

УДК: 597.6: 591.84
© Житников А.Я., 2012

ПРОДОЛЬНЫЙ РОСТ, ПОПЕРЕЧНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И МИНЕРАЛИЗАЦИЯ В РОСТКОВЫХ ХРЯЩАХ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ АМФИБИЙ (*RANA TEMPORARIA*)

Житников А.Я.

Институт зоологии им. П.П. Шмальгаузена НАН Украины

Житников А.Я. Продольный рост, поперечное моделирование и минерализация в ростковых хрящах длинных костей конечностей амфибий (*Rana temporaria*) // Украинський морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 1. – С. 24-28.

Полученные морфологические данные по развитию, росту и моделированию скелетных закладок у амфибий в сочетании с некоторыми гистохимическими характеристиками хондроцитов и матрикса ростковых хрящей показывают, что у этих животных, как и у других позвоночных, продольный рост длинных костей определяют последовательная дифференцировка хондроцитов в сочетании с периостальным формированием кости на концах диафиза. Однако специфические условия и продолжительность развития этих животных, особенности локомоторных нагрузок (прыжки, плавание) и амплитуда движений скелета конечностей вносят определенные метаболические нюансы и структурные особенности в процесс замещения хрящевой ткани костной и продольно-поперечное моделирование длинных костей.

Ключевые слова: бесхвостые амфибии, скелет конечностей, ростковые хрящи, минерализация.

Житніков А.Я. Поздовжнє зростання, поперечне моделювання та мінералізація в росткових хрящах довгих кісток кінцівок амфібій (*Rana temporaria*) // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 1. – С. 24-28.

Отримані морфологічні дані з розвитку, росту та моделювання скелетних закладок у амфібій в поєднанні з деякими гістохімічними характеристиками хондроцитів та матриксу росткових хрящів показують, що у цих тварин, як і в інших хребетних, поздовжній ріст довгих кісток визначають послідовне диференціювання хондроцитів в поєднанні з періостальним формуванням кістки на кінцях діафізу. Однак специфічні умови і тривалість розвитку цих тварин, особливості локомоторних навантажень (стрибки, плавання) і амплітуда рухів скелету кінцівок вносять певні метаболічні нюанси і структурні особливості в процес заміщення хрящової тканини кістковою та поздовжньо-поперечне моделювання довгих кісток.

Ключові слова: безхвості амфібії, скелет кінцівок, росткові хрящі, мінералізація.

Zhitnikov A.Ya. The longitudinal growth, cross-modeling and mineralization in cartilage growth plates of long bones of amphibians (*Rana temporaria*) // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 1. – С. 24-28.

The obtained data on the development, of skeletal growth and modeling of long bones in amphibians, in combination with some histochemical characteristics of chondrocytes and cartilage matrix of growth plates indicate that these animals, as well as in other vertebrates, the longitudinal growth of long bones determine the sequential differentiation of chondrocytes in combination with the formation of periosteal bone at the ends of the diaphysis. However, the specific conditions and duration of these animals, particularly locomotor loads (jumping, swimming) and the amplitude of the movements of the skeleton limbs make certain nuances of the metabolic and structural features in the process of replacement of cartilage to bone and longitudinal-transverse modeling of long bones.

Key words: anurans, skeleton, limbs, growth, cartilage growth plates, mineralization.

Основную роль в обеспечении продольного роста длинных костей млекопитающих, регулируя его по скорости и продолжительности, выполняют ростковые хрящи [12]. Проллиферация, созревание и гипертрофия хондроцитов в этих структурах являются запрограммированными процессами и контролируются системными и локальными регуляторами [13,16,20]. Скорость их терминальной дифференцировки, равно как и приобретаемые свойства хрящевого матрикса, играют важную роль в темпах роста закладок, в реализации периостального и эндохондрального остеогенеза [3,8]. В ростковых хрящах хондроциты вырабатывают также факторы, которые индуцируют вращание кровеносных сосудов, дифференцировку остеогенных клеток, обеспечивают минерализацию хрящевого матрикса и эндохондральный остеогенез [8,13,18]. Таким образом, терминальная

