

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ ПРЕДПОСЫЛКИ НАБУХАНИЯ И ГИПЕРТРОФИИ ХОНДРОЦИТОВ**Житников А.Я., Исламова М.А.***Институт зоологии им. П. П. Шмальгаузена НАН Украины, Киев*

Житников А.Я., Исламова М.А. Метаболічні та структурні предумови набухання та гіпертрофії хондроцитів // Український морфологічний альманах. - 2009. - Том 7, №2. - С. 43-46.

Гіпертрофія хондроцитів в епіфізних хрящах скелету являє собою збільшення об'єму клітин з відносною швидкістю, що супроводжується дезорганізацією цитоплазматичних органелів та поступовою втраченою біосинтетичних функцій. Тривалість набухання та гіпертрофії клітин може відрізнятися, що визначає швидкість співвідносного збільшення коротких та довгих кісток у хребетних. В цей період комплексом метаболічних та структурних змін у хондроцитах та гіаліновому матриці епіфізних хрящів створюються специфічні локальні умови підготовки хряща до заміщення кістковою тканиною.

Ключові слова: епіфізний хрящ, хондроцити, метаболізм, термінальне диференціювання

Житников А.Я., Исламова М.А. Метаболические и структурные предпосылки набухания и гипертрофии хондроцитов // Украинский морфологический альманах. - 2009. - Том 7, №2. - С. 43-46.

Гипертрофия хондроцитов в эпифизарных хрящах скелетных закладок представляет собой увеличение объема клеток с относительной скоростью, что сопровождается дезорганизацией цитоплазматических органоидов и постепенной утратой биосинтетических функций. Продолжительность гипертрофии хондроцитов варьирует в разных скелетных закладках, определяя скорость соотносительного увеличения коротких и длинных костей у позвоночных. В этот период комплексом метаболических и структурных изменений в хондроцитах и гиалиновом матриксе эпифизарных хрящей создаются специфические локальные условия для подготовки хряща к замещению костной тканью.

Ключевые слова: эпифизарный хрящ, хондроциты, метаболізм, терминальная дифференцировка

Zhitnikov A.Ya., Islamova M.A. Metabolic and structural prerequisites for the chondrocytes' swelling and hypertrophy // Украинский морфологический альманах. - 2009. - Том 7, №2. - С. 43-46.

Hypertrophy of chondrocytes in the epiphyseal cartilages of skeletal anlagen is represented by growth of cells with changing relative speed accompanied by disorganization of cytoplasmic organelles and gradual loss of biosynthetic functions. The duration of chondrocytes' hypertrophy varies in different skeletal anlagen, thus determining the velocity of correlative enlargement of short and long bones in vertebrates. In that period, by the complex of metabolic and structural changes in chondrocytes and hyaline matrix of the epiphyseal cartilages the specific local conditions are created for cartilage substitution by bone tissue.

Key words: epiphyseal cartilage, chondrocytes, metabolism, hypertrophy.

В епіфізних хрящах коротких і довгих кісток різноманітне хондроцитів забезпечує внутрішній ріст хряща і компенсацію кліток, які піддаються термінальній диференції [4]. Ці процеси розблені в пространстві і во часі і слують один за другим. Так, продольний ріст діафіза скелетної закладки супроводжується поступовим угасанням проліферативної активності хондроцитів епіфізних хрящів з одночасною інтенсифікацією біосинтезу білково-углеводних макромолекул, формують гіаліновий матрикс. В наступному хондроцити гідратуються, збільшуються в об'ємі, створюючи разом з матриксом сприятливі умови для періостального і енхондрального остеогенезу [5]. Считается, що в кожному епіфізарному хрящі діаметр, якого досягає гіпертрофованний хондроцит в зонах заміщення хрящової ткани кісткової, відображає інтенсивність росту скелетної закладки [7]. Однак порівняльне дослідження цих процесів у тварин різних класів, відрізняються особливостями росту кісток в онтогенезі, такої висновку не підтверджують [2,10].

Цель исследования - установить метаболіческие и структурные предпосылки, приводящие к гидратации хондроцитов и роль объема клеток

и темпов терминальной дифференцировки в продольном росте костей.

