

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ФИБРОЗНОГО КОЛЬЦА МЕЖПОЗВОНКОВЫХ ДИСКОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Игорь Павлович ЖУРАКОВСКИЙ, Сергей Алексеевич АРХИПОВ,
Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА, Ирина Александровна ГОЛУБЕВА,
Игорь Олегович МАРИНКИН, Павел Александрович ЕЛЯСИН

ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Цель исследования – изучить изменения внеклеточного матрикса фиброзного кольца межпозвонковых дисков при моделировании стафилококковой инфекции. Исследованы 18 крыс-самцов Wistar с остеомиелитом большеберцовой кости и 6 контрольных животных, гистохимия и иммуногистохимия с автоматическим анализом изображения волокнистого хряща через 1, 2 и 3 месяца после развития остеомиелита. Выявлена перестройка внеклеточного матрикса фиброзного кольца при длительной стафилококковой инфекции, что является отражением происходящих дегенеративных изменений в межпозвонковых дисках.

Ключевые слова: межпозвонковый диск, фиброзное кольцо, *Staphylococcus aureus*, экстрацеллюлярный матрикс, гистохимия, иммуногистохимия.

Стафилококковая инфекция на протяжении более 50 лет является одной из наиболее важных проблем медицинской науки. Метициллин-устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus* служат одной из основных причин заболеваемости и смертности во многих странах мира [3, 5]. Выраженным проявлениям инфекционного процесса, вызванного стафилококками, уделяется пристальное внимание. Вместе с тем, хотя минорные проявления взаимодействия макро- и микроорганизмов не менее значимы, они еще недостаточно изучены. Длительное существование фокальной персистирующей инфекции вызывает определенное изменение функционирования основных гомеостатических систем и, как следствие, структурную перестройку органов и тканей. Важно отметить, что патологические изменения в межпозвонковых дисках могут служить одним из проявлений синдрома дистрофически-дегенеративных изменений мезенхимальных производных при локальном хроническом воспалительном процессе [1]. При этом в качестве фактора, инициирующего и поддерживающего развитие дистрофически-дегенеративных изменений в

межпозвонковых дисках, отмечают отдельные провоспалительные цитокины [7; 8]. Вместе с тем вопрос о роли бактериальной инфекции, при которой неизбежно возникают нарушения баланса противо- и провоспалительных цитокинов, в этиопатогенезе поражения волокнистого хряща остается дискуссионным.

Особого внимания при формировании дистрофически-дегенеративных изменений межпозвонковых дисков заслуживает проблема изменения компонентов внеклеточного матрикса, а следовательно, и условий транспортировки водных растворов в межклеточном веществе при различных патологических процессах, в том числе и при фокальной персистирующей инфекции. Это обусловлено тем, что данный аспект проблемы связан с дальнейшей разработкой учения о гомеостазе, а именно: насколько прочны механизмы, лежащие в его основе, как долго они могут выдерживать высокие нагрузки при длительных патогенных воздействиях. Необходимость интенсивных разработок в этой области диктуется прежде всего тем, что она теснейшим образом связана и в значительной мере определяет решение

Жураковский И.П. – к.м.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ, e-mail: murash2003@yandex.ru

Архипов С.А. – д.б.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ

Пустоветова М.Г. – д.м.н., проф., зав. ЦНИЛ

Голубева И.А. – д.м.н., проф. кафедры анатомии

Маринкин И.О. – д.м.н., проф., ректор

Елясин П.А. – к.м.н., доцент кафедры анатомии

таких важных проблем клинической медицины, как компенсация нарушенных функций и выздоровление.

Цель работы – выявить гистохимические и иммуногистохимические изменения внеклеточного матрикса межпозвонковых дисков в условиях моделирования стафилококковой инфекции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 24 половозрелых крысах-самцах Вистар с массой тела 180–220 г. У 18 животных под общим ингаляционным наркозом выполнена трепанация большеберцовой кости с последующим тампонирующим отверстием хлопчатобумажной нитью, находившейся 30 минут в смыве суточной культуры *S. aureus* (штамм 209). Предварительное исследование позволило установить, что при подобной обработке нити на ней содержится 1×10^7 колониеобразующих единиц. В последующем у всех прооперированных крыс развивался остеомиелит большеберцовой кости, что подтверждалось результатами морфологического исследования [10]. Животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом через 1, 2 и 3 мес с момента воспроизведения модели. В качестве контроля использовали 6 интактных животных. Эксперимент выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей.