дифференцировка хондроцитов ростковых хрящей, периостальный остеогенез, формирование и постоянная резорбция хряща и эндохондральной кости в зонах метафизов обеспечивают рост, увеличение костномозговой полости и поперечно-продольное ремоделирование диафиза [14]. Однако значимость и удельный вес каждого из этих процессов при развитии костей у животных существенно отличается, отражая их роль при становлении различных типов локомоции [3]. В этой связи недостаточно исследовано развитие и рост скелетных закладок у земноводных, отличающихся среди позвоночных животных характерными движениями и позами поведения. Особенности их локомоторной активности определяют морфогенез, формообразование и структуру суставного, росткового хрящей и костной ткани [9,11]. По данным некоторых исследователей, ростковый

хрящ обеспечивает лишь радиальный рост кости у земноводных, а ее продольное увеличение происходит в результате периостального остеогенеза [10,11].

Цель исследования – установить динамику формирования и структуру зон роста, особенности минерализации в ростковых хрящах костей конечностей земноводных, отличающихся от других позвоночных специфическими условиями развития (личиночное) и опорно-двигательной активностью при нахождении в водной среде и на суше.

Материал и методы исследования. Проведено гистологическое исследование развития длинных костей задних конечностей амфибий (лягушка травяная с 30 суток личиночного развития до наступления метаморфоза в 70 сут, сеголеток, 1-годичных). Личинок земноводных выращивали в искусственных бассейнах с мая по август месяц, а стадии развития определяли по Дабагян Н. [2]. Перед проведением экспериментов с радионуклидами головастиков содержали в помещении в аквариумах при 24°C. Сеголеток включали в эксперимент в августе-сентябре, а лягушек 1-годичного возраста - в мае-июне месяце. Методами гистологии и морфометрии изучали структуру ростковых пластинок бедренной или большеберцовой костей. Минерализацию хряща и кости оценивали по реакции Косса [6] на не декальцинированных срезах, изготовленных с использованием микротома-криостата МК-25. Кости фиксировали, заливали в парафин и готовили гистологические срезы. На гистологических препаратах скелетных элементов измеряли высоту каждой ростковой пластинки (по длинной оси закладки) и структурных зон (пролиферирующих, созревающих и гипертрофированных хондроцитов), оценивали соотношение клеток и гиалинового матрикса на эквивалентной площади. Количество хондроцитов в зоне пролиферации подсчитывали вдоль длинной оси скелетного элемента, начиная от границы с эпифизом до зоны зрелых клеток. Измеряли диаметр росткового хряща в зоне гипертрофированных хондроцитов, костномозговой полости в центре диафиза и толщину компактной кости в этих участках. Определяли также высоту, ширину и объем гипертрофированных хондроцитов. Скорость роста скелетных закладок оценивали по темпам приобретения хондроцитами, мечеными ³H-тимидином, морфологических признаков созревающих или гипертрофированных клеток через 1 и 4 суток после его введения головастикам и сеголеткам, а также по изменению длины диафиза костей и костномозговой полости в процессе развития животных.

Морфометрические данные результатов исследования обработаны с использованием программы Statistica 6.

Результаты и их обсуждение. Формирование провизорных хрящевых закладок скелета свободных конечностей в эмбриогенезе позвоночных

