



Original Article: CAMBIAMENTI NELLA MATRICE EXTRACELLULARE ANELLO FIBROSO DEL DISCO INTERVERTEBRALE INFEZIONE DA STAFILOCOCCO MODELING

Citation

Zhurakovsky I. P., Arkhipov S. A., Bitkhaeva M. V., Pustovetova M. G., Cambiamenti nella matrice extracellulare anello fibroso del disco intervertebrale infezione da stafilococco modeling. *Italian Science Review*. 2014; 3(12). PP. 296-301.

Available at URL: <http://www.ias-journal.org/archive/2014/march/Zhurakovsky.pdf>

Authors

I.P. Zhurakovsky, Cand. Med. Sci., Novosibirsk State Medical University, Russia.

S.A. Arkhipov, Dr. Bio. Sci., Novosibirsk State Medical University, Russia.

M.V. Bitkhaeva, Novosibirsk State Medical University, Russia.

M.G. Pustovetova, Dr. Med. Sci., Professor, Novosibirsk State Medical University, Russia.

Submitted: February 21, 2014; Accepted: February 25, 2014; Published: March 31, 2014

Riassunto

Per studiare l'effetto di infezione da stafilococco a lungo termine sulla matrice extracellulare dei dischi intervertebrali in 18 ratti maschi Wistar mediante inoculazione ceppo 209 nella tibia di ratti Wistar stata riprodotta osteomielite. Gli animali sono stati ritirati dal esperimento dopo 1, 2 e 3 mesi dopo il modello della riproduzione. Come controllo, animali intatti 6. Istochimicamente rilevate: fibre di collagene, glicosaminoglicani solfati, glicoproteine neutre. Per chiarire la natura dei cambiamenti nella matrice extracellulare dell'anello fibroso dei dischi intervertebrali immunogistohimichesky un metodo a due stadi con i primi anticorpi al collagene di tipo I e II, fibronectina, fibulinu - 2-2 matrilinu.

Allo stesso tempo dimostrato il ruolo di infezione da stafilococco a lungo termine nell'iniziazione e sviluppo di distrofiche e cambiamenti degenerativi nel fibrocartilagine disco intervertebrale. Già 1 mese dopo la creazione di una infezione da stafilococco scoppio cambiamento rivelata

di componenti della matrice extracellulare anelli fibrosi. In futuro, una malattia progressiva dello scambio di glicosaminoglicani solfati unito cambiamenti di fibre collagene, che è un riflesso di fibrosi dei dischi intervertebrali. Come risposta compensativa ai cambiamenti progressivi di componenti della matrice extracellulare della cartilagine fibrosa può essere considerato evidente aumento del contenuto di glicoproteine neutre a causa della loro fazioni separate, in particolare fibulina - 2. Queste violazioni della matrice extracellulare nel lungo corso di infezione da stafilococco può servire come base per l'ulteriore sviluppo dei cambiamenti distruttivi dei dischi intervertebrali.

Parole chiave: dischi intervertebrali, l'anello fibroso, Staphylococcus aureus, collagene, glicosaminoglicani, glicoproteine neutre, fibronectina, fibulin - 2, matrilin - 2.

Stafilococcica per più di 50 anni è uno dei problemi più importanti della scienza medica. Infezione da ceppi meticillino-resistenti di Staphylococcus aureus, occupa

una posizione centrale tra le cause di morbilità e mortalità [1]. *Staphylococcus aureus* negli Stati Uniti ogni anno provoca più casi di malattie infettive di tubercolosi, epatite virale e SPID combinato, e una maggiore mortalità di SPID. [2] Manifestazioni Pronunciate di infezione causate da stafilococco, con molta attenzione, le indicazioni comunque minori di interazione tra macro e micro -organismi non sono meno importanti, in particolare, mostra un legame diretto tra l'infezione da stafilococco cronica e lo sviluppo di distrofiche e degenerative cambiamenti nei dischi intervertebrali di diverse specie animali [3; 4]. È importante sottolineare che i cambiamenti patologici nei dischi intervertebrali può essere una delle manifestazioni della sindrome distrofici - degenerative derivati modifiche mesenchimali per il processo infiammatorio cronico locale [5].

Finalità - per studiare i cambiamenti della matrice extracellulare dell'anello fibroso dei dischi intervertebrali in termini di modellazione di una infezione da stafilococco.