Для исключения влияния неоптимального двигательного стереотипа, развивавшегося вследствие травмирования большеберцовой кости и формирования остеомиелита, исследованию подвергались межпозвонковые диски хвостового отдела позвоночника, которые фиксировали в 12 % формалине и жидкости Теллесницкого. Во избежание деформации и повреждения фиброзных колец межпозвонковых дисков удаление одного из тел позвонков выполнялось во время проводки по батарее спиртов с возрастающей концентрацией перед помещением объекта в абсолютный спирт. Тело другого позвонка сохранялось. В дальнейшем материал заливался в парафин по общепринятой методике. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином; коллагеновые волокна выявляли пикрофуксином по ван Гизону, сульфатированные гликозаминогликаны – альциановым синим (рН 1,0), нейтральные гликопротеины – с помощью PAS-реакции по McManus.

Для уточнения характера изменений внеклеточного матрикса межпозвонковых дисков

использовали двухэтапный иммуногистохимический метод с первичными антителами, производимыми компанией Santa Cruz: к коллагену I (goat polyclonal – IgG, титр 1:100; COL1A1 (D-13): sc-25974, Lot #CO712), коллагену II (mouse monoclonal – IgG2b, титр 1:50; COL2A1 (M2193): sc-52658, Lot #B2312), фибронектину (mouse monoclonal – IgG1, титр 1:100; Fibronectin (IST-9): sc-59826, Lot #L1510), фибулину 2 (rabbit polyclonal – IgG, титр 1:100; Fibulin-2 (H-250): sc-30176, Lot #HO111), матрилину 2 (rabbit polyclonal – IgG, титр 1:100; Matrilin-2 (H-65): sc-66959, Lot #AO108). При использовании в работе козьих первичных антител применяли систему визуализации «ABC Staining System» (Santa Cruz: sc-2023, Lot #E2212), включающей в свой состав антикозьи ослиные биотинилированные антитела, согласно прилагаемому к набору протоколу иммуногистохимической окраски. При использовании в работе мышиных и кроличьих первичных антител применяли систему визуализации «Novocastra (250)» (Leica: RE7110-K, Lot #6005382), включающей в свой состав смесь антимишинных и антикроличьих лошадиных биотинилированных антител, согласно прилагаемому к набору протоколу иммуногистохимической окраски. При проведении всех иммуногистохимических реакций проводили «отрицательные контроли», заменяя инкубацию с первичными антителами на инкубацию с неиммунными сыворотками соответствующих животных. Все результаты реакций соответствующих «отрицательных контролей» были отрицательными.

В фиброзных кольцах межпозвонковых дисков условно выделяли три зоны: наружную (в пределах 3–4 наружных пластин), внутреннюю (3–4 пластины, примыкающие к пульпозному ядру) и промежуточную или центральную (располагающуюся между двумя предыдущими). С использованием системы анализа изображений на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13c (Baumer Optronic GmbH, Германия) и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США) определяли площадь положительно окрашенных участков для каждого изучаемого компонента внеклеточного матрикса, интенсивность окрашивания и их тинкториальные свойства. Дополнительно рассчитывали относительную площадь и относительное содержание изучаемых компонентов внеклеточного матрикса. Для экспериментальных и контрольной групп оценивали по 48 изображений промежуточной зоны фиброзного кольца для каждого типа окрашивания, площадь одного изображения составляла 21455 мкм².