обеспечивается единым механизмом, который в общих чертах может быть представлен так. Первоначально в почке конечности образуются скопления клеток мезенхимы (хондробласты), которые отличаются размерами и перспективно соответствуют будущим скелетным элементам. В процессе морфогенеза по периметру удлинённых хондробластом формируется перихондр, а локальные проявления генетически детерминированных взаимоотношений между темпами репродукции и дифференцировки хондрогенных клеток обеспечивают постепенное развитие хрящевых закладок разной длины и ширины, с неодинаковыми структурными зонами и разным соотношением клеток и гиалинового матрикса [5]. Особенностью роста и формообразования хрящевых закладок головастиков лягушки травяной, отличающей их от млекопитающих, является постоянное увеличение диафиза за счет постоянной гипертрофии хондроцитов зон пролиферации, но без формирования костномозговой полости. В цитоплазме клеток появляется много вакуолей, а эндоплазматический ретикулум присутствует в виде отдельных фрагментов [4,9]. Ядра набухают или становятся компактными в результате конденсации хроматина. По изменению морфологических и метаболических характеристик хондроцитов можно утверждать, что в них нарушается сопряжение процессов транскрипции, трансляции, биосинтезов и такое состояние определяется как апоптоз [15]. В таких хондроцитах нами не обнаружена активность щелочной фосфомоноэстеразы, а межклеточный матрикс, по показателям реакции Косса, не содержит минеральных субстратов. Наружный контур закладки - перихондр постепенно становится многослойным и хорошо васкуляризованным. В клетках его внутреннего слоя установлена активность щелочной фосфомоноэстеразы.

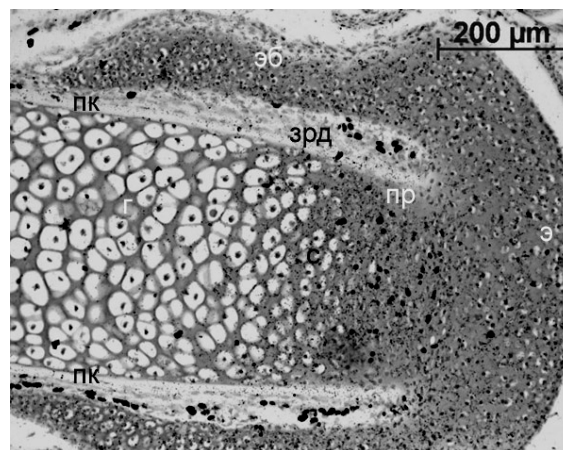


Рис.1. Проксимальный фрагмент бедренной кости травяной лягушки. Метка ³H-тимидина в зонах роста кости (а) и хряща (б). Э – эпифиз, бэ – боковой эпифиз. Зоны: пр – пролиферации, с – созревания, г – гипертрофии, пк – периостальная кость, зрд – зона роста кости диафиза. Окраска гематоксилин – эозин.

На 30 сутки развития (40 стадия) закладки бедренной и большеберцовой костей еще хрящевые

с четким разграничением на структурные зоны по морфологическим признакам хондроцитов : два эпифиза, центр диафиза и две промежуточные, где локализована большая часть размножающихся хондроцитов. По периметру диафиза формируется кость за счет дифференцировки в остеогенном направлении клеток внутреннего слоя перихондра. Она тонкая, компактная и появляется одновременно с гипертрофией хондроцитов, формируя наружный контур (Рис.1). Соотношение зоны гипертрофированных хондроцитов к длине всего диафиза составляет 1:3. Хрящевые закладки растут в длину в течение последующих 15-20 (стадия 44) суток в результате пролиферации и последующей гипертрофии хондроцитов, дифференцировки остеогенных клеток и формирования периостальной кости в зонах метафизов. Кость здесь тонкая, но ближе к центру диафиза существенно утолщается (до 25 мкм) за счет продолжающегося аппозиционного роста. Костномозговая полость еще отсутствует. Высота гипертрофированных хондроцитов в диафизе составляет $36,6 \pm 1,42$ мкм, а удельный вес этой зоны достигает 80% длины всего диафиза. Костная манжетка по периметру диафиза закладки достигает границы зоны размножающихся хондроцитов, проникая вглубь эпифиза (Рис.1). Эпифиз как бы нанизан на покрытый костью хрящевой цилиндр диафиза. Латерально от концов диафиза он является продолжением суставного хряща, обеспечивая формирование большей площади сферической суставной поверхности. При таких особенностях морфогенеза закладок в конечностях формируются подвижные суставы с большой амплитудой движений. Увеличение поперечного диаметра диафиза хрящевых закладок ограничено по наружному контуру - периостальной костью, а изнутри - самими же слабо активными по участию в наработке гиалинового матрикса гипертрофированными хондроцитами, объем которых достигает максимальных величин по всей длине и расширение за счет дальнейшего набухания этих клеток уже не возможно. Диафиз кости имеет форму цилиндра и не изменяется по всей длине на протяжении длительного периода, а его ширина составляя $246 \pm 11,75$ мкм при отношении длины к ширине 12:1, что достигается в основном за счет продольного роста.

