

An experimental study of influence of some kinds of two-level anterior cervical interbody fusion C5/7 for quantitative and qualitative characteristics of redistribution of internal tension at adjacent levels C4-5 and C7-Th I in physical model of the cervical spine has performed. It was revealed that the most unfavorable influence to adjacent levels has two-level anterior cervical interbody fusion without additional anterior interbody plating. Two-level anterior cervical interbody fusion after restoration of interbody support and anterior interbody plating promotes renewal of segmental cervical sagittal contour and prophylaxis of disproportional redistribution of internal tension at adjacent levels to fused ones.

Надійшла до редакції 30.03.2009 р.

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасва, 2009
УДК 611.018.3: 576.35

Особенности размножения хондроцитов в зонах роста коротких и длинных костей амфибий и птиц

А.Я.Житников

Институт зоологии им.И.И.Шмальгаузена НАН Украины
(директор – член-корр. НАН Украины, профессор И.А.Акимов)
Киев, Украина

Механизм регулирования продольного роста длинных и коротких костей амфибий и птиц заключается в формировании в пре- и постнатальном онтогенезе различных по размерам и концентрации хондроцитов функциональных зон эпифизарных хрящей. Темпы восстановления популяции хондроцитов обеспечиваются за счет разной продолжительности митотического цикла и пула размножающихся хондроцитов, количества циклов репродукции до начала терминальной дифференцировки.

Ключевые слова: скелет, конечности, эпифизарные хрящи, хондроциты, пролиферация.

Введение

Размножение хондроцитов в эпифизарных хрящах является косвенным подтверждением интенсивности роста скелетных закладок. Делятся, как правило, менее специализированные клетки, дифференцирующиеся в более зрелые формы, выполняющие в скелетном органе конкретные структурно-метаболические функции при замещении хрящевой ткани костной. В эпифизарных хрящах костей это зоны пролиферирующих хондроцитов [4-6]. Количество ДНК-синтезирующих хондроцитов в этих структурных зонах эпифизарных хрящей является в определенной степени индикатором интенсивности роста скелетных закладок. Однако продолжительность митотического цикла, соотношение делящихся и неделящихся хондроцитов в эпифизарных хрящах различных по интенсивности роста костях еще не установлены [5].

Целью исследования явилось в экспериментах с однократным и многократными введениями ³H-тимидина определить и сопоставить параметры митотического цикла и пула раз-

множающихся хондроцитов при развитии коротких и длинных костей в скелете свободных конечностей амфибий и птиц.

Материалы и методы исследования

Проведено несколько опытов с радиоактивным маркером пролиферации клеток – ³H-тимидином. Для этих целей использованы эмбрионы кур, начиная с 5 суток инкубации до выклева из яйцевых оболочек (21 сутки), цыплята одно- и четырехнедельного возраста. Исследования на земноводных проведены на личинках лягушки травяной 41-42, 43-44 стадий развития и после метаморфоза (54 стадия) и охватывают период роста от 30 до 70 суток.

Методические приемы с ³H-тимидином для исследования в реальном временном диапазоне размножения хондроцитов в развивающихся коротких и длинных костях этих классов позвоночных подбирались с учетом особенностей их индивидуального развития (яйцевые и личиночные). Схемы экспериментов с радионук-

лидом позволили рассчитать временные параметры митотического цикла хондроцитов (T_c), соотношение делящихся и неделяющихся клеток (N_p), а по изменению средней интенсивности метки над ядрами — определить количество повторных делений хондроцитов в зонах пролиферации быстро и медленно растущих костей.

Радионуклид в дозе 1100 кБк на яйцо вводили в воздушную камеру на стадии эмбриогенеза 5, 9 и 15 суток, а также интраперитонеально 7-дневным и 1-месячным цыплятам в дозе 74 кБк/г массы тела. Через 1 ч в воздушную камеру яиц добавляли физиологический раствор и его смесь с остатками радионуклида удаляли, создавая эффект импульсного включения 3H -тимидина. Закладки скелета задних конечностей фиксировали в 10%-м формалине через 1, 3, 9 ч, 1, 6 и 10 суток. В другом эксперименте 3H -тимидин в дозе 370 кБк на яйцо инъецировали в воздушную камеру на 9 и 19 сутки развития и в дозе 37 кБк/г 2-дневным цыплятам многократно с интервалом 7 ч в течение 35-49 ч. Задние конечности фиксировали через 1 ч после каждой инъекции радионуклида. Для расчетов продолжительности фазы синтеза ДНК хондроцитов зон роста длинных и коротких костей проведен опыт с введением животным малой (37 кБк/г) и через 4 ч большой (185 кБк/г) дозы 3H -тимидина.