При выполнении статистического анализа полученных данных вычисляли среднее арифметическое значение (M) и его ошибку (m), результаты представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Крускала – Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна – Уитни, статистически значимыми считали значения при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистохимическом исследовании через 1 мес. после инокуляции *S. aureus* в наружных пластинах фиброзного кольца межпозвонковых дисков определялись участки межклеточного вещества со сниженным количеством сульфатированных гликозаминогликанов. В этих случаях при окраске альциановым синим при pH 1,0 с последующей докраской ядер кармалюмом Майера сульфатированные гликозаминогликаны выявлялись в непосредственной близости от хондробластов. По мере отдаления от клеточных элементов наблюдалось прогрессирующее снижение интенсивности бирюзовой окраски и появление сродства межклеточного матрикса к дающему розовое окрашивание кармалюму Майера.

Результаты морфометрического анализа показателей, характеризующих изменения внеклеточного матрикса межпозвонковых дисков на сре-

зах, окрашенных гистохимическими методами выявления коллагеновых волокон, нейтральных гликопротеинов и сульфатированных гликозаминогликанов, отражены в табл. 1. Достаточно показательно, что уже через 1 мес. после создания очага стафилококковой инфекции в большеберцовой кости исследование компонентов экстрацеллюлярного матрикса фиброзного кольца межпозвонковых дисков позволило выявить статистически значимые изменения интенсивности окрашивания и относительного содержания сульфатированных гликозаминогликанов. Кроме того, отмечалось статистически значимое уменьшение относительного содержания коллагеновых волокон, а также изменение тинкториальных свойств нейтральных гликопротеинов. Это свидетельствует о том, что уже на ранних этапах течения стафилококковой инфекции происходит изменение соотношения различных компонентов внеклеточного матрикса, образующих вязкоупругий каркас фиброзного кольца межпозвонковых дисков. Данные наблюдения согласуются с работами [2, 4], указывающими, что изменения гликозаминогликанов, входящих в состав протеогликанов фиброзного кольца, являются наиболее постоянным признаком дистрофически-дегенеративных изменений межпозвонковых дисков.

Необходимо отметить, что изменение тинкториальных свойств нейтральных гликопротеинов через 1 мес. после воспроизведения стафилокок-

Таблица 1

Морфометрические показатели внеклеточного матрикса межпозвонковых дисков в динамике стафилококковой инфекции, выявленные с помощью гистохимических методов окраски ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Воспаление		
		1 мес.	2 мес.	3 мес.
Коллагеновые волокна				
Относительная площадь, %	78,55 ± 1,06	75,84 ± 0,82	73,61 ± 0,70*	66,73 ± 1,08*
Интенсивность окрашивания, у. е.	90,29 ± 1,17	85,53 ± 1,88	84,39 ± 1,60*	80,95 ± 2,39*
Относительное содержание, у. е.	7094,7 ± 130,4	6451,2 ± 128,3*	6209,9 ± 131,0*	5337,1 ± 138,1*
Red-составляющая, у. е.	187,91 ± 1,03	187,38 ± 0,94	173,63 ± 0,95*	151,21 ± 1,01*
Нейтральные гликопротеины				
Относительная площадь, %	63,38 ± 1,31	64,82 ± 1,31	68,94 ± 0,93*	73,04 ± 0,91*
Интенсивность окрашивания, у. е.	16,02 ± 1,10	15,63 ± 0,65	19,31 ± 0,87*	23,85 ± 2,69
Относительное содержание, у. е.	1042,6 ± 79,3	1013,1 ± 45,5	1332,6 ± 63,5*	1785,6 ± 206,9*
Red-составляющая, у. е.	195,43 ± 1,85	188,15 ± 0,97*	184,44 ± 1,12*	169,16 ± 2,35*
Сульфатированные гликозаминогликаны				
Относительная площадь, %	81,73 ± 1,17	81,19 ± 0,90	63,48 ± 1,57*	40,01 ± 2,32*
Интенсивность окрашивания, у. е.	63,95 ± 2,26	49,67 ± 2,85*	43,79 ± 2,49*	27,55 ± 1,52*
Относительное содержание, у. е.	5208,1 ± 184,4	4074,9 ± 233,4*	2766,5 ± 171,4*	1069,5 ± 79,7*
Blue-составляющая, у. е.	187,38 ± 0,94	181,87 ± 1,82	178,97 ± 1,22*	151,90 ± 1,07*

Примечание. Здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя у интактных животных статистически значимо при 95%-м уровне значимости ($p < 0,05$).