Таким образом, у головастика амфибий наблюдаются специфический морфогенез хрящевых закладок длинных костей, что может быть связано со средой обитания и локомоторной подвижностью личинок: - продолжительный рост диафизов без формирования костномозговой полости в результате терминальной дифференцировки хондроцитов и периостального остеогенеза в зонах метафизов; - формирование компактной кости по наружному контуру всего диафиза; - увеличение суставной поверхности эпифизов в хрящевых закладках за счет разрастания латеральных участков, в результате чего проксимальные и дистальные концы костных диафизов оказываются внутри эпифизов; - отсутствие минеральных

субстратов в матриксе ростковых хрящей скелета личинок амфибий.

Продольный рост закладок личинок амфибий за счет гипертрофии хондроцитов, но без формирования костномозговой полости, может быть предопределен также особенностями становления у них гемопоэза. Установлено, что полость в костях начинается формироваться, когда эмбриональные источники кроветворения (желточный мешок, печень, селезенка, тимус, кишечник) уже не в состоянии обеспечить потребность в энергетических, пластических субстратах и кислороде растущие органно-тканевые системы личинок амфибий [1]. В этих условиях в организме активизируется новый очаг дифференцировки гемопоэтических клеток – внутри скелетный. Поэтому первичную резорбцию хряща в закладках скелета следует воспринимать как детерминированный во времени биологический процесс, следствием которого является использование полости кости для кроветворной функции. Именно у амфибий впервые появляется костный мозг, как специализированный очаг гемопоэза [7]. Этому процессу, как и в скелете других позвоночных, предшествует терминальная дифференцировка хондроцитов и биохимическая перестройка гиалинового матрикса, что индуцирует инвазию в эту зону кровеносных сосудов с сопутствующими кроветворными, остеогенными и остеокластическими клетками [17]. В образующейся полости возникают новые межклеточные взаимодействия, обеспечивающие дифференцировку остеогенных и гемопоэтических клеток.

Формирование костномозговой полости в скелетных закладках амфибий и последующее ее продольное увеличение в результате резорбции хряща с гипертрофированными хондроцитами осуществляется одноядерными клетками. Они могут быть двух типов: 1) выделяющие гидролитические ферменты для резорбции хрящевого матрикса; 2) клетки макрофагальной природы, обеспечивающие фагоцитоз этих фрагментов с целью дальнейшего катаболизма [10]. Наши исследования показали, что на 52-54 сутки развития головастика, когда в закладках бедренной и большеберцовой костей уже имеется костномозговая полость, сохраняются зоны хряща с гипертрофированными хондроцитами, достигающие 1600 мкм с каждой стороны диафиза. Этот хрящ контактирует непосредственно с костной тканью диафиза, ограничивая таким способом ее моделирование. Хрящевой матрикс в этих участках не минерализован и кровеносные сосуды со стороны полости диафиза не проникают в него (Рис.2).

На внутренней поверхности костного диафиза редко встречаются многоядерные остеокласты. Поэтому длительный период развития скелетных закладок земноводных поперечный диаметр полости костей также не изменяется, а соотношение к длине диафиза возрастает в основном за счет продольного роста. Кроме того, у пойкилотермных животных температура окружающей среды

может оказывать влияние на интенсивность метаболизма, формируя несколько другие структурные взаимодействия между провизорным ростковым хрящом и костной тканью. В зону гипертрофированного хряща со стороны костномозговой полости никогда не врастают кровеносные сосуды и не формируется эндохондральная кость. Не были обнаружены минеральные компоненты в ростковом хряще и в эпифизах.