Материал и методы. Для сравнительного исследования были подобраны биологические объекты, включающие различных позвоночных (крысы белые, кроли, летучие мыши, куры, лягушки). Развитие и морфометрические параметры продольного роста исследовали в динамике, ориентируясь на суставной и эпифизарный хрящ в длинных и коротких костях конечностей и в грудине. Биосинтетическую активность хондроцитов в зонах созревания и гипертрофии оценивали в экспериментах с использованием радиоактивных индикаторов коллагенового (³H-глицин и ³H-пролин), гликозаминогликанового (³⁵S-сульфат натрия) и полисахаридного (³H-глюкоза) биосинтезов. Радионуклиды вводили животным отдельно, внутрибрюшинно, импульсно на 1 ч, из расчета от 37 до 370 кБк/г массы тела. Готовили радиоавтографические и гистологические препараты костей. Интенсивность биосинтеза различных типов макромолекул оценивали путем подсчета зерен восстановленного серебра фотоэмульсии над хондроцитами и матриксом хряща. Диаметр гипертрофованных хондроцитов (высоту) и ширину всей зоны с такими клетками измеряли по длинной оси кости. Морфометрические данные ре-

зультатов исследования обработаны с использованием программы Statistica 6. Для исследования ультраструктурных изменений в гипертрофирующихся хондроцитах использовали эпифизарные хрящи длинных и коротких костей 10-суточных крыс и кроликов, 1-недельных цыплят. Из костей вырезали отдельные сегменты хряща, соответствующие исследуемым зонам (1мм²). Материал фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,2-7,4) в течение 30-45 мин. После кратковременной промывки в фосфатном буфере образцы помещали в осмиевый фиксатор на 1,5 ч. Затем проводили обезвоживание в этанолах, насыщенном уранилацетатом, и заливали в эпон-812. Готовили ультратонкие срезы, которые дополнительно контрастировали и исследовали в электронном микроскопе «Тесла ВС-500».

Результаты и их обсуждение. Рост скелетных закладок с участием эпифизарных хрящей предполагает обязательную терминальную дифференцировку хондроцитов и формирование по периметру хряща с такими клетками периостальной кости. Со стороны же костно-мозговой полости на продольных минерализованных фрагментах не резорбированного хондрокластами хрящевого матрикса формируется энхондральная кость [5]. Анализ препаратов с радионуклидами показал, что повышение биосинтетической активности уплощенных хондроцитов зоны пролиферации сопровождается и значительным увеличением объема клеток, которые в структуре эпифизарных хрящей выделяются как созревающие. Компетентность к усилению биосинтезов хондроциты приобретают после того как совершают одно или несколько делений, находясь в зоне пролиферации.

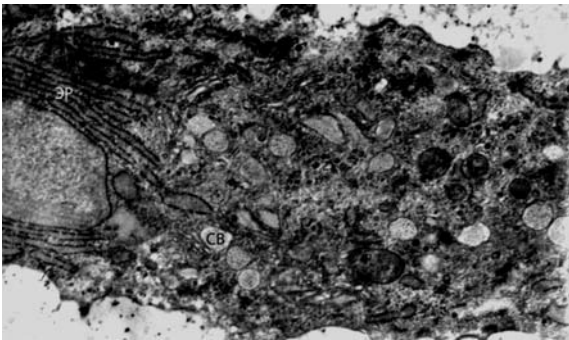


Рис.1. Секреторные вакуоли (CB) в зоне комплекса Гольджи функционально активного хондроцита эпифизарного хряща. Электроннограмма. Ув. x 12.000.

Интенсивный метаболизм регистрируется по аккумуляции радиоактивных индикаторов синтеза гликогена, сульфатированных гликозаминогликанов и коллагена, а на ультраструктурном уровне это заметно по появлению в цитоплазме расширенных цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, уменьшению количества свободных рибосом и появлению большого числа и различного диаметра вакуолей комплекса Гольджи (Рис.1). Установлено, что через 1 ч после введения животным ³⁵S-сульфата натрия такие хондроциты содержат интенсивную метку, в то время как ги-

пертрофированные хондроциты у зоны замещения имеют единичные включения радионуклида. Через 24 ч после введения радионуклида, когда функционально активные хондроциты приобретают морфологические признаки гипертрофированных, над ними сохраняется интенсивная метка. В то же время в других структурных зонах хряща, где хондроциты не гипертрофируются, меченые ³⁵S протеогликаны переместились за это время в межклеточный матрикс. Можно считать, что при гипертрофии нарушается транспорт синтезированных макромолекул из цитоплазмы за пределы клетки и по мере того как хондроциты набухают, снижается уровень биосинтеза наиболее характерных для матрикса хряща белковых и углеводных субстратов.