Таблица 2

Морфометрические показатели внеклеточного матрикса межпозвонковых дисков в динамике стафилококковой инфекции, выявленные с помощью иммуногистохимического метода ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Воспаление		
		1 мес.	2 мес.	3 мес.
Коллагеновые волокна I типа				
Относительная площадь, %	80,09 ± 0,63	84,12 ± 0,74*	88,16 ± 0,54*	76,79 ± 1,65
Интенсивность окрашивания, у. е.	28,38 ± 1,34	26,63 ± 1,57	7,84 ± 0,49*	22,48 ± 1,33*
Относительное содержание, у. е.	2264,5 ± 103,1	2230,0 ± 131,9	690,7 ± 43,6*	1663,6 ± 83,6*
Коллагеновые волокна II типа				
Относительная площадь, %	89,32 ± 1,24	67,10 ± 0,83*	65,26 ± 0,99*	77,34 ± 0,80*
Интенсивность окрашивания, у. е.	8,69 ± 0,88	50,70 ± 0,67*	54,57 ± 0,88*	51,27 ± 0,57*
Относительное содержание, у. е.	788,1 ± 82,8	3399,0 ± 58,8*	3547,9 ± 65,7*	3976,8 ± 72,8*
Фибронектин				
Относительная площадь, %	73,11 ± 0,81	78,70 ± 0,69*	72,24 ± 0,90	65,56 ± 0,81*
Интенсивность окрашивания, у. е.	38,09 ± 1,52	42,13 ± 1,37	17,18 ± 0,75*	17,03 ± 1,27*
Относительное содержание, у. е.	2805,6 ± 127,0	3298,9 ± 102,4*	1247,2 ± 58,5*	1130,1 ± 85,4*
Фибулин 2				
Относительная площадь, %	67,02 ± 1,11	67,75 ± 1,11	83,22 ± 0,92*	82,20 ± 1,08*
Интенсивность окрашивания, у. е.	21,60 ± 1,14	34,06 ± 1,14	54,63 ± 1,61*	77,34 ± 1,41*
Относительное содержание, у. е.	1442,0 ± 80,5	2301,9 ± 85,0*	4522,6 ± 131,3*	6373,3 ± 164,3*
Матрилин 2				
Относительная площадь, %	56,28 ± 2,36	68,29 ± 0,63*	69,75 ± 0,84*	63,69 ± 1,47*
Интенсивность окрашивания, у. е.	9,54 ± 1,28	9,99 ± 0,22	11,23 ± 0,13*	26,20 ± 1,57*
Относительное содержание, у. е.	437,4 ± 51,8	681,4 ± 15,6*	782,5 ± 11,2*	1664,5 ± 106,8*

ковой инфекции свидетельствует об изменении соотношения отдельных их фракций. Это подтверждается данными иммуногистохимического исследования (табл. 2).

В дальнейшем, через 2 мес. после создания очага стафилококковой инфекции в большеберцовой кости, гистохимическое и иммуногистохимическое морфометрическое исследование компонентов внеклеточного матрикса фиброзного кольца межпозвонковых дисков выявило статистически значимые изменения тинкториальных свойств, характера распределения и интенсивности окрашивания коллагеновых волокон и нейтральных гликопротеинов экстрацеллюлярного матрикса (см. табл. 1), свидетельствующие об изменении состава нейтральных гликопротеинов (рис. 1) и преобладающего типа коллагена (см. табл. 2). Не исключено, что данные изменения являются свидетельством фиброзных изменений в фиброзном кольце, развивающихся уже через 2 месяца после воспроизведения стафилококковой инфекции, на что обращается внимание при изучении дегенеративных изменений межпозвонковых дисков [9].

Кроме того, по сравнению с контролем, достоверно ($p < 0,05$) снижались и относительное содержание сульфатированных гликозаминогликанов, и занимаемая ими относительная площадь, что отражало нарастание патологических изменений в фиброзных кольцах межпозвонковых дисков при моделировании стафилококковой инфекции.