В опытах на земноводных радионуклид вводили головастикам указанных ранее стадий развития в дозе 74 кБк/г. Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 4, 12, 24, 36 и 96 ч после импульсного введения 3H -тимидина. В другой группе земноводных (43-44 стадия и после метаморфоза) 3H -тимидин инъецировали в дозе 37 кБк/г многократно с интервалом 7 ч на протяжении 42 ч. Животных умерщвляли через час после каждого введения радионуклида, выделяли задние конечности и фиксировали их в 10%-м формалине. На гисторадиографических препаратах, окрашенных гематоксилином

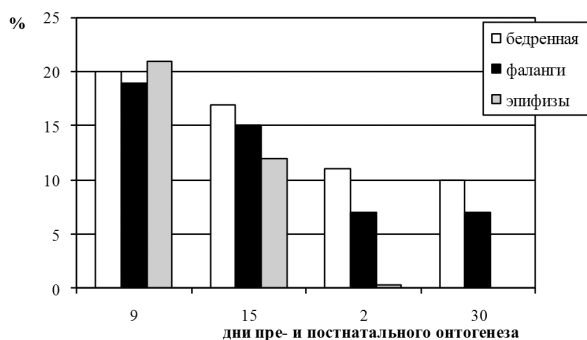


Рис. 1. Изменение индекса меченых 3H -тимидином хондроцитов в зонах пролиферации и в эпифизах скелетных закладок задней конечности курицы.

Майера — сафранином-эозином, исследовали пролиферативную активность хондроцитов. С этой целью подсчитывали меченые ядра над 500-1000 хондроцитами в длинных и коротких костях при однократном и многократном введении 3H -тимидина. Определяли интенсивность метки 3H -тимидина над ядрами хондроцитов через разное время после однократного введения радионуклида. Данные обработаны с помощью программы Window 2000, Statistica.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные в различных экспериментах с 3H -тимидином данные убеждают в том, что в зонах пролиферации эпифизарных хрящей длинных и коротких костей индекс меченых 3H -тимидином хондроцитов в период с 9 до 21 суток эмбриогенеза кур существенно не изменяется (рис.1).

В эпифизах длинных костей эмбрионов и плодов птиц значительное количество хондроцитов постепенно выходит из митотического цикла, и к моменту их выклева из яйцевых оболочек в фазе синтеза ДНК находится менее 1% клеток. В эпифизах коротких костей темпы репродукции хондроцитов сохраняются высокими при значительно меньшем абсолютном количестве клеток. Однако эти данные не дают исчерпывающей информации о темпах пролиферации хондроцитов в зонах роста костей, так как увеличение или восстановление численности камбиальной клеточной популяции при постоянном переходе клеток эпифизарных хрящей в гипертрофированное состояние может зависеть как от продолжительности митотического цикла, так и соотношения делящихся и неделяющихся хондроцитов (пролиферативный пул). Эти показатели определяли при многократных введениях в инкубируемые яйца и 2-дневным цыплятам 3H -тимидина, а также графическим методом, когда радионуклид вводили импульсно на разное время (от 1 ч до 9 суток). Расчеты данных показывают, что продолжительность митотического цикла хондроцитов зон пролиферации длинных и коротких костей существенно не отличается, составляя в разные периоды развития скелета 21-28 ч.

