61 ± 1,79*
7	Int (n=6)	34,72 ± 1,77	65,28 ± 1,77	31,11 ± 1,73	68,89 ± 1,73	28,19 ± 1,68	71,81 ± 1,68	37,64 ± 1,81	62,36 ± 1,81
	K (N=4)	38,19 ± 1,81	61,81 ± 1,81	30,56 ± 1,72	69,44 ± 1,72	29,03 ± 1,69	70,97 ± 1,69	39,72 ± 1,82	60,28 ± 1,82
	SA (n=6)	26,39 ± 1,64*	73,61 ± 1,64*	27,22 ± 1,66	72,78 ± 1,66	32,56 ± 1,75	67,44 ± 1,75	21,67 ± 1,54*	78,33 ± 1,54*
11	Int (n=6)	33,33 ± 1,76	66,67 ± 1,76	18,33 ± 1,44	81,67 ± 1,44	42,08 ± 1,84	57,92 ± 1,84	35,0 ± 1,78	65,0 ± 1,78
	K (N=4)	32,36 ± 1,74	67,64 ± 1,74	22,50 ± 1,56	77,50 ± 1,56	37,08 ± 1,80	62,92 ± 1,80	32,22 ± 1,74	67,78 ± 1,74
	SA (n=6)	27,36 ± 1,66*	72,64 ± 1,66*	29,31 ± 1,70*	70,69 ± 1,70*	21,53 ± 1,53*	78,47 ± 1,53*	30,28 ± 1,71	69,72 ± 1,71
14	Int (n=6)	40,28 ± 1,83	59,72 ± 1,83	36,67 ± 1,80	63,33 ± 1,80	33,33 ± 1,76	66,67 ± 1,76	33,33 ± 1,76	66,67 ± 1,76
	K (N=4)	39,31 ± 1,82	60,69 ± 1,82	37,08 ± 1,80	62,92 ± 1,80	35,28 ± 1,78	64,72 ± 1,78	32,50 ± 1,75	67,50 ± 1,75
	SA (n=6)	35,42 ± 1,78	64,58 ± 1,78	31,67 ± 1,73*	68,33 ± 1,73*	41,94 ± 1,84*	58,06 ± 1,84*	36,94 ± 1,80	63,06 ± 1,80

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 ($p < 0,05$).

На 7-му добу в усіх зонах обох менісків у всіх групах зафіксовано зменшення співвідношення площі клітин та матриксу у бік останнього. Також зберігається достовірне зменшення відносної площі, що зайнята клітинами у антигенпреміюваних щурів порівняно з нормою у внутрішній зоні медіального меніска ($26,39 \pm 1,64\%$ та $34,72 \pm 1,77\%$) та зовнішній латерального ($21,67 \pm 1,54\%$ та $37,64 \pm 1,81\%$, відповідно).

На 11-ту добу у внутрішній зоні медіального меніска площа, що зайнята клітинами, достовірно менше в експерименті порівняно з нормою ($27,36 \pm 1,66\%$ та $33,33 \pm 1,76\%$, відповідно). Для зовнішньої зони, навпаки, цей показник є біль-

шим у антигенпреміюваних тварин порівняно з інтактними ($29,31 \pm 1,70\%$ та $18,33 \pm 1,44\%$, відповідно). У внутрішній зоні латерального меніска спостережені зміни аналогічні до медіального – площа, що зайнята клітинами, є достовірно меншою в експерименті порівняно з нормою ($21,53 \pm 1,53\%$ та $42,08 \pm 1,84\%$, відповідно). Достовірної різниці між показниками для зовнішньої зони цього меніска немає.