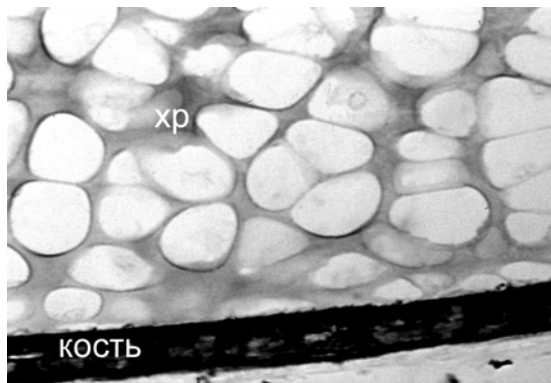


Рис. 2. Отсутствие минеральных субстратов в матриксе хряща бедренной кости головастика травяной лягушки. Реакция Косса -сафранин. Ок.12, об.25.

При таких особенностях метаболизма и при отсутствии эндохондрального остеогенеза дополнительную прочность скелетному элементу создают структурные взаимоотношения между обширными зонами гипертрофированных хондроцитов росткового хряща и минерализованным костным диафизом (Рис.2). Несмотря на постоянную резорбцию хряща, которая обеспечивает увеличение костномозговой полости, длина зоны с гипертрофированными хондроцитами сохраняется на каждом конце диафиза в пределах 1500 мкм. Такая конструкция закладок обеспечивает высокую прочность в метафизарных зонах, где происходит периостальный остеогенез и дифференцировка хондроцитов ростковых хрящей. Таким образом, терминальная дифференцировка хондроцитов ростковых хрящей и темпы его резорбции какой-то период времени уравновешены. Используя эти данные, мы смогли определить и интенсивность роста длинных костей амфибий, которая в период активного развития животных составляет 65-70 мкм в сутки с каждой стороны диафиза. Примерно такие же показатели скорости роста мы получили по данным с ^3H -тимидином, так как через 96 ч после его введения многие меченые хондроциты зоны пролиферации приобрели структурные признаки гипертрофированных и были локализованы на некотором удалении от нее (Рис.1,3).

Однако у пойкилотермных животных интенсивность роста скелетных закладок постоянно изменяется в зависимости от температуры внешней среды. Например, при +5-10°C ядра хондроцитов зоны пролиферации не включали радиоактивный индикатор синтеза ДНК, в то

время как среди клеток костного мозга было достаточно много меченых.

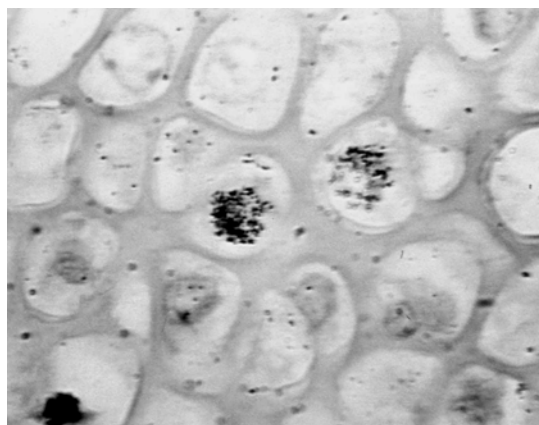


Рис. 3. Гипертрофированные хондроциты через 96 ч после введения ^3H -тимидина. Окраска гематоксилин-эозин. Ок.12, об.40.

Рост костей продолжается и у 1-летних лягушек. К этому времени еще больше увеличиваются эпифизы и площадь суставной поверхности. Как и у головастика в эпифизах можно выделить суставной хрящ и боковой суставной хрящ, внутренняя поверхность которого примыкает к концам периостальной кости (Рис.1). В зоне контакта с наружным слоем периоста много кровеносных сосудов, а остеогенные клетки диафиза