Рис. 2. Секреторные вакуоли (CB) на границе с плазматической мембраной в хондроците зоны созревания эпифизарного хряща. Электроннограмма. Ув. x 20.000.

Существенно возрастает их объем за счет цитоплазматических органоидов и накопления жидкости. В возрастающем объеме цитоплазмы часто встречаются митохондрии. Расширяются цистерны эндоплазматического ретикулума, увеличивается его площадь, а также количество и размер секреторных вакуолей комплекса Гольджи. Эти вакуоли ограничены двойными мембранами и содержат электронноплотные гранулы, идентифицируемые как сульфатированные протеогликаны [11]. Формируясь в зоне комплекса Гольджи, вакуоли перемещаются к плазматической мембране, обеспечивая элиминацию содержимого за пределы хондроцита путем экзоцитоза (Рис.2). Постепенно, по мере гидратации цитоплазмы увеличивается расстояние между отдельными цистернами эндоплазматического ретикулума и везикулами комплекса Гольджи. Изменяется структура ядра. Оно увеличивается в объеме и становится оптически не плотным. У ядерной мембраны хроматин не конденсируется, а равномерно распределен в объеме ядра. Нарастающая гидратация цитоплазмы приводит к еще более выраженной дезорганизации цитоплазматических органоидов и ядерного хроматина, а электронная плотность содержимого эндоплазматического ретикулума и вакуолей Гольджи снижается за счет накопления воды (Рис.3). Метаболическая активность хондроцитов постепенно угасает, что и регистрируется по незначи-

тельному включенню радиоактивных маркеров белковых и полисахаридных биосинтезов. Хондроциты приобретают морфологические и, самое важное, функциональные признаки гипертрофированных. В гомологичных скелетных закладках животных разных классов они отличаются размерами и формируют не одинаковые по ширине зоны. Не установлена зависимость интенсивности роста хрящевых закладок от этих показателей. Так, в зонах роста длинных костей курицы домашней диаметр таких клеток в два раза меньше, чем у лягушки травяной, однако у птиц кости растут в 4-5 раз интенсивнее.

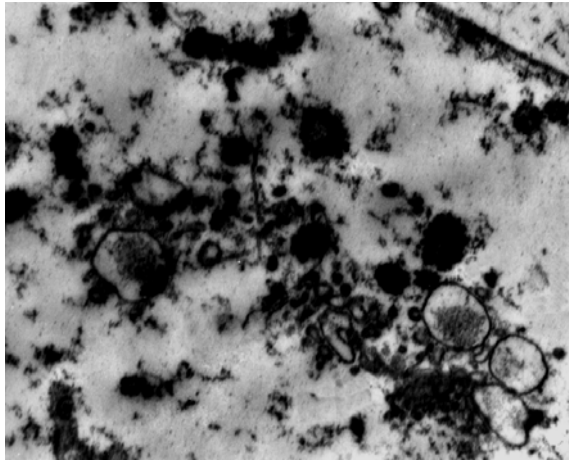


Рис. 3. Электроннограмма гипертрофированного хондроцита. Дезорганизация цитоплазматических органелл. Ув. x 10.000.

Гидратация и набухание хондроцитов с одновременной потерей функциональных свойств может быть обусловлена, по нашему мнению, перераспределением воды между клетками и матриксом, в результате чего последний становится плотным, компактным, а клетки, наоборот, набухают и увеличиваются. Вода выступает триггером инициации набухания хондроцитов, а внутриклеточными гидрофильными субстратами являются кислые гликозаминогликаны. Если, например, средний диаметр хондроцитов в зоне пролиферации составляет 10 мкм, а созревающих и гипертрофированных 20 и 30 мкм, то объем клетки ($V = 4/3\pi R^3$) в этих случаях составит 523, 4180 и 14130 мкм³, соответственно, то есть отличается в 8 и 27 раз от первоначального. В связи с увеличением объема многократно возрастает и поверхность плазматической мембраны, что безусловно сказывается на транспорте воды и метаболитов. Есть основания полагать, что объем гипертрофированных хондроцитов это лабильный морфологический признак при терминальной дифференцировке и в каждом эпифизарном хряще скелетных закладок он может варьировать и изменяться в зависимости от содержания и структурированности воды в межклеточном матриксе, гидрофильные свойства которого определяются концентрацией хондроитин-сульфатов и гликопротеинов различной массы [6]. Их окончательный размер у зоны замещения хряща костью регулируется системными и локальными фактора-