Materiali e metodi

L'esperienza è stato condotto su 24 adulti ratti maschi Wistar peso di 180-220 g in 18 animali in anestesia generale per inalazione eseguite trapanazione tibia seguita inserendo fori filo di cotone, che è stato 30 minuti nel lavaggio cultura durante la notte di *Staphylococcus aureus* (ceppo 209). Studio preliminare ha rivelato che da questo trattamento il filo su esso conteneva 1×10^7 unità formanti colonie. Successivamente, i topi hanno sviluppato osteomielite tibiale. Dedotto da animali da esperimento per decapitazione sotto anestesia etere 1, 2 e 3 mesi dopo il modello della riproduzione. Come controllo, animali intatti 6. L'esperienza è stato eseguito nel rispetto dei principi di umanità, di cui alle direttive della Comunità Europea (86/609/EES) e la Dichiarazione di Helsinki sulla protezione degli animali vertebrati utilizzati per attività di laboratorio e per altri scopi.

Per gli studi istochimici dischi intervertebrali coda sono stati fissati in formalina al 12% e liquidi Tellesnitskogo. Sezioni di paraffina spessore 7 micron sono state colorate con ematossilina e eosina Ehrlich; fibre di collagene sono stati rilevati da van Gieson picrofuchsin solfato glicosaminoglicani - blu Alcian (pH 1,0), glicoproteine neutre - utilizzando PAS - reazione MsManus. Per chiarire la natura dei cambiamenti nella matrice extracellulare dei dischi intervertebrali con una tecnica immunostochimica due fasi con i primi anticorpi al collagene di tipo I e II, fibronectina, fibulinu - 2-2 matrulinu. Sottocomponenti studiato matrice extracellulare, intensità di colorazione, e la densità integrata di proprietà tintorie sono state valutate usando microscopio basato sistema di analisi dell'immagine Micros MC 300A, 13c CX fotocamera digitale (ditta Baumer Optronic GmbH, Germania) e 1.42g software ImageJ (National Istituto Superiore di Sanità, USA). Per ogni gruppo è stata valutata 48 immagini, ciascuna area è 21 455 m².

I risultati dello studio

I risultati delle analisi morfometrica di indicatori che caratterizzano le variazioni della matrice extracellulare dell'anello fibroso dei dischi intervertebrali su sezioni colorate con metodi istochimici per identificare fibre collagene, glicoproteine neutre e glicosaminoglicani solfati, sono mostrati nella Tabella 1. Sufficientemente rappresentativo è che già dal 1 mese dopo la creazione di infezione da stafilococco focolare nei componenti della matrice extracellulare studio tibia dell'anello fibroso dei dischi intervertebrali, rivelato statisticamente significativo cambiamento nell'intensità della colorazione e della densità integrata di glicosaminoglicani solfati. Ciò indica un coinvolgimento abbastanza presto nel processo patologico di proteoglicani che compongono l'anello fibroso amorfa dei dischi intervertebrali. Nonostante il fatto che l'area che occupano non viene modificato, il contenuto di glicosaminoglicani solfatati in un volume

unitario significativamente diminuita, come indicato da una significativa ($p < 0.05$) riduzione della densità integrata. Queste osservazioni sono coerenti con il lavoro di [6,7], indicando che i cambiamenti in glicosaminoglicani, proteoglicani appartenenti agli anelli fibrosi sono la caratteristica più costante di distrofici e alterazioni degenerative dei dischi intervertebrali.

Dobbiamo anche notare le proprietà tintorie cambiamento di glicoproteine neutre 1 mese dopo la riproduzione di un'infezione da stafilococco, che indica la variazione del rapporto delle loro singole frazioni. Ciò è confermato da studi immunostochimici (Tabella 2). Pertanto, un aumento statisticamente significativo della densità sfondo fibronectina integrato fibulina - 2, 2 - matrilina, il loro rapporto era di 4,8/3,8/1, mentre negli animali intatti, questo rapporto era di 6,4/3,3/1. Questo riflette l'aumento della percentuale di fibronectina in una sostanza amorfa del fibroso anello 1 mese dopo la creazione di un modello di infezione stafilococcica. Dato il ruolo importante di questa glicoproteina nella formazione del collagene, diventa chiaro, dimostrata da noi, la possibilità di aumentare la superficie relativa del collagene di tipo I.

