



МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ХОНДРОГЕНЕЗА ПЛАСТИНОК РОСТА ТЕЛ ПОЗВОНКОВ И ПОДВЗДОШНОЙ КОСТИ

А.М. Зайдман, М.А. Садовой, Е.Л. Строчкова, А.В. Корель, Т.В. Русова
Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна

Цель исследования. Сравнительный анализ закономерностей формирования и генетической регуляции хондрогенеза пластинок роста тел позвонков и подвздошной кости в норме.

Материал и методы. Объектом исследования служили пластинки роста тел позвонков и подвздошного хряща, полученные от 10 мини-поросят в периоды интенсивного роста. Использованы методы исследования: морфогистохимия, электронная микроскопия, иммуногистохимия, экспрессия генов, биохимическое исследование протеогликанов и гликозаминогликанов, морфометрический анализ.

Результаты. Структурно-функциональная организация клеток и матрикса, периодизация процессов пролиферации, дифференцировки и генетической регуляции (экспрессия агрекана, люмикана, Pax1, Sox9, HAPLN1 и др.) в исследуемых образцах пластинок роста однотипны.

Заключение. Процессы генетической регуляции хондрогенной дифференцировки хондробластов пластинок роста тел позвонков и гребня подвздошной кости синхронны.

Ключевые слова: пластинка роста, дифференцировка и пролиферация хондробластов, пластинка роста тела позвонка и подвздошного хряща.

MORPHOFUNCTIONAL LAWS REGULATING CHONDROGENESIS IN VERTEBRAL AND ILIAC BONE GROWTH PLATES

A.M. Zaidman, M.A. Sadovoy, E.L. Strokova,
A.V. Korel, T.V. Rusova

Objective. To perform comparative analysis of the laws of formation and genetic regulation of chondrogenesis in healthy vertebral growth plates and iliac bone growth plates.

Material and Methods. Growth plates of vertebral bodies and iliac articular cartilage obtained from 10 mini-pigs in the period of intensive growth were investigated. The following studies were performed: morphohistochemistry, electron microscopy, immunohistochemistry, gene expression study, biochemical study of proteoglycans and GAGs, and morphometric analysis.

Results. Structural and functional organization of cells and matrix, and periodization of the processes of proliferation, differentiation, and genetic regulation (expression of aggrecan, lumican, Pax1, Sox9, HAPLN1, etc.) were similar in the examined growth plate specimens.

Conclusion. The processes of genetic regulation of chondrogenic differentiation of chondroblasts in the growth plates of vertebral bodies and the iliac bone crest are synchronous.

Key Words: vertebral growth plate, iliac cartilage growth plate, differentiation and proliferation of chondroblasts.

Hir. Pozvonoc. 2013;(3):68–80.

Заместительная клеточная терапия на наших глазах становится реальностью в лечении самых разнообразных заболеваний.

А.С. Соболева

В настоящее время хирургическое лечение деформаций позвоночника является единственным способом предотвращения тяжелых нарушений сердечно-сосудистой и легочной недостаточности и в значительной

степени корректировать косметический дефект [1, 4]. Методов патогенетического лечения сколиотической болезни не существует, что связано с отсутствием сведений об этиологическом факторе патологии. Общепри-

знанным и практически неизбежным является асимметрия роста позвоночника – патогенетический механизм формирования деформации. На основании этих данных возникает вопрос о возможности коррекции наруше-

ния роста методами, основанными на заместительной терапии патологически измененных зон роста. Подобным пластическим материалом могла бы быть пластинка роста (ПР) из гребня подвздошной кости, которая, по современным представлениям, является показателем потенции роста позвонка. Это так называемый симптом Risser, используемый ортопедами как прогностический признак прогрессирования сколиотической деформации. Эти данные являются основанием для настоящего исследования. Предпосылкой для подобной разработки является замещение хондротрансплантатом латеральной зоны ПР тела позвонка после деструкции ткани растущего животного раствором папаина. Было показано, что при введении хондротрансплантата в латеральную область ПР клетки хондротрансплантата встраиваются в метаболическую структуру ПР, дальнейшая дифференцировка трансплантированных хондробластов происходит в соответствии с закономерностями функционирования ПР в норме. Деформация позвоночника через 6 мес. после операции у животного не развивалась (по неопубликованным данным А.М. Зайдман, В.А. Суздалова, 2010).

Для реализации экспериментальной проверки возможности коррекции роста методом пластического замещения дефекта ПР тела позвонка трансплантатом, полученным из гребня подвздошной кости, представляется необходимым исследовать морфофункциональное соответствие этих структур во временном аспекте.

Цель исследования – сравнительный анализ закономерностей формирования и генетической регуляции хондрогенеза ПР тел позвонков и подвздошной кости в норме.

Материал и методы

Объектом исследования служили ПР тел позвонков и подвздошного хряща, полученные от 10 мини-поросят в раннем онтогенезе (новорожденный, двухнедельный и месячный). Выбор

сроков наблюдения определен темпами роста животных. Ткани фиксировали в 10 % растворе формалина, костную ткань подвергали декальцинации в холодном трилоне «Б». На парафиновых срезах препараты окрашивали гистологическими методами (гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону и Маллори), гистохимическими (толуидиновым синим при разных значениях pH, альциановой синью, Хейл-реакцией, Шик-реакцией – окраска реактивом Шиффа, реакцией Грина). Ко всем реакциям ставили соответствующие контроли. Ультроструктурные исследования проводили после фиксации в глютаральдегиде и дофиксации в осмии. Препараты после проводки по спиртам заливали в аральдит. Готовили полутонкие и тонкие срезы на ультратоме «LKB», просматривали и фотографировали на электронном микроскопе «Hitachi-100».

Измерение диаметров и площадей клеток исследуемых препаратов, вычисление ядерно-цитоплазматических отношений, размер площадей, занимаемых слоями ПР, и статистическую обработку полученных результатов проводили методом морфометрического анализа при помощи программ «Axio Vision Le Rel. 4.3.» и «Morpho Images». Данные представлены в виде таблиц и графиков.

Биохимическими методами исследовали качественное и количественное содержание гликозаминогликанов (ГАГ) в тканях ПР тел позвонков и подвздошного хряща. Для выделения ГАГ ткань хряща обрабатывали раствором папаина по общепринятой методике [2]. В растворе аналитическими методами определяли содержание химических компонентов ГАГ – сульфатированных ГАГ (СГАГ), гексуроновых кислот и гексоз. Содержание этих компонентов рассчитывали в микрограммах на миллиграмм сухого веса ткани. Качественный состав определяли методом электрофореза в 1 % геле агарозы в буфере 50 mM ацетата бария pH 8,0. Для идентификации ГАГ использовали специфические гликозаминогликангидролазы – хондроити-

назы АС и АВС. Полученные результаты представлены в виде таблиц.