Каким же образом обеспечивается компенсация клеток в этих зонах при их терминальной дифференцировке и при разных темпах роста скелетных закладок? Прежде всего отличается абсолютное количество размножающихся хондроцитов в длинных и коротких костях. Если в зонах пролиферации длинных костей в направлении от эпифизов к зоне созревания насчитыв-

вается до 120 клеток, то в коротких костях всего лишь 15-20. Поэтому большая популяция размножающихся хондроцитов обеспечивает и большее их образование при прохождении митотического цикла и, следовательно, компенсацию того количества, которое гипертрофируется при продольном росте кости. Однако для оценки ростовых возможностей хондроцитов эпифизарных хрящей наиболее объективным является показатель удвоение исходной клеточной популяции (T_2). Он прямо зависит от продолжительности митотического цикла хондроцитов (T_c) и находится в обратной связи с пролиферативным пулом (N_p): $T_2 = T_c/N_p$. Если удвоение клеточной популяции в зонах роста преобладает над количеством хондроцитов, перешедших в гипертрофированное состояние, то в этих участках повышается их концентрация. Хондроциты сильно уплощаются, располагаются в виде монетных столбиков вдоль длинной оси закладки. В каждом таком столбике в длинных костях может быть до 120 клеток, а в коротких – до 15-20. Таким образом, в определенный период развития скелета птиц замедление скорости роста костей при участии эпифизарных хрящей связано с ингибированием терминальной дифференцировки хондроцитов при сохранении темпов их размножения. В этих зонах накапливается значительное количество хондроцитов при малом объеме внеклеточного гиалинового матрикса. Между терминальной дифференцировкой хондроцитов и их размножением устанавливаются такие взаимоотношения по темпам проявления, когда увеличение делящейся популяции происходит быстрее, чем подвергается гипертрофии.

Особенность роста костных закладок скелета конечностей у земноводных такова, что исключает многократное деление хондроцитов в эпифизарных хрящах. Клетки делятся здесь один раз, до того как приобретают признаки созревающих. Однако те из них, которые находятся ближе к эпифизам и до приобретения свойств

созревающих успевают делиться несколько раз, располагаются в «изогенных» группах парами.

Расчеты показывают, что пролиферативная активность хондроцитов в зонах роста длинных и коротких костей в разные периоды развития земноводных изменяется за счет продолжительности митотического цикла (T_c) и соотношения в популяции делящихся и неделящихся клеток (N_p). Продолжительность цикла постепенно увеличивается до 40 ч, а пролиферативный пул снижается до 40-50% (рис. 2).

Таким образом, относительно медленному росту костей у земноводных (отличается в 10 раз от птиц) соответствует структура формирующихся эпифизарных хрящей и темпы размножения хондроцитов. Этот процесс регулируется на уровне количества пролиферирующих хондроцитов или же продолжительности митотического цикла. У земноводных в зонах роста костей темпы терминальной дифференцировки хондроцитов и их деление взаимосвязаны так, что обеспечивают лишь восстановление популяции клеток в зоне пролиферации. Однако их концентрация здесь постепенно снижается, а объем гиалинового матрикса возрастает.

Формирование в костях скелета свободных конечностей эпифизарных хрящей с высокой концентрацией хондроцитов происходит за счет большего количества циклов репродукций клеток до перехода в терминальную фазу дифференцировки. Такие клеточные популяции являются растущими и одновременно обновляющимися. Если же терминальная дифференцировка хондроцитов начинает доминировать и восстановление клеточной популяции в зонах размножения отстает, то количество клеток здесь постепенно уменьшается и эпифизарные хрящи прекращают функционировать как структуры, обеспечивающие рост скелетных закладок [1, 7, 8]. Регуляторами таких взаимодействий для животных разных классов выступают системные гормоны, витамины и иные общие и локальные факторы [3, 9, 10]. Известно, что генетические и гуморальные механизмы контроля пролиферации и дифференцировки клеток (следовательно, роста) отличаются, однако те и другие затрагивают в органогенезах репрессию и дерепрессию соответствующих генов [2, 7, 8]. Если переход клеток в гетеросинтетическую интерфазу (выход из митотического цикла) подразумевает последующее выполнение ими определенных функций, обеспечивающих лишь синтез специфических макромолекул [1], то контроль роста за счет изменения продолжительности митотического цикла скорее отражает изменение уровня дифференцировки всей пролиферирующей

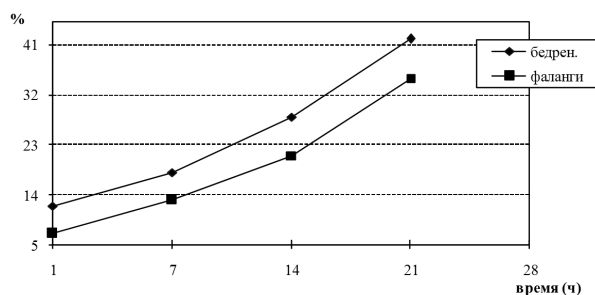


Рис. 2. Изменение количества меченых хондроцитов в зонах пролиферации костей лягушки травяной 54 стадии развития (70 сут.) после многократных введений 3H -тимидина.