Successivamente, 2 mesi dopo infezione da stafilococco creazione focolare nel istochimica tibia e studio morfometrico immunostochimica dei componenti della matrice extracellulare dell'anello fibroso dei dischi intervertebrali, rivelato variazioni statisticamente significative proprietà tintorie, densità integrato e l'intensità della colorazione delle fibre di collagene e glicoproteine neutre della matrice extracellulare (Tabella 1), che indica un cambiamento nella composizione di glicoproteine neutre (rapporto di fibronectina fibulina matrilina - 2 e 2 è 1,7/6,3/1) e il tipo predominante di collagene (il rapporto di collagene di tipo I e II è 1/5, 1 mentre nell'animale intatto da 2,9/1).

Degno di nota, in contrasto con il periodo precedente, un decremento significativo (2,6 volte) la densità integrato di fibronectina, avvenuta in parallelo con una diminuzione della densità integrata di collagene I e maggiore di collagene di tipo II.

Inoltre, rispetto al controllo, in modo significativo ($p < 0.05$) diminuita l'intensità della colorazione, e sceso a 1,3 volte la superficie relativa dei glicosaminoglicani solfati.

E' possibile che questi cambiamenti sono la prova di alterazioni fibrotiche dell'anello fibroso, sviluppando entro 2 mesi dopo la riproduzione di una infezione da stafilococco che richiama l'attenzione allo studio delle alterazioni degenerative dei dischi intervertebrali [8].

Nel corso di un esperimento, a 3 mesi dopo la creazione di scoppio persistente di infezione batterica nella tibia, con studio morfometrico della matrice extracellulare dei dischi intervertebrali rivelato una progressiva diminuzione della superficie relativa e l'intensità della colorazione dei glicosaminoglicani solfati dell'anello fibroso. Progressivamente prestazione ridotta superficie relativa delle fibre di collagene, una statisticamente significativa ($p < 0.05$) ha aumentato la superficie relativa delle glicoproteine neutre. Più probabile che i glicosaminoglicani solfati metabolici, e quindi proteoglicani nel lungo corso di infezione da stafilococco, che si riflette nelle proprietà viscoelastiche del disco intervertebrale [9]. In concomitanza con variazioni della componente fibrosa, carico biomeccanico aggiuntivo può innescare la formazione di ernia discale. Questi dati confermano l'osservazione clinica dei sintomi manifestazioni di ponderazione degenerative dischi intervertebrali e pazienti prognosi più poveri con focolai di infiammazione cronica [5].

Discussione

Negli ultimi anni, più attenzione al restauro di funzionare metodi tessuti di terapia cellulare e/o ingegneria dei tessuti, in particolare nei processi degenerativi dei

dischi intervertebrali [10]. Sviluppo di strategie per l'ingegneria tissutale è un importante edificio della conoscenza dei processi patofisiologici nei tessuti bersaglio, in particolare lo sviluppo di infezioni da stafilococco cronica.

Diversi studi hanno dimostrato che le cellule dell'anello fibroso presentano il fenotipo dei condrociti con l'espressione predominante di collagene di tipo II [11-13]. Va notato che ha dimostrato dati sperimentali indicano un aumento della densità integrata di collagene di tipo II, nonché il rapporto di polarizzazione dei tipi considerati di collagene in favore del collagene di tipo II, che può essere indicativo della possibilità della presenza di infezione batterica focolai alterazioni fibrotiche in questa sezione del disco intervertebrale [8].

Molto interessante è il fatto che i cambiamenti della densità integrata di collagene di tipo I e II è osservata contro cambiamenti nell'espressione della fibronectina. Merita attenzione come questa componente della matrice extracellulare, insieme con le integrine svolge un ruolo importante nella formazione di fibrille di collagene [14].

Le modifiche sopra descritte in matrice extracellulare di anelli fibrosi combinati con una progressiva diminuzione della superficie relativa e l'intensità della colorazione dei glicosaminoglicani solfati. Più probabile che i glicosaminoglicani solfati metabolici, e quindi proteoglicani nel lungo corso dell'infezione stafilococcica, riflesse nelle proprietà viscoelastiche del disco intervertebrale [9].