Для исследования экспрессии генов хрящевую ткань ПР тел позвонков и ПР подвздошной кости новорожденного, двухнедельного и месячного поросенка отмывали, измельчали и помещали в раствор коллагеназы на 22–24 ч при температуре 37 °C. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об./мин. Из осажденных клеток выделяли РНК тризольным методом (TRI reagent). Выделенную РНК обрабатывали RNase-free DNase; кДНК получали в реакции обратной транскрипции с использованием фермента M-MLV Reverse Transcriptase в присутствии Oligo (dT)15-праймера. Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Реакции без фермента использовали в качестве отрицательного контроля. Амплификацию фрагментов исследуемых генов проводили методом ПЦР на амплификаторе «TRIO-Thermoblock». В качестве контрольного гена использовался ген актин. ПЦР была выполнена с использованием Taq-полимеразы и ген-специфичных праймеров (табл. 1) при следующих условиях: 3 мин при 95 °C и 30 циклов (30 с при 95 °C, 30 с при 58–60 °C и 30 с при 72 °C). Анализ продуктов ПЦР проводили методом горизонтального гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

Результаты

На ранних стадиях постнатального развития ПР тел позвонков и подвздошного гребня подвздошной кости новорожденных особей состоят из хондробластов и матрикса, формирующих четыре зоны в зависимости от степени дифференцировки (рис. 1).

Широкий слой камбиальных клеток в обеих исследуемых структурах свидетельствует о высокой потенции процессов роста. Хондробласты этой зоны мелкие, вытянутые, с круглым или овальным ядром и одним ядрышком. Цитоплазма окаймляет ядро и ограничена мембраной с коротки-

Таблица 1

Праймеры к исследуемым генам

Ген	Праймер	Последовательность праймера	Концентрация MgCl ₂ , mM	Температура отжига, град.	Размер целевого фрагмента, bp
Актин	Актин f	5'-GCCGAGATCTCACCGACTAC-3'	3	59	360
	Актин r	5'-CCCCAGAGAGGACGTTGTTA-3'			
Агррекан	Acan f	5'-GAAGCAGCAGTCACACCTGA-3'	3	59	505
	Acan r	5'-GCTCCGCTTCTGTAGTCTGC-3'			
Люмикан	Lum f	5'-AGATCTCAAGGGTCCCCAAC-3'	3	59	357
	Lum r	5'-GCAGCTGGTTGTAGGAGAGG-3'			
Pax1	Pax1 f м	5'-ACGTGGTCAAGCACATCCGGGACT-3'	4	58	508
	Pax1 r м	5'-AAGGCGGGTTTCTCGAGCCCATT-3'			
SOX9	SOX9 f	5'-ACGCGGAGCTCAGCAAGACTCTG-3'	4	60	370
	SOX9 r	5'-TCTCGCTTCAGGTCAGCCTTGCC-3'			
COL1A1	COL1A1 f	5'-TGCTCCTCTTAGCGGCCACCG-3'	4	58	280
	COL1A1 r	5'-ACCTCGCCTTCGGGGCAGAC-3'			
COL2A1	COL2A1 f	5'-CCCCGGAACCTCTGGCACGG-3'	4	58	365
	COL2A1 r	5'-CGTCAGCACCGGGAGGACCA-3'			
COL10A1	COL10A1 f	5'-AAGCGGTCCACCCGAAGGC-3'	4	58	415
	COL10A1 r	5'-AGCCCGTTCGACCCAGCGTT-3'			
HR	HR f	5'-TGGGGCAAAGGATGACGACTCCG-3'	4	58	384
	HR r	5'-TGGCCCGGGGAAAGGACCAC-3'			
HAPLN	HAPLN1 f	5'-GGCTGGACTGGTGCAACGCT-3'	4	58	376
	HAPLN1 r	5'-CTGCAGCGCCTTCTTGGCCT-3'			
MMP9	MMP9 f	5'-GACGGCCGCTCAGACGGCTA-3'	4	58	343
	MMP9 r	5'-TGAGCGCCTCTGGCACGGTT-3'			
TGFB1	TGFB1 f	5'-TTCACGGCATGAACCGGCC-3'	4	58	385
	TGFB1 r	5'-TGCTCCACCTTGGGCTTGCG-3'			
INH	INH f	5'-ACGTGCATTGCTCCGTCAAGTCCG-3'	3	59	314
	INH r	5'-GCGGGCAGCTGGTTCTGTGTGATT-3'			
Pax9	Pax9 f	5'-ATCAGCCGCATCCTGCGCAACAA-3'	4	58	596
	Pax9 r	5'-AGCGACGCGGAATGTCACAGTTG-3'			

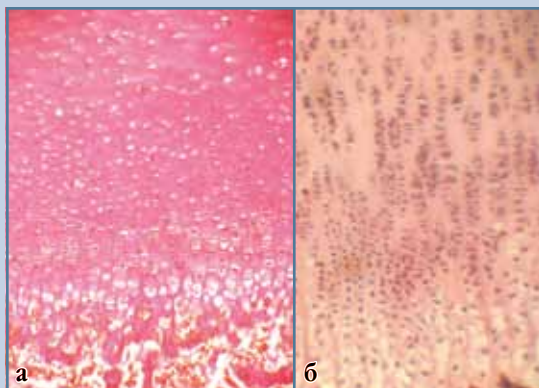


Рис. 1

Пластика роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) новорожденного поросенка; окраска гематоксилин-эозином, ув. 200

ми отростками. В цитоплазме выявляются низкополимерные ГАГ, хондроитинсульфат С, гиалуроновая кислота и гликоген. Ультраструктурная организация цитоплазмы клеток однотипна, характерна для малодифференцированных клеток. Ядро занимает практически все пространство клетки. Хроматин деконденсирован, располагается на ядерной мембране, нуклеоплазма светлая; 1–2 ядрышка расположены эксцентрично. В цитоплазме многочисленные рибосомы и полисомы расположены как свободно, так и на мембранах эндоплазматического ретикулума, который представлен узкими цистернами, заполненными электронно-плотным веществом. Комплекс Гольджи расположен приядерно, представлен узкими цистернами и мелкими гладкими и окаймленными везикулами (рис. 2). Часть окаймленных везикул располагается вблизи плазмалеммы; мелкие везикулы примыкают к гладкому эндоплазматическому ретикулуму. Митохондрии мелкие, с хорошо контурирующимися кристами. В цитоплазме выявляются гранулы гликогена. Вокруг хондробластов выявляются цепочки протеогликана (ПГ) и тонкие коллагеновые волокна.

Зона пролиферирующих клеток по классическому представлению может быть разделена на два слоя: округлые клетки и пролифераты, состоящие из 3–4 клеток, и колонковые структуры со строго упорядоченным расположением клеток в виде колонок, ограниченных узким матриксом. Необходимо отметить, что при одинаковой архитектонике этой зоны ПР тел позвонков и подвздошного хряща имеют выраженные отличия (рис. 3). В ПР подвздошной кости определяются более широкая зона колонковых структур и более плотное их расположение. Площадь, занимаемая колонковым слоем ПР подвздошного хряща, достоверно больше ($244661,86 \pm 18943,35 \text{ мкм}^2$), чем таковая для ПР тела позвонка ($52907,04 \pm 1379,73 \text{ мкм}^2$; табл. 2–5). В клетках и матриксе этих зон определяются высокополимерные ПГ (рис. 4), в цитоплазме диффузно расположены гранулы гликогена в виде редких гранул. Иммуногистохимическими методами выявляются агрекан, ПГ, коллаген, преимущественно II типа (рис. 5).