ми, определяющими направленность внутриклеточного метаболизма, физико-химические и структурные свойства внеклеточного матрикса: интенсивность и продолжительность биосинтеза хондроитин-сульфатов и гликопротеинов, концентрацию хондроцитов, соотношение клеток и гиалинового матрикса, его минерализацию. Объем клеток может изменяться в различных скелетных закладках и в онтогенезе животных одновременно с метаболической активностью созревающих хондроцитов. Установлено, что на фоне снижения биосинтеза сульфат содержащих протеогликанов, гипертрофирующиеся хондроциты продолжают интенсивно включать ³H-глюкозу в гликопротеины. Предполагается, что гликопротеины вместе с матриксными везикулами, в которых содержатся ферменты и фосфат-кальциевые субстраты, способны инициировать минерализацию [13]. При отсутствии в межклеточном матриксе везикул, но при высоком содержании гликопротеинов, например, в хрящевых эпифизах длинных костей растущих птиц и в зонах покоящихся хондроцитов эпифизарных хрящей млекопитающих, минерализации хряща не происходит [2].

Таким образом, увеличение объема хондроцитов начинается в зоне созревания эпифизарных хрящей и совпадает с максимальной активностью клеток по биосинтезу белково-углеводных макромолекул. Физико-химические свойства плазматической мембраны, обеспечивающей транспорт и перераспределение воды между гиалоплазмой и матриксом, в значительной мере зависят от секреторной активности хондроцитов. В таких условиях матрикс хряща становится плотным, компактным, а объем клеток возрастает. При этом общая площадь зоны хряща, включающая гипертрофированные хондроциты и матрикс, не изменяется по ширине диафиза кости.

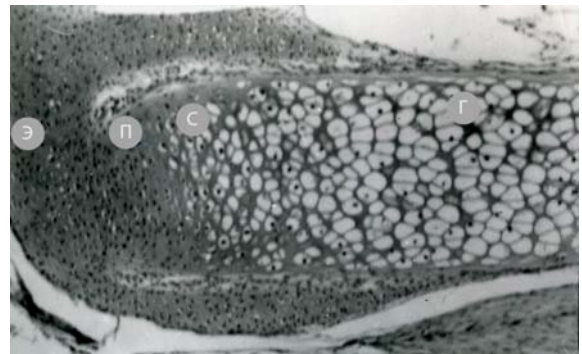


Рис.4. Ростковый хрящ бедренной кости лягушки травяной. Зоны: Э - эпифиз, П - пролиферации, С - созревания, Г - гипертрофии. Микрофото. Окраска гематоксилин-азур-эозин. Ув. x 100.

На окончательный объем хондроцитов влияет и их концентрация: чем больше клеток приходится на единицу площади, тем меньшего размера они могут достигать при терминальной дифференцировке. Если же концентрация хондроцитов не велика, как в суставном хряще большинства длинных костей или в зонах роста скелетных закладок земноводных, то объем гипертрофированных хондроцитов может

быть значительным. В растущих костях конечностей птиц и амфибий сохраняются обширные зоны, где по длине диафиза насчитывается 200-250 гипертрофированных хондроцитов (Рис.4). Максимального объема клетки достигают уже после периода интенсивной метаболической активности в зонах созревания. Постепенно их метаболизм снижается и последующее уменьшение количества внутриклеточных вакуолей с гидрофильными субстратами не способствует дальнейшему накоплению воды и увеличению объема хондроцитов. Однако интенсивный биосинтез протеин-хондроитинсульфатов не может быть тем единственным процессом в цикле внутриклеточных метаболизмозов созревающих хондроцитов, который бы определял продолжительность их активного функционирования с последующей гидратацией и гипертрофией. Возможно, что этот процесс инициируется также повышающейся внутриклеточной концентрацией лизосом с гидролитическими ферментами [8]. Продукты их каталитической активности в виде гиалуронатов, галактозаминов и др. обладают еще более выраженными гидрофильными свойствами, чем комплексы хондроитинсульфатов с белками, что также способствует перераспределению воды между матриксом и цитоплазмой. В хондроцитах нарушается пространственное взаимодействие субстратов биосинтезов и энзимов. Инициировать набухание хондроцитов могут и морфогенетические белки, регулирующие экспрессию соответствующих генов [12,14], а также активация рецессивного гена achondroplasia (cn) [15]. Изменение функциональных свойств, размеров хондроцитов и, как следствие, интенсивности роста закладок скелета происходит при избытке в организме животных гидрокортизона и дефиците витамина D [1, 3, 9].