В динамике эксперимента, через 3 месяца после создания очага персистирующей бактериальной инфекции в большеберцовой кости, при морфометрическом изучении внеклеточного матрикса межпозвонковых дисков выявлено прогрессирующее снижение относительной площади и интенсивности окрашивания сульфатированных гликозаминогликанов фиброзного кольца (рис. 2). Прогрессивно уменьшалась относительная площадь коллагеновых волокон, статистически значимо ($p < 0,05$) возрастала относительная площадь нейтральных гликопротеинов. Наиболее вероятно, что нарушения обмена сульфатированных гликозаминогликанов и, следовательно, протеогликанов при длительном течении стафилококковой инфекции отражаются на упруговязких

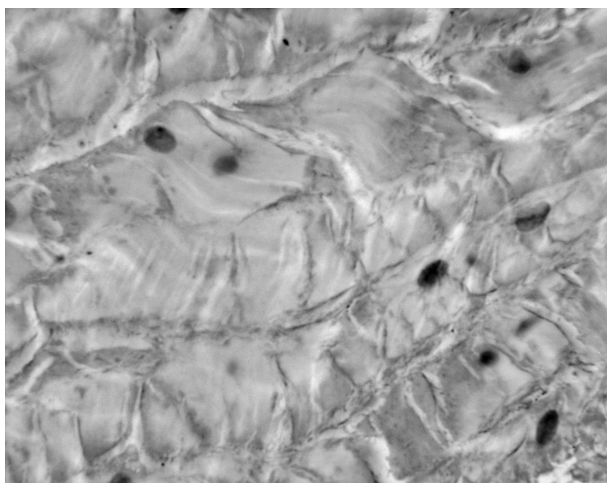


Рис. 1. Неравномерное увеличение содержания фибулина 2 в фиброзном кольце крысы через 2 мес. после создания очага стафилококковой инфекции. Иммуногистохимическое выявление фибулина 2 с докраской ядер гематоксилином Эрлиха. Ув. 1000

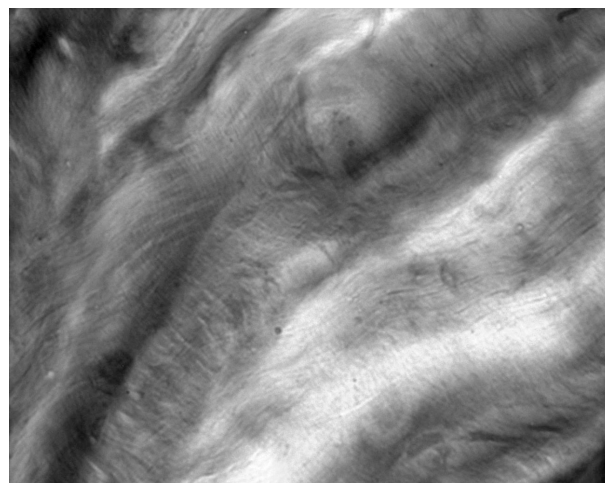


Рис. 2. Участок фиброзного кольца межпозвоночного диска крысы через 3 мес. после создания очага бактериальной инфекции с зоной, лишенной сульфатированных гликозаминогликанов. Окраска альциановым синим при pH 1,0 с последующей докраской ядер кармалюмом Майера. Ув. 1000