Ультраструктура клеток обнаруживает высокую степень дифференцировки. Форма клеток преимущественно овальная, ядро располагается ацентриально и содержит 1–2 ядрышка. Структурная организация цитоплазмы значительно усложняется за счет комплекса органелл и их расположения в цитоплазме. Прежде всего, это развитая эндоплазматическая сеть с прикрепленными рибосомами и каналы гладкого эндоплазматического ретикула с расширенными цистернами, заполненными электронно-плотным содержимым. Комплекс Гольджи локализуется диффузно в цитоплазме и характеризуется визикулярно-ламинарным типом строения, с большим количеством визикул, особенно на трансповерхности. Визиклы, преимущественно окаймленные, с мелкогранулярным электронно-плотным содержимым, локализованы как в области плазматической мембраны, так и в мембранах эндоплазматической сети. Количество митохондрий в клетках пролиферирующего слоя

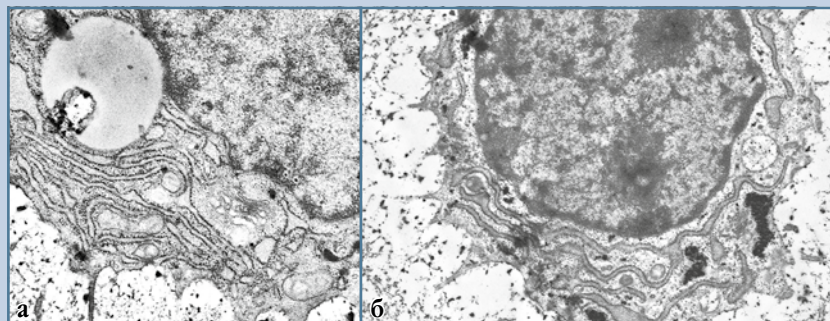


Рис. 2

Ультраструктура малодифференцированных хондробластов пластинки роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) новорожденного поросенка; ув. 5000

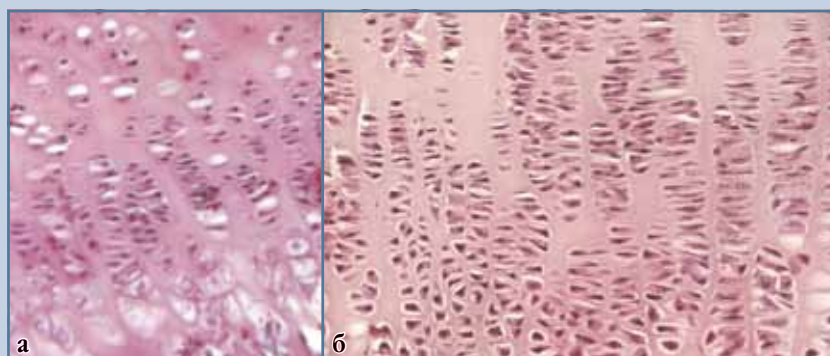


Рис. 3

Структурная организация зоны пролиферирующих хондроцитов пластинки роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) новорожденного поросенка; окраска гематоксилин-эозином, ув. 200

Таблица 2

Размер колонкового и гипертрофического слоев пластинки роста тела позвонка мини-поросенка в возрастном аспекте, мкм^2

Возраст	Колонковый слой	Гипертрофический слой
Новорожденный	$52907,04 \pm 1379,73$	$61632,22 \pm 3384,04$
Две недели	$93384,54 \pm 2275,93$	$57851,98 \pm 1480,66$
1 мес.	$82768,52 \pm 3671,55$	$64361,51 \pm 2605,18$

Таблица 3

Размер колонкового и гипертрофического слоев пластинки роста подвздошного хряща мини-поросенка в возрастном аспекте, мкм^2

Возраст	Колонковый слой	Гипертрофический слой
Новорожденный	$244661,86 \pm 18943,35$	$110980,21 \pm 3964,42$
Две недели	$280150,47 \pm 15055,35$	$135583,96 \pm 14074,65$
1 мес.	$257424,90 \pm 15900,28$	$179110,15 \pm 13039,29$

Таблица 4

Сравнение размеров гипертрофического слоя пластинки роста подвздошного хряща и тела позвонка мини-поросенка в возрастном аспекте

Возраст	Подвздошный хрящ	Пластика роста тела позвонка
Новорожденный	110980,21	61632,22
Две недели	135583,96	57851,98
1 мес.	179110,15	64361,51

Таблица 5

Сравнение размеров колонкового слоя пластинки роста подвздошного хряща и тела позвонка мини-поросенка в возрастном аспекте

Возраст	Подвздошный хрящ	Пластика роста тела позвонка
Новорожденный	244661,86	52907,04
Две недели	280150,47	93384,54
1 мес.	257424,90	82768,52

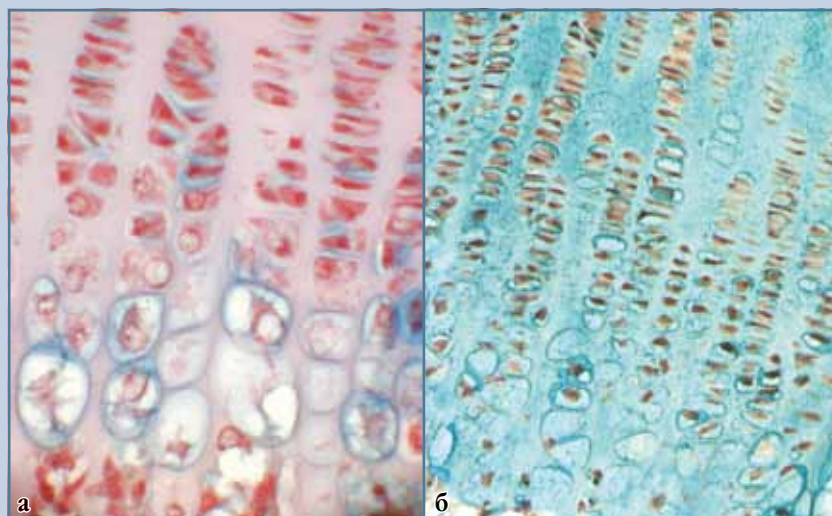


Рис. 4

Протеогликаны в хондробластах и матриксе пластинки роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) новорожденного поросенка; окраска альциановым синим, ув. 400

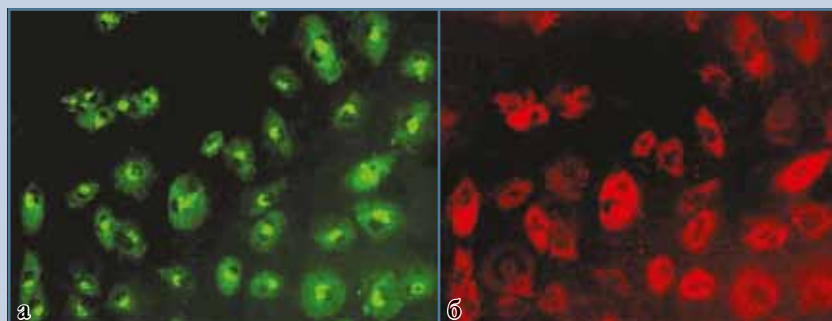


Рис. 5

Иммуногистохимическая реакция с антителами к агрекану (красный цвет) и к коллагену I типа (зеленый цвет) в пластинках роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) новорожденного поросенка; окраска альциановым синим, ув. 200

значительно увеличено. Определяются крупные митохондрии с хорошо выраженными кристами и мелкие с плотным матриксом (рис. 6). В цитоплазме определяются лизосомы и аутофагосомы, что свидетельствует об интенсификации обменных процессов в системе «клетка – матрикс». Ядерно-цитоплазматические (я/ц) отношения (я/ц хондроцитов колонкового слоя ПР тела позвонка – $0,34 \pm 0,14$; я/ц хондроцитов колонкового слоя ПР подвздошного хряща – $0,35 \pm 0,08$; табл. 6–9).