Conclusion

Dimostrato il ruolo di una infezione da stafilococco (inoculazione ceppo 209 nella tibia di ratti Wistar) nell'iniziazione e sviluppo della ristrutturazione della matrice extracellulare dell'anello fibroso del disco intervertebrale, che si manifesta con una progressiva diminuzione del contenuto di glicosaminoglicani solfati significativa diminuzione della superficie relativa e contenuto relativo di fibre collagene a

modificare il rapporto di collagene I e II tipi, un aumento compensatorio della quantità di glicoproteine neutre e variazioni del rapporto delle loro singole frazioni. Questi cambiamenti della matrice extracellulare di fibrosi cartilagine dischi intervertebrali possono portare alla rottura dei modi microcircolo non vascolari funzionalmente connessi con le radici del sistema linfatico, e devono essere prese in considerazione nelle misure terapeutiche complesse per la prevenzione e il trattamento di alterazioni degenerative dei dischi intervertebrali.

References:

1. Kleven R.M., 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. R.M. Kleven [et al.]. *JAMA*. #15 (298). Pp. 1763-1771.
2. Green B.N., 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists. B.N. Green [et al.]. *J. Chiropr. Med.* #1 (11). pp. 64-76.
3. Komandenko N.I., 1998. Modeling of osteochondrosis of the spinal column. N.I. Komandenko [et al.]. *Biull. Eksp. Biol. Med.* #6 (125). pp. 630-632.
4. Zhurakovsky I.P., 2012. Secondary systemic connective tissue disruption as one of the manifestations of the syndrome combined dystrophic and degenerative changes of mesenchymal derivatives. monograph. I.P. Zhurakovsky, M.V. Bithaeva, M.G. Pustovetova. LAP LAMBERT Academic Publishing, 168 p.
5. Komandenko N.I., 2006. Osteochondrosis: Monograph. AI Ryzhov, I.P. Zhurakovsky. Novosibirsk Sibmedizdat NSMU, p. 246.
6. Fukuta S., 2011. Abundance of calpain and aggrecan-cleavage products of calpain in degenerated human intervertebral discs. S. Fukuta [et al.] *Osteoarthritis Cartilage*. (19). pp. 1254-1262.
7. Gruber H.E., 2011. Variations in aggrecan localization and gene expression patterns characterize increasing stages of human intervertebral disk degeneration.

- H.E. Gruber [et al.] *Exp Mol Pathol.*2 (91). pp. 534-539.
8. Zhao C.Q., 2007. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. C.Q. Zhao [et al.] *Ageing Res Rev.* #3 (6). pp.247- 261.
9. Miyamoto K., 2006. Intradiscal injections of osteogenic protein- 1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs. K. Miyamoto [et al.] *Spine J.* #6. pp. 692-703.
10. Kalson N.S., 2008. Strategies for regeneration of the intervertebral disc. N.S. Kalson [et al.] *Regen Med.* #3.pp.717- 729.
11. Adams M.A., 2006. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? M.A. Adams, P.J. Roughley. *Spine.* Vol.31. pp. 2151-2161.
12. Anderson D.G., 2002. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs: analysis of a rabbit annular laceration model. D.G. Anderson [et al.] *Spine.* Vol.27.pp.1291- 1296.
13. Clouet J., 2009. Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes. J. Clouet [et al.] *Rheumatology (Oxford).* Vol.48, #11.pp.1447- 1450.
14. Kadler K.E., 2008. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. K.E. Kadler [et al.] *Curr Opin Cell Biol.*Vol.20, #5.pp.495- 501.

Tabella 1

Parametri morfometrici della matrice extracellulare dei dischi intervertebrali nella dinamica di una infezione da stafilococco (metodi colorazione istochimica, M ± m)