На 14-ту добу у медіальному меніску всіх досліджуваних груп тварин відмічається зсув співвідношення у бік клітин. На цьому фоні достовірно меншою стає відносна площа, що зайнята клітинами у зовнішній зоні в експерименті

(31,67±1,73% проти 36,67±1,80 в інтактних щурів). Натомість, у внутрішній зоні латерального меніска в нормі відбувається зсув у бік площі матриксу на фоні збільшення площі клітин в експерименті, яка стає більшою, ніж в інтактній групі (41,94±1,84% та 33,33±1,76, відповідно). Достовірних відмінностей у показниках зовнішньої зони латерального меніска не виявлено.

Зміни у руховій активності щурів є відправною точкою для морфогенезу менісків як структурного елементу колінного суглоба [9]. На 1-шу добу рухи є обмеженими, протягом першого тижня виникають спроби до повзання, 11-та доба – спроби до повзання без повноцінної опорної функції кінцівок, 14-та доба – повзання. Паралельно з цим відбувається приріст маси тіла. Тобто протягом перших двох тижнів відбуваються значні зміни як кількісної, так і якісної функціональної активності кінцівок та, у свою чергу, менісків як невід’ємної біомеханічної ланки колінного суглоба. Вищевказане можна відслідкувати у тенденціях, що були описані. Зміни у досліджуваних показниках вказують на наступні особливості формування менісків у нормі: для медіального меніска в обох зонах до 5-ої доби відмічається зсув у бік клітин, з 5-ої по 11-ту – у бік матриксу, на 14-ту добу – знову у бік клітин. На цьому фоні в експерименті на 1-шу добу в обох зонах відсоток клітин є більшим, ніж у нормі. Надалі, протягом наступних двох тижнів у внутрішній зоні відносна площа, зайнята клітинами є меншою, а відсоток матриксного компоненту більшим. У зовнішній зоні тенденція аналогічна, за винятком 11-ї доби, коли відносна площа клітин є більшою.

Для внутрішньої зони латерального меніска характерні два «піки» у відносній площі, що займають клітини – на 5-ту та на 11-ту добу. Також на 11-ту добу цей показник в експерименті є достовірно меншим. І навпаки, на 1-шу та 14-ту добу відносна площа, зайнята клітинами меніска є достовірно більшою ніж в нормі. Для зовнішньої зони латерального меніска в інтактній та контрольних групах спостерігається поступове зміщення співвідношення між клітинами та матриксом в бік останнього, що не співпадає з тенденцією в експериментальних тварин, де відмічається зворотний процес. Але слід зазначити, що кількість міжклітинної речовини в експерименті є достовірно більшою, ніж в нормі протягом першого тижня постнатального життя, а надалі, протягом другого, достовірно не відрізняється.

Отримані дані вказують на формування еле-

ментів синдрому НДСТ. Крім того, вони узгоджуються з даними, отриманими О.А. Григор’євою [3] та А.В. Федотченком [4], що вкладаються в рамки концепції проф. М.А. Волошина «лімфоцит – фактор морфогенезу» [5; 6]. Підґрунтям для вищезгаданих процесів є наслідки внутрішньоутробної антигенної стимуляції у вигляді передчасного заселення імунологічно незрілими лімфоцитами периферійних органів та зміни співвідношення між ними та структурними елементами тканини, що їх оточує [3-6]. Внаслідок цього змінюються процеси морфогенезу меніска, зокрема клітинно-матриксне співвідношення, через вплив на процеси синтезу та деградації міжклітинної речовини, а також спотворення її якості. Це може призводити до її неповноцінної функції та невідповідної реакції на переміни характеру та обсягу навантажень.

Встановлені зміни доповнюють та пояснюють отримані нами раніше дані про товщину меніска щурів у постнатальному періоді після внутрішньоплідного введення антигенів та співвідношення між клітинами та матриксом протягом періоду з 21-ої по 90-ту добу постнатального життя [10; 11].