В этот период отличие структурной организации ПР коррелирует с данными гистохимических исследований. В ПР подвздошной кости синтез высокополимерных ПГ в клетках и матриксе колонкового слоя значительно выше (рис. 4), что, несомненно, связано с количеством клеток, продуцирующих ПГ. Выявлены различия в экспрессии генов. В этот период в ПР тела позвонка интенсивно экспрессируется ИНН – ген пролиферации и ММР9 – ген-регулятор остеогенеза (рис. 7). Эти данные свидетельствуют об интенсивном процессе пролиферации клеток, включающих синтезы и формирование органелл *de novo*, как этап остеогенной дифференцировки. В ПР подвздошной кости экспрессия генов, регуляторов остеогенеза, снижена, что согласуется с морфологическими данными.

Гипертрофический слой ПР тела позвонка (табл. 2) фенотипически разнороден. Расположенные на границе с пролиферирующими клетками дифференцированные хондробласты сохраняют способность к репродукции,

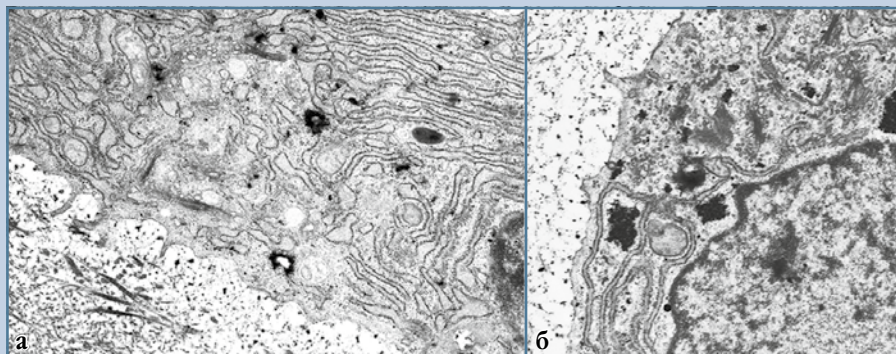


Рис. 6

Ультраструктура высокодифференцированных хондроцитов пластинки роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) новорожденного поросенка; ув. 5000

Таблица 6

Ядерно-цитоплазматические отношения хондроцитов колонкового и гипертрофического слоев пластинки роста тела позвонка мини-поросенка в возрастном аспекте

Возраст	Колонковый слой	Гипертрофический слой
Новорожденный	$0,34 \pm 0,14$	$0,23 \pm 0,06$
Две недели	$0,36 \pm 0,10$	$0,21 \pm 0,07$
1 мес.	$0,36 \pm 0,10$	$0,14 \pm 0,05$

Таблица 7

Ядерно-цитоплазматические отношения хондроцитов колонкового и гипертрофического слоев пластинки роста подвздошного хряща мини-поросенка в возрастном аспекте

Возраст	Колонковый слой	Гипертрофический слой
Новорожденный	$0,35 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,06$
Две недели	$0,38 \pm 0,13$	$0,18 \pm 0,05$
1 мес.	$0,35 \pm 0,13$	$0,10 \pm 0,03$

Таблица 8

Сравнение ядерно-цитоплазматических отношений хондроцитов колонкового и слоя пластинки роста тела позвонка и подвздошного хряща мини-поросенка в возрастном аспекте

Возраст	Колонковый слой пластинки роста тела позвонка	Колонковый слой пластинки роста подвздошного хряща
Новорожденный	0,340	0,350
Две недели	0,360	0,380
1 мес.	0,360	0,350

Таблица 9

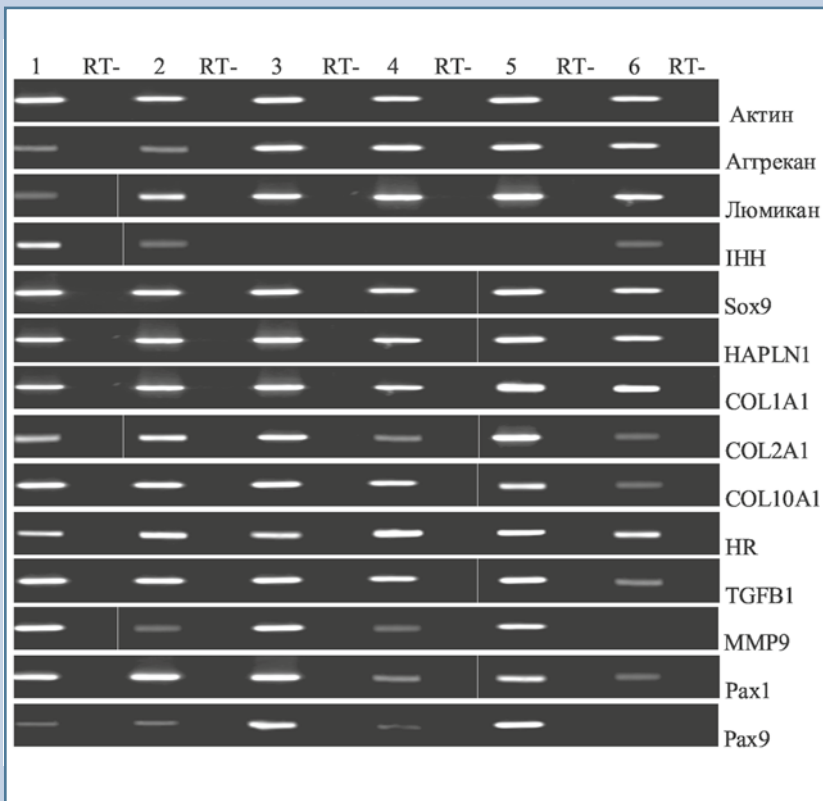
Сравнение ядерно-цитоплазматических отношений хондроцитов гипертрофического и слоя пластинки роста тела позвонка и подвздошного хряща мини-поросенка в возрастном аспекте

Возраст	Гипертрофический слой пластинки роста тела позвонка	Гипертрофический слой пластинки роста подвздошного хряща
Новорожденный	0,230	0,170
Две недели	0,210	0,180
1 мес.	0,140	0,100

в них встречаются фигуры митозов, активный синтез высокополимерных ПГ. Вокруг клеток выявляются интенсивные реакции на высокополимерные ГАГ.