Indice	Intatto	Infiammazione			
		1 mese	2 mesi	3 mesi	
Anello fibroso dei dischi intervertebrali	Le fibre di collagene:				
	Superficie relativa (%)	78,55 ± 1,06	75,84 ± 0,82	73,61 ± 0,70*	66,73 ± 1,08*
	Intensità di colorazione (ue)	90,29 ± 1,17	85,53 ± 1,88	84,39 ± 1,60*	80,95 ± 2,39*
	Densità integrata (USD)	7094,7 ± 130,4	6451,2 ± 128,3*	6209,9 ± 131,0*	5337,1 ± 138,1*
	Red-componente (ue)	187,91 ± 1,03	187,38 ± 0,94	173,63 ± 0,95*	151,21 ± 1,01*
	Glicoproteine neutre:				
	Superficie relativa (%)	63,38 ± 1,31	64,82 ± 1,31	68,94 ± 0,93*	73,04 ± 0,91*
	Intensità di colorazione (ue)	16,02 ± 1,10	15,63 ± 0,65	19,31 ± 0,87*	23,85 ± 2,69
	Densità integrata (USD)	1042,6 ± 79,3	1013,1 ± 45,5	1332,6 ± 63,5*	1785,6 ± 206,9*
	Red-componente (ue)	195,43 ± 1,85	188,15 ± 0,97*	184,44 ± 1,12*	169,16 ± 2,35*
	Glicosaminoglicani solfati:				
	Superficie relativa (%)	81,73 ± 1,17	81,19 ± 0,90	63,48 ± 1,57*	40,01 ± 2,32*
	Intensità di colorazione (ue)	63,95 ± 2,26	49,67 ± 2,85*	43,79 ± 2,49*	27,55 ± 1,52*
	Densità integrata (USD)	5208,1 ± 184,4	4074,9 ± 233,4*	2766,5 ± 171,4*	1069,5 ± 79,7*
	Blu-componente (ue)	187,38 ± 0,94	181,87 ± 1,82	178,97 ± 1,22*	151,90 ± 1,07*

* - Differenze statisticamente significative con gli animali intatti a livello di significatività del 95% (p<0.05)

Tabella 2

Parametri morfometrici della matrice extracellulare dei dischi intervertebrali nella dinamica di una infezione da stafilococco (tecniche di colorazione immunoistochimica, M ± m)

Indice	Intatto	Infiammazione			
		1 mese	2 mese	3 mese	
A n n e l l o f i b r o s o d e i d i s c h i i n t e r v e r t e b r a l i	Collagene di tipo I fibre:				
	Superficie relativa (%)	80,09±0,63	84,12±0,74*	88,16±0,54*	76,79±1,65
	Intensità di colorazione (ue)	28,38±1,34	26,63±1,57	7,84±0,49*	22,48±1,33*
	Densità integrata (USD)	2264,5 ± 103,1	2230,0 ± 131,9	690,7 ± 43,6*	1663,6 ± 83,6*
	Di tipo II fibre di collagene:				
	Superficie relativa (%)	89,32±1,24	67,10±0,83*	65,26±0,99*	77,34±0,80*
	Intensità di colorazione (ue)	8,69±0,88	50,70±0,67*	54,57±0,88*	51,27±0,57*
	Densità integrata (USD)	788,1 ± 82,8	3399,0 ± 58,8*	3547,9 ± 65,7*	3976,8 ± 72,8*
	Fibronettina:				
	Superficie relativa (%)	73,11±0,81	78,70±0,69*	72,24±0,90	65,56±0,81*
	Intensità di colorazione (ue)	38,09±1,52	42,13±1,37	17,18±0,75*	17,03±1,27*
	Densità integrata (USD)	2805,6 ± 127,0	3298,9 ± 102,4*	1247,2 ± 58,5*	1130,1 ± 85,4*
	Fibulin 2:				
	Superficie relativa (%)	67,02±1,11	67,75±1,11	83,22±0,92*	82,20±1,08*
	Intensità di colorazione (ue)	21,60±1,14	34,06±1,14	54,63±1,61*	77,34±1,41*
	Densità integrata (USD)	1442,0 ± 80,5	2301,9 ± 85,0*	4522,6 ± 131,3*	6373,3 ± 164,3*
	Matrilin:				
	Superficie relativa (%)	56,28 ± 2,36	68,29 ± 0,63*	69,75 ± 0,84*	63,69 ± 1,47*
	Intensità di colorazione (ue)	9,54 ± 1,28	9,99 ± 0,22	11,23 ± 0,13*	26,20 ± 1,57*
	Densità integrata (USD)	437,4 ± 51,8	681,4 ± 15,6*	782,5 ± 11,2*	1664,5 ± 106,8*

* - Differenze statisticamente significative con gli animali intatti a livello di significatività del 95% (p <0.05)