свойствах межпозвоночных дисков [6]. В комплексе с изменениями волокнистого компонента дополнительные биомеханические нагрузки могут провоцировать формирование грыж межпозвоночных дисков. Эти данные подтверждают клинические наблюдения об утяжелении симптоматики проявлений остеохондроза позвоночника и более неблагоприятных прогнозах лечения пациентов с очагами хронического воспаления [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продемонстрирована роль стафилококковой инфекции (инокуляция штамма 209 в большеберцовую кость крыс Вистар) в инициации и развитии перестройки внеклеточного матрикса фиброзного кольца, которая проявляется прогрессирующим снижением содержания сульфатированных гликозаминогликанов, достоверным уменьшением относительной площади и относительного содержания коллагеновых волокон при изменении соотношения коллагенов I и II типов, компенсаторным повышением количества нейтральных гликопротеинов и изменением соотношения отдельных их фракций. Данные изменения внеклеточного матрикса волокнистого хряща межпозвоночных дисков способны привести к нарушению путей несосудистой микроциркуляции, функционально связанных с корнями лимфатической системы, и должны приниматься во внимание при проведении комплекса лечебных мероприятий, направленных на профилактику и лечение остеохондроза позвоночника.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Команденко Н.И., Рыжов А.И., Жураковский И.П. Остеохондроз позвоночника. Новосибирск: Сибмедииздат НГМУ, 2006. 246 с.
2. Fukuta S., Miyamoto K., Suzuki K. et al. Abundance of calpain and aggrecan-cleavage products of calpain in degenerated human intervertebral discs // Osteoarthritis Cartilage. 2011. 19. 1254–1262.
3. Green B.N., Johnson C.D., Egan J.T. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists // J. Chiropr. Med. 2012. 11. (1). 64–76.
4. Gruber H.E., Hoelscher G.L., Ingram J.A. Variations in aggrecan localization and gene expression patterns characterize increasing stages of human intervertebral disk degeneration // Exp. Mol. Pathol. 2011. 91. (2). 534–539.
5. Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States // JAMA. 2007. 298. (15). 1763–1771.
6. Miyamoto K., Masuda K., Kim J.G. Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs // Spine J. 2006. 6. 692–703.
7. Miyamoto K., An H.S., Sah R.L. et al. Exposure to pulsed low intensity ultrasound stimulates extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc cells cultured in alginate beads // Spine (Phila Pa 1976). 2005. Vol. 30. P. 2398–2405.
8. Weiler C., Nerlich A.G., Zipperer J. et al. Award Competition in Basic Science: expression of major matrix metalloproteinases is associated with

intervertebral disc degradation and resorption // Eur. Spine J. 2002. Vol. 11. P. 308–320.

9. Zhao C.Q., Wang L.M., Jiang L.S. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration // Ageing Res Rev. 2007. 3. (6). 247–261.

10. Zhurakovsky I., Arkhipov S., Pustovetova M. et al. Functional status of skin fibroblasts at chronic staphylococcus aureus osteomyelitis of the tibia // AJIM. 2013. 1. (2). 10-13.

HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF EXTRACELLULAR MATRIX OF FIBROUS RING OF INTERVERTEBRAL DISCS AT STAPHYLOCOCCOSIS MODELING

Igor Pavlovich ZHURAKOVSKI, Sergei Alekseevich ARKHIPOV, Mariya Gennad'evna PUSTOVETOVA, Irina Aleksandrovna GOLUBEVA, Igor Olegovich MARINKIN, Pavel Aleksandrovich ELYASIN

*Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

RESEARCH OBJECTIVE: to study the changes of an extracellular matrix of a fibrous ring of intervertebral disks at modelling staphylococcal infection. **MATERIAL AND METHODS:** 18 males Wistar with tibia bone osteomyelitis and 6 control animals; histochemistry and immunohistochemistry on the basis of the automatic analysis of fibrocartilage image at 1, 2 and 3 months after osteomyelitis development. **RESULTS AND DISCUSSION:** reorganization of the extracellular matrix of the fibrous ring has been revealed at the long-term staphylococcal infection that is the response to occurring degenerative changes in intervertebral disks.

Key words: intervertebral disk, fibrous ring, Staphylococcus aureus, extracellular matrix, histochemistry, immunohistochemistry.

Zhurakovski I.P. – candidate of medical sciences, senior researcher, e-mail: murash2003@yandex.ru

Arkhipov S.A. – doctor of biological sciences, senior researcher

Pustovetova M.G. – doctor of medical sciences, professor, head of the central scientific research laboratory

Golubeva I.A. – doctor of medical sciences, professor of the chair for anatomy

Marinkin I.O. – doctor of medical sciences, professor, rector

Elyasin P.A. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair for anatomy