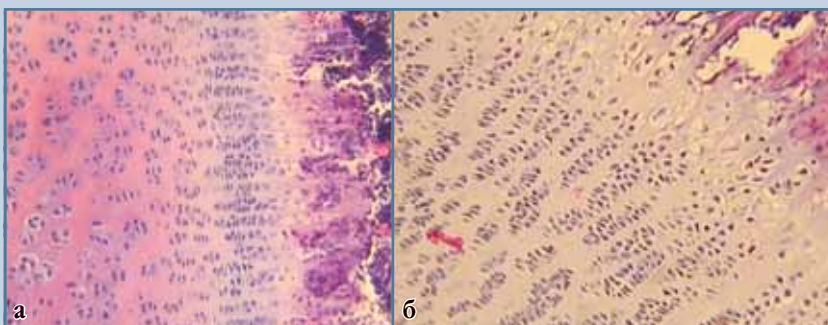
Клетки, прилежащие к зоне остеогенеза, находятся на конечной стадии дифференцировки. В этих участках матрикс и цитоплазма хондроцитов обнаруживают отрицательную реакцию на сульфатированные ПГ. Цитоплазма в некоторых клетках вакуолизирована, ядро пикнотически изменено, встречаются безъядерные клетки и клетки в апоптозе. Происходят внедрение сосудов, лизис матрикса и формирование примитивной костной ткани. Ультраструктурно определяются так называемые черные хондроциты. Противоположная картина наблюдается в ПР подвздошной кости.

Широкий гипертрофический слой клеток ПР подвздошного хряща (площадь $110980,21 \pm 3964,42$ мкм²; табл. 3) с интенсивной метохромазией матрикса и цитоплазмы. Фенотип клеток однороден: это крупные округлые клетки с центральным ядром и объемной цитоплазмой (я/ц отношения для хондроцитов гипертрофического слоя ПР тела позвонка – $0,23 \pm 0,06$; я/ц отношения для хондроцитов гипертрофического слоя ПР подвздошного хряща – $0,17 \pm 0,06$; табл. 6–9). В цитоплазме выявляются высокополимерные хондроитинсульфаты АС и диффузные гранулы гликогена. В некоторых местах костные балки перекрывают пограничную зону. Ультраструктурно предгипертрофические хондроциты – это актив-

**Рис. 7**

Сравнительный анализ экспрессии генов в пластинках роста (ПР) тела позвонка и подвздошной кости в разные периоды онтогенеза:

- 1 – ПР тела позвонка новорожденного поросенка;
- 2 – ПР подвздошной кости новорожденного поросенка;
- 3 – ПР тела позвонка двухнедельного поросенка;
- 4 – ПР подвздошной кости двухнедельного поросенка;
- 5 – ПР тела позвонка месячного поросенка;
- 6 – ПР подвздошной кости месячного поросенка;
- RT- – отрицательный контроль

**Рис. 8**

Пластинка роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) двухнедельного поросенка; окраска гематоксилин-эозином, ув. 100

ные, по морфологическим данным, клетки с крупным ядром, 1–2 ядрышками и диспергированным хроматином. На цитоплазматической мембране несколько коротких отростков, инвагинаты отсутствуют. В некоторых клетках наблюдается экзоцитоз в виде примембранных отшнурованных везикул. В цитоплазме – широкая эндоплазматическая сеть с рибосомами и полисомами. Цистерны эндоплазматического ретикулума расширены, заполнены гранулярным, электронно-плотным материалом. Комплекс Гольджи расположен равномерно, как приамерно, так и в центральных отделах клетки. Цистерны его с просветленным матриксом; на транслюсе большое количество везикул, рассредоточенных в цитоплазме. Многочисленные делящиеся митохондрии с просветленным матриксом и хорошо выраженными кристами равномерно распределены в цитоплазме. Лизосомы в виде единичных вакуолей располагаются примембранно.

В этот период в обеих ПР синтезируются агрекан и коллагены I и II типов (рис. 5).

В двухнедельном возрасте ПР тела позвонка и подвздошной кости сохраняют прежнюю архитектуру и деление на четыре зоны (рис. 8).

Как в предыдущем сроке, герминативный слой клеток все еще достаточно выражен, что свидетельствует о высокой потенции роста. В обеих ПР эти зоны одинакового размера, потенциальные возможности роста однотипны.

Малодифференцированные хондробласты этой зоны с узким ободком цитоплазмы и крупным ядром, в которой определяется экспрессия коллагена I типа. В матриксе определяются гиалуроновая кислота и хондроитинсульфаты АС. Ультраструктурная организация этих клеток соответствует первой постнатальной стадии развития (рис. 9).

Для зоны пролиферирующих клеток характерны усложнение синтезов, формирование гомогенного матрикса, содержащего высокополимерный

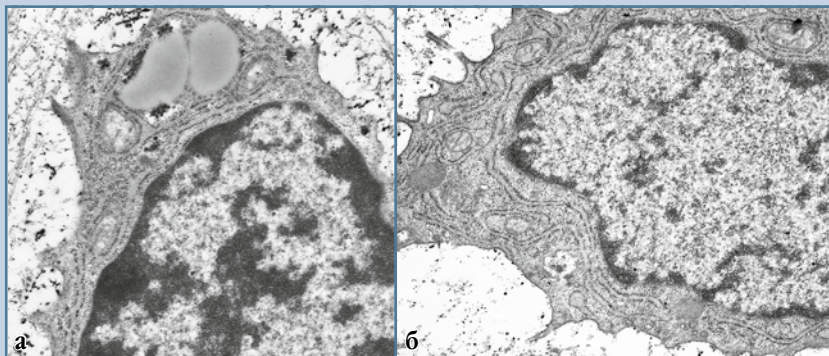


Рис. 9

Ультраструктурная организация малодифференцированных хондробластов пластинки роста тела позвонка (а) и подвздошного хряща (б) двухнедельного поросенка; ув. 5000

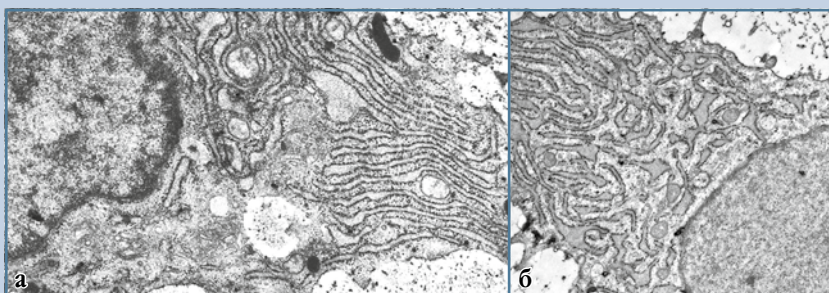


Рис. 10

Ультраструктурная организация высокодифференцированных хондробластов пластинки роста тела позвонка (а) и подвздошного хряща (б) двухнедельного поросенка; ув. 5000

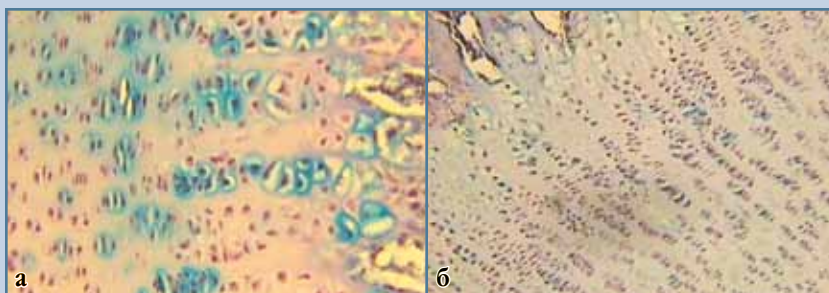


Рис. 11

Окраска альциановым синим пластинки роста тела позвонка, ув. 200 (а) и подвздошного хряща, ув. 100 (б) двухнедельного поросенка

агреган, связанный с коллагеном II типа. Накопление матрикса способствует рассредоточению клеток и формированию хондрометаболического

барьера. Экспрессия генов, синтез линк-белка и гиалуроновой кислоты указывают на фазу формирования высокополимерных ПГ, характерных

для более высокой степени структурной организации хрящевой ткани. В пользу продолжающегося процесса дифференцировки изогенных групп хондроцитов свидетельствует и экспрессия генов *Rax1* и *Rax9* (рис. 7).