Висновки

Таким чином, встановлено, що внутрішньоплідне введення антигену призводить до порушення темпів та термінів морфогенезу при становленні рухової активності, що проявляється змінами у співвідношенні клітин та матриксу порівняно з нормою. В медіальному меніску в експерименті на 1-шу добу в обох зонах спостерігається збільшення відносної площі клітин порівняно з нормою, та надалі, протягом наступних двох тижнів – зменшення, за винятком 11-ї доби у зовнішній зоні, коли відносна площа клітин є достовірно більшою. Для внутрішньої зони латерального меніска відносна площа, що займають клітини менше в експерименті на 11-ту добу, але більша на 1-шу та 14-ту. Для зовнішньої зони кількість міжклітинної речовини в експерименті є достовірно більшою, ніж в нормі протягом першого тижня постнатального життя, а надалі, протягом другого, достовірно не відрізняється.

Перспективи подальших розробок

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

Літературні джерела References

1. Nyankovsky SL, Yatsula MS, Chykailo MI, Pasechnyuk IV. [Health status of schoolchildren in

Ukraine]. Child's Health. 2012; (5):137-41. Ukrainian.

2. Nesterenko ZV. [Connective tissue dysplasia – medical and social phenomenon of the XXI century]. *Bol Sustavy Pozvonochnik*. 2012;(1):17-23. Russian.
3. Grygorieva OA, Voloshyn MA. [Experimental model of undifferentiated dysplasia of connective tissue syndrome on the background of changing antigen homeostasis in system mother-placenta-fetus]. *Pathologia*. 2011;8(2):39–42. Ukrainian.
4. Fedotchenko AV. [Features of joint capsule formation after antenatal action of antigen]. *Bol Sustavy Pozvonochnik*. 2014;(4):79-86. Ukrainian.
5. Voloshyn NA. [Lymphocyte – factor of morphogenesis]. *Zaporozhye Medical Journal*. 2005;2:122. Russian.
6. Voloshyn MA, Grygorieva OA, Kushch OG, Vovchenko MB, Chugin SV, Svitlytskiy AO, Matveyshina TM, Lebedinets OM, Fedotchenko AV, Shcherbakov MS. [Lymphocyte – factor of organs morphogenesis]. In: [Morphological studies – challenges of today; 2015 April 23-24; Sumy, Ukraine]. Sumy State University; 2008. pp. 5-6. Ukrainian.
7. Sanchez-Adams J, Athanasiou KA. The knee meniscus: a complex tissue of diverse cells. *Cel Mol Bioeng*. 2009;2(3):332-40. doi:10.1007/s12195-009-0066-6.
8. Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: structure–function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials*. 2011;32(30):7411–31. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.037.
9. Roddy KA, Prendergast PJ, Murphy P. Mechanical influences on morphogenesis of the knee joint revealed through morphological, molecular and computational analysis of immobilised embryos. *PLoS One*. 2011 Feb 28;6(2):e17526. doi: 10.1371/journal.pone.0017526.
10. Abrosimov YuYu. [Dynamics of meniscus thickness of rat knee joint in the norm and after intrauterine antigen injection]. *Clinical Anatomy and Operative Surgery*. 2016;15(1):20-3. Ukrainian.
11. Voloshyn MA, Abrosimov YuYu. [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]. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*. 2016;(2, Pt 2):22-6. Ukrainian.

Волошин Н.А., Абросимов Ю.Ю. Особенности соотношения клеток и межклеточного вещества в менисках крыс при становлении двигательной активности в течение первых двух недель постнатальной жизни в норме и после внутриплодного введения антигена.

Реферат. В работе исследованы особенности динамики соотношения клеток и межклеточного вещества в структуре менисков коленного сустава крыс в норме и после внутриплодного введения антигена с 1-х до 14-х суток жизни. Установлено, что пренатальное действие антигенов приводит к нарушению темпов и сроков морфогенеза при становлении двигательной активности, что проявляется изменениями в соотношении клеток и матрикса по сравнению с нормой.

Ключевые слова: мениск, коленный сустав, крысы, внутриплодное введение антигена, недифференцированная дисплазия соединительной ткани.