Таким образом, гипертрофия и набухание хондроцитов в эпифизарных хрящах скелетных закладок представляет собой процесс увеличения объема клеток с изменяющейся относительной скоростью, что сопровождается дезорганизацией цитоплазматических органоидов и постепенной утратой клетками биосинтетических функций. Продолжительность терминальной дифференцировки каждого хондроцита варьирует в разных скелетных закладках, определяя скорость соотносительного увеличения коротких и длинных костей у позвоночных. Специфические локальные условия для подготовки хряща к замещению костной тканью создаются комплексом метаболических и структурных изменений в хондроцитах и гиалиновом матриксе эпифизарных хрящей. Гидратация хондроцитов в сочетании с минерализацией гиалинового матрикса оказывает индуцирующий эффект на инициацию дифференцировки остеогенных клеток в зонах пернестального и эндостального остеогенеза.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гайко Т.В., Калашников Ал.В., Апуховская Л.И. и др. Влияние разных доз витамина Е на

метаболизм и структурно-функциональное состояние костной и хрящевой тканей в условиях экспериментального алиментарного Дефицита витамина Д // Український морфологічний альманах. Луганськ.- 2007.- т.5, №2.- С.19-24.

2. Житніков А.Я. Дифференцировка хондроцитов и рост кости при развитии хрящевого скелета курицы // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.-1979.-Т.77, №7.- С.76-82.

3. Житніков А.Я. Кинетика пролиферации и метаболизм хондроцитов в эпифизарных хрящах скелета в условиях избытка гидрокортизона // Український медичний альманах.Луганськ.-1998.-№2.-С.85-87.

4. Житніков А.Я. Кинетика пролиферации хондроцитов в зонах роста коротких и длинных костей конечностей белых крыс и летучих мышей // Український морфологічний альманах. Луганськ.- 2008.-Т.6, №2.-С.97-102.

5. Житніков А.Я., Родионова Р.В. Субституция хряща костью в растущем скелете // Вісник проблем біології та медицини. Полтава.- 2003.- №1.-С.16-19.

6. Павлова В.Н., Копьева Т.Н., Слуцкий Л.И., Павлов А.И. Хрящ. - М.: Медицина,1988.- 317 с.

7. Byers S. et.al. Quantitative histomorphometric analysis of the human growth plate from birth to adolescence // Bone.-2000.-V.27, N 4.- P.495-501.

8. Farnum C.E. et. al., Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage // Anat.Rec .- 1987.-V.219, N3.-P.221-232.

9. Frost H.M. Changing concepts in skeletal physiology // Am.J.Hum.Biol.-1998.-V.10, N5.- P.599-605.

10. Kirkwood J.K. et.al. The growth rate of the tarsometatarsus bone in birds // J. Zool.,London.-1989.-V.217, P.403-416.

11. Lash J.W., Vasan N.S. Glycosaminoglycans of Cartilage // In: Cartilage. Structure, Function and Biochemistry.- New-York - London : Academic Press, 1983.-P.215-251.

12. Mansfield K. et al. Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes // J. Cell Physiol.-1999.-V.179, N3.- P.276-286.

13. Orcel P. Physiologie et architecture du tissue osseux // Eurobiologiste.-1999.-V.33.- P.287-296.

14. Rajpurohit R. et al. Chondrocytes death is linked to development of a mitochondrial membrane permeability transition in the growth plate // J. Cell Physiol.-1999.-V.179, N3.-P.287-296.

15. Thurston M.N. et.al. Cell kinetics of growth cartilage of achondroplastic (cn) mice // J.Anat.-1985.-V.140, N 3.- P.425-434.

Надійшла 23.01.2009 р.

Рецензент: проф. В.Г.Ковешніков