Ультраструктурная организация клеток в этой зоне обнаруживает некоторое разнообразие. В верхнем слое клеток по-прежнему преобладают цитоплазматические органеллы, свидетельствующие об аутосинтетических процессах: примембранное расположение комплекса Гольджи с мелкими везикулами и более развитой цис-поверхностью. Эндоплазматическая сеть – широкая, но все еще в цитоплазме наблюдаются свободные рибосомы. Митохондрии с выраженными кристами и электронно-плотным содержимым рассредоточены по цитоплазме. Лизосомный аппарат единичен. В ядре 1–2 ядрышка и преимущественно примембранно расположенный хроматин (рис. 9). Подобная структурная организация характерна для малодифференцированных хондробластов. Наряду с этим, определяются хондробласты с более высокой ультраструктурной организацией. Ядерно-цитоплазматические отношения смещаются в сторону увеличения объема цитоплазмы (я/ц хондроцитов ПР тела позвонка – $0,36 \pm 0,10$; я/ц хондроцитов ПР тела позвонка – $0,38 \pm 0,13$; табл. 6–8). Вокруг таких клеток наблюдается накопление диффузно-расположенных ПГ, что свидетельствует о формировании лакун. Эухроматин в ядре расположен преимущественно равномерно. В центре ядра расположено два ядрышка. Увеличивается количество мембран и вакуолей комплекса Гольджи: часть из них прилежит к мембранам эндоплазматического ретикулума, некоторые – к клеточной мембране. Эндоплазматический ретикулум с широкими цистернами занимает значительную площадь цитоплазмы. Слой пролиферирующих клеток формирует пролифераты от 4–6 клеток, расположенных в лакунах, с отчетливо контурированным окололакунным пространством и выраженным хондрометаболиче-

ским барьером. В этот период наблюдается усложнение ультраструктурной организации клеток и матрикса. Ядро располагается ацентрально, содержит 1–3 ядрышка. Ядерная мембрана с инвагинатами; эухроматин рассредоточен по всей нуклеоплазме. В цитоплазме выявляются фагосомы; гладкая эндоплазматическая сеть широкая, цистерны расширены с электронно-плотным содержимым; большое количество вакуолей разного размера, контактирующих с плазматической мембраной. Комплекс Гольджи с большим количеством вакуолей, диффузно расположенными в цитоплазме (рис. 10).

Эти зоны по площади и морфологическому строению однотипны как для ПР тела позвонка, так и для ПР подвздошной кости.

Колонковые хондробласты занимают самую большую площадь ПР тел позвонков ($93384,54 \pm 2275,93 \text{ мкм}^2$), но в ПР подвздошной кости этот слой значительно шире ($280150,47 \pm 15055,35 \text{ мкм}^2$; табл. 2–4). Надо полагать, что процесс дифференцировки в пред- и гипертрофические хондроциты происходит более отсрочено, хотя сам процесс внутри ПР синхронизован, площади слоев ПР подвздошного хряща соотносятся с таковыми ПР тел позвонков. Хондроциты колонкового слоя по структуре не отличаются от хондроцитов ранних стадий постнатального развития, но наблюдается интенсификация синтетических процессов. Синтез высокополимерных ПГ, гликогена (рис. 11), формирование хондронной структуры на фоне экспрессии генов пролиферации Sox9, аттрекана, линк-белка (рис. 7) свидетельствуют о высокой степени дифференцировки и переходе от стадии «хондробласт» к стадии «хондроцит».

Гипертрофический слой клеток ПР подвздошного хряща в этот период значительно шире ($135583,96 \pm 14074,65 \text{ мкм}^2$), чем в ПР тела позвонка ($57851,98 \pm 1480,66 \text{ мкм}^2$; табл. 2–4). Интенсивность синтезов и молекулярные составляющие – хондроитинсульфаты АС, гиалуроновая кислота, гликоген (в препаратах обе-

их структур однотипный collagen X, VI типов). Ядерно-цитоплазматические отношения гипертрофических хондроцитов ПР тела позвонка $0,21 \pm 0,07$ и гипертрофических хондроцитов ПР подвздошного хряща $0,18 \pm 0,05$ указывают на сохранение уровней дифференцировки клеток, которые регистрировались у новорожденных поросят (табл. 6–9).

Определяется интенсивная Хейл-реакция мембран хондроцитов и в окружающем матриксе, что свидетельствует о формировании высокополимерных ПГ. Клетки предгипертрофического слоя – это стадия высокой степени дифференцировки и подготовки к процессу оссификации и апоптозу.

Клетки, прилежащие к зоне остеогенеза, – это крупные клетки с пикнотичным ядром и вакуоляризированной цитоплазмой, некоторые клетки находятся в состоянии апоптоза. Сосуды пенетрируют матрикс, вокруг них формируется примитивная костная ткань. Некоторые хондроциты окружаются костной тканью и, по морфологическим данным, сохраняют

свою структуру, другие – подвергаются апоптозу. Значительный интерес представляет тот факт, что часть клеток, окруженных костной тканью, сохраняет синтетические потенции, но происходит конверсия синтеза структурных компонентов, характерных для остеогенной дифференцировки. Синтез щелочной фосфотазы, коллагена I типа и ультраструктурная организация подтверждают возможность дифференцировки «хондроцит – остеобласт». Ультраструктурная организация высокодифференцированных хондроцитов весьма разнообразна: типичные апоптозные тельца, безъядерные клетки, хондроциты, сохраняющие свою структуру и находящиеся на разной стадии дистрофии. В этих клетках нарушена целостность мембран эндоплазматической сети и заполнена электронно-плотным содержимым. Выявляются аутофагосомы, лизосомы и огромные жировые включения. Комплекс Гольджи и митохондрии не выявляются. Встречаются темные хондроциты.

В этот период экспрессируются коллагены I и II типа, аттрекан, Pax1,

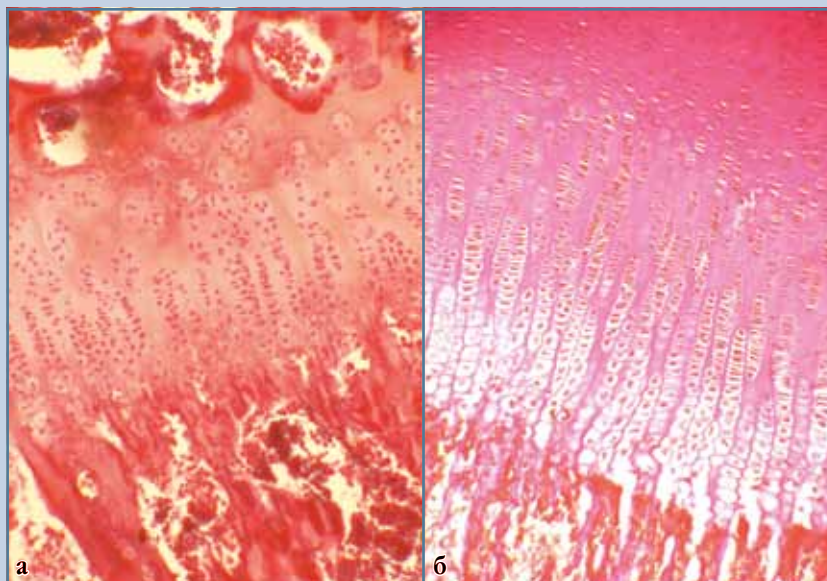


Рис. 12

Пластика роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) месячного поросенка; окраска гематоксилин-эозином, ув. 100

Rax9 и Sox9 (рис. 7). Интенсивные синтезы ПГ, ультраструктурная организация клеток ПР и ядерно-цитоплазматические отношения свидетельствуют об интенсивно происходящих процессах, характеризующихся пролиферацией, дифференцировкой и адекватным остеогенезом в области ПР тел позвонков и подвздошной кости.