популяції хондроцитів в різні періоди розвитку скелета [4]. Размножуюча популяція хондроцитів в течение всего периода продольного роста костей обеспечивает обновление при терминальной дифференцировке, а также внутренний рост эпифизарных хрящей. Изменение численности пролиферирующих хондроцитів в эпифизарных хрящах длинных и коротких костей в онтогенезе земноводных и птиц происходит в результате перехода в гетеросинтетическую интерфазу (неделяющаяся фракция клеток) их разного количества. Формируются эпифизарные хрящи с разной концентрацией хондроцитів в зонах размножения.

Литература

1. Садофьев Л.А., Подгорная О.И. Дифференцировка остеогенных клеток в культуре // Цитология. – 1999. – Т.41, №10. – С. 876-885.
2. Серов О.Л. Генный и хромосомный контроль развития // Онтогенез. – 2004. – Т.35, №4. – С. 245-253.
3. Стойка Р.С., Панчук Р.Р., Стойка Б.Р. Полипептидные факторы роста в процессах эмбрионального развития и опухолевого роста // Онтогенез. – 2004. – Т.35, №4. – С. 254-272.
4. Byers S., Moore A., Quantitative histomorphometric analysis of the human growth plate from birth to adolescence // Bone. – 2000. – Vol. 27, №4. – P. 495-501.
5. Cubo J. Process heterochronies in endochondral ossification // J. Theor. Biol. – 2000. – Vol. 205. – P. 343-353.
6. Kember N.F. et al. Comparative cell kinetics of avian growth plates // Research in Veterinary Science. – 1990. – Vol. 49. – P. 283-288.
7. McCulloch C.A. et al. Site-specific regulation of osteogenesis: Maintenance of discrete levels of phenotypic expression in vitro // Anat. Rec. – 1989. – Vol. 223, №1. – P. 27-34.
8. Nilsson A. et al. Growth hormone regulation of growth hormone receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes // J. Endocrinol. – 1990. – Vol. 125. – P. 67-74.
9. Robson H. et al. Interaction between GH, IGF-1, glucocorticoids and thyroid hormones during skeletal growth // Pediatr. Res. – 2002. – Vol. 52. – №2. – P. 137-147.
10. Benoit S.J. et al. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation // Genes. Dev. – 1999. – Vol. 13, №16. – P. 2072-2086.

А.Я.Житніков. Особливості розмноження хондроцитів у зонах росту коротких та довгих кісток амфібій та птахів. Київ, Україна.

Ключові слова: кінцівки, епіфізарні хрящі, хондроцити, проліферація.

Формування структурних зон епіфізарних хрящів, які відрізняються розмірами та концентрацією хондроцитів, являє собою механізм, що забезпечує різний за інтенсивністю ріст у довжину довгих та коротких кісток. Швидкість відновлення популяції хондроцитів в епіфізарних хрящах при заміщенні хрящової тканини кістковою забезпечується за рахунок зміни тривалості мітотичного циклу та пула клітин, що розмножуються, а також кількості циклів репродукції хондроцитів у зонах розмноження до початку термінального диференціювання.

A. Ya. Zhitnikov. The peculiarities of chondrocytes proliferation in growth zones of amphibian and avian short and long bones. Kyiv, Ukraine.

Key words: skeleton, extremities, epiphyseal cartilages, chondrocytes, proliferation.

The effective method for regulating longitudinal growth of long and short bones in amphibian and aves lies in the formation of epiphyseal cartilages showing chondrocytes with different concentration and metabolic activity. During the growth of the skeleton the temps of restoration of chondrocytic population in the ephiphyseal cartilages is maintained due to different duration of the mitotic cycle and pool of proliferating cells, the number of chondrocyre reproduction cycles prior of the onset of terminal differentiation.

Надійшла до редакції 30.03.2009 р.