У поросят месячного возраста соотношение слоев в ПР несколько меняется за счет расширения зоны остеогенеза, которая является преобладающей в обеих зонах роста, но в ПР подвздошной кости несколько шире (рис. 12). Значительно сужен слой камбиальных клеток в обеих ПР за счет увеличения зоны пролиферации. Колонковый слой ПР подвздошного хряща ($257424,90 \pm 15900,28 \text{ мкм}^2$) имеет большую площадь, по сравнению с колонковым слоем ПР тела позвонка ($82768,52 \pm 3671,55 \text{ мкм}^2$; табл. 2–4). Степень дифференцировки клеток колонкового слоя в обеих ПР одинакова (я/ц отношения колонковых хондроцитов ПР тела позвонка – $0,36 \pm 0,10$; я/ц отношения колонковых хондроцитов ПР подвздошного хряща – $0,35 \pm 0,13$; табл. 6–8). Площадь, занимаемая гипертрофическим слоем ПР подвздошного хряща, значительно больше ($179110,15 \pm 13039,29 \text{ мкм}^2$) площади, занимаемой гипертрофическим слоем ПР тела позвонка ($64361,51 \pm 2605,18 \text{ мкм}^2$; табл. 2–5). По отношению к двухнедельному сроку я/ц отношения для гипертрофических хондроцитов обеих ПР несколько снизились (я/ц отношения гипертрофических хондроцитов ПР тела позвонка – $0,14 \pm 0,05$; я/ц отношения гипертрофических хондроцитов ПР подвздошного хряща – $0,10 \pm 0,03$; табл. 6–9). В цитоплазме и матриксе хондроцитов обеих ПР выявляются высокополимерные хондроитинсульфаты АС, кератансульфат (рис. 13).

К концу 1-го месяца в ПР тел позвонков и подвздошной кости мини-поросят сформирована хондронная структура с соответствующими морфологической и ультраструктурной характеристиками (рис. 14). Иммуногистохимически в обеих ПР

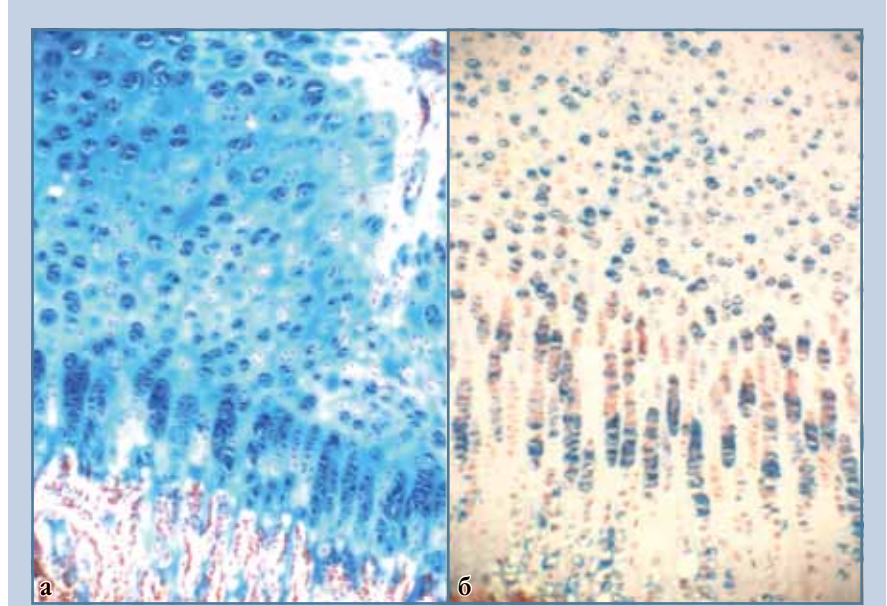


Рис. 13

Протеогликаны в пластинке роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) месячного поросенка; окраска альциановым синим, ув. 200

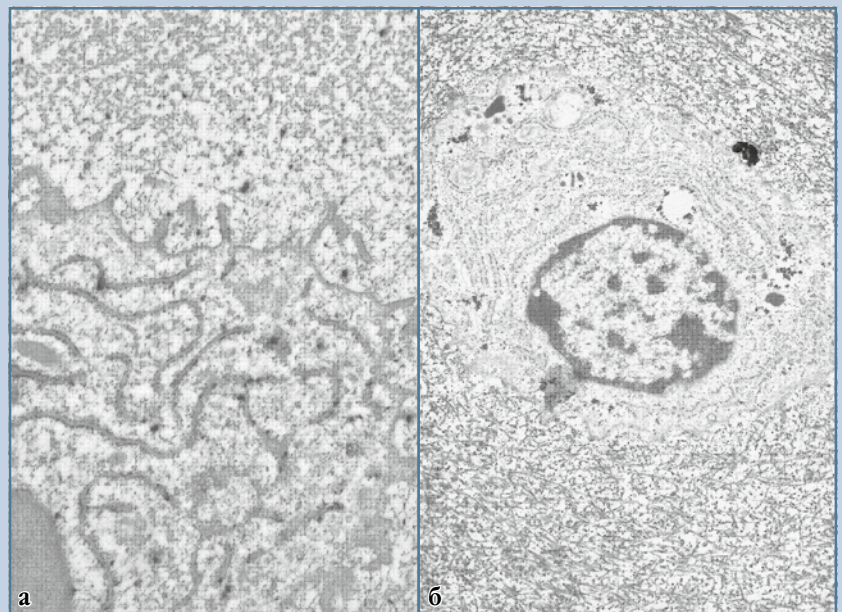
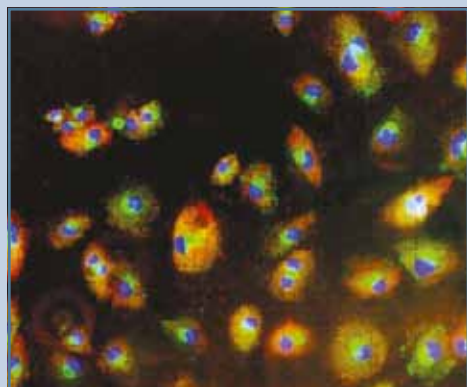


Рис. 14

Ультраструктура хондробласта пластинки роста тела позвонка (а) и подвздошной кости (б) месячного поросенка; ув. 5000

выявляются аггрекан и коллаген I типа (рис. 15). В обеих ПР на фоне экспрессии генов Sox9, аггрекана, люмикана, коллагенов I, II и IX типов экспресси-

руются ген гормона роста и трансформирующий фактор роста, что свидетельствует о включении гормональной регуляции процесса роста.

**Рис. 15**

Иммуногистохимическая реакция с антителами к агрекану (красный цвет) и к коллагену I типа (зеленый цвет) в пластинках роста тела позвонка и подвздошной кости месячного поросенка; ув. 200

Биохимические данные. В обеих ПР новорожденных мини-поросят соотношение ПГ/ГАГ (табл. 10, 11) свидетельствует о низком полимерном состоянии ГАГ, представленных преимущественно хондроитинсульфатами АС. Высокая степень сульфатирования (соотношение СГАГ/УК) указывает на присутствие дерматансульфата (ХС-В) в обеих ПР поросят при рождении (рис. 16, 17). В возрасте двух недель количество СГАГ в ПР тела позвонка повышается в 1,3 раза.

Таблица 10

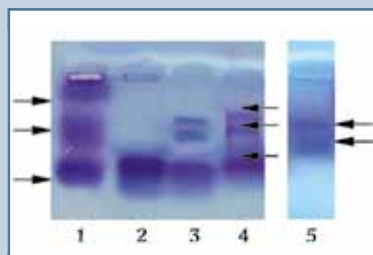
Содержание химических компонентов гликозаминогликанов (ГАГ) в хряще пластинки роста тел позвонков мини-поросят, мкг чистого вещества на мг сухой ткани

Возраст	Сульфатированные ГАГ	Уроновые кислоты	Галактоза	H ₂ O, %
Новорожденный	2,960 ± 0,230	0,600 ± 0,043	Следы	78,20 ± 3,82
Две недели	4,020 ± 0,590	0,810 ± 0,070	0,260 ± 0,023	65,30 ± 3,21
1 мес.	3,300 ± 0,210	2,323 ± 0,180	0,910 ± 0,030	67,70 ± 5,45

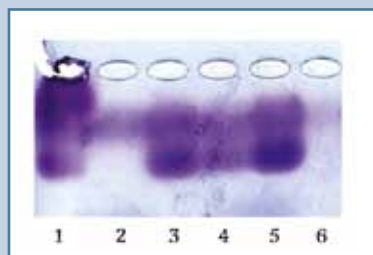
Таблица 11

Содержание химических компонентов гликозаминогликанов (ГАГ) в хряще пластинки роста подвздошного хряща мини-поросят, мкг чистого вещества на мг сухой ткани

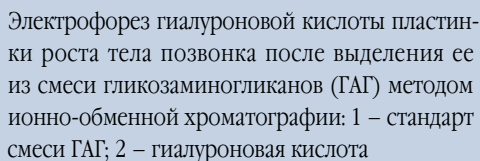
Возраст	Сульфатированные ГАГ	Уроновые кислоты	Галактоза	H ₂ O, %
Новорожденный	0,550 ± 0,004	0,110 ± 0,001	Следы	75,00 ± 1,28
Две недели	0,960 ± 0,008	0,200 ± 0,003	Следы	68,00 ± 5,43
1 мес.	1,200 ± 0,008	0,420 ± 0,036	0,330 ± 0,028	63,00 ± 6,05

**Рис. 16**

Электрофорез гликозаминогликанов (ГАГ) пластинки роста тела позвонка мини-поросенка в возрастном аспекте в геле агарозы в 0,1 М буфере ацетата бария pH 8,0: 1 – стандарт хондроитинсульфаты САВС + гепаран-сульфат; 2 – нативные ГАГ новорожденного поросенка; 3 – нативные ГАГ двухнедельного поросенка; 4 – нативные ГАГ месячного поросенка; 5 – ГАГ месячного поросенка после обработки хондроитиназой АС

**Рис. 17**

Электрофорез гликозаминогликанов (ГАГ) пластинки роста тела позвонка и подвздошного хряща месячного мини-поросенка в геле агарозы в буфере 0,1 М ацетата бария pH 8,0: 1 – стандартная смесь ГАГ; 3, 5 – исходные ГАГ из пластинки роста тела позвонка; 4 – исходные ГАГ из пластинки роста подвздошного хряща; 2, 6 – ГАГ и после обработки хондроитиназой АС из пластинки роста тела позвонка и подвздошного хряща



Последовательность синтезов в исследуемых образцах: гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты АС, кератансульфат и экспрессия генов, а также ультраструктурная организация на стадиях хондрогенеза – однотипны.

На фоне последовательности хондрогенной дифференцировки в исследуемых ПР выявлен отсроченный во времени остеогенез в ПР подвздошной кости. Симптом Risser не является абсолютным показателем потенций

роста и прогрессирования деформаций позвоночника.

Полученные данные являются основанием для экспериментальной апробации способа заместительной терапии для коррекции процесса роста.

Литература

1. Васьюра А.С., Новиков В.В., Михайловский М.В. и др. Хирургическое лечение сколиоза с применением метода транспедикулярной фиксации // Хирургия позвоночника. 2011. № 2. С. 27–34.
2. Русова Т.В., Рыкова В.И., Корель А.В. и др. Гликозаминогликаны пластинки роста тела позвонков у больных идиопатическим сколиозом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005. Т. 139, № 6. С. 738–740.
3. Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свины: генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск, 2010.
4. Ali Fazal M, Edgar M. Detection of adolescent idiopathic scoliosis. Acta Orthop Belg. 2006;72:184–186.
5. Campbell RM, Smith MD, Mayes TC, et al. The characteristics of thoracic insufficiency syndrome associated with fused ribs and congenital scoliosis. J Bone Joint Surg Am. 2003;85:399–408.

References

1. Vasyura AS, Novikov VV, Mikhailovsky MV, et al. [Surgical treatment of scoliosis using transpedicular fixation]. Hir Pozvonoc. 2011;(2):27–34. In Russian.
2. Rusova TV, Rykova VI, Korel AV, et al. [Glycosaminoglycans of the vertebral body growth plate in patients with idiopathic scoliosis]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2005;139(6):738–740. In Russian.
3. Tikhonov VN. [Laboratory Mini-Pigs: Genetics and Medical Biological Using]. Novosibirsk, 2010. In Russian.
4. Ali Fazal M, Edgar M. Detection of adolescent idiopathic scoliosis. Acta Orthop Belg. 2006;72:184–186.
5. Campbell RM, Smith MD, Mayes TC, et al. The characteristics of thoracic insufficiency syndrome associated with fused ribs and congenital scoliosis. J Bone Joint Surg Am. 2003;85:399–408.

Адрес для переписки:

Зайдман Алла Михайловна
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
НИИТО,
AZaydman@nniito.ru

Статья поступила в редакцию 15.05.2013

А.М. Зайдман, д-р мед. наук, проф.; М.А. Садовой, д-р мед. наук, проф.; Е.Л. Строчкова, науч. сотрудник; А.В. Корель, канд. биол. наук; Т.В. Русова, канд. биол. наук, Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна.

A.M. Zaidman, MD, DMSc, Prof.; M.A. Sadovoy, MD, DMSc, Prof.; E.L. Strokova, researcher; A.V. Korel, PhD in Biology; T.V. Rusova, PhD in Biology, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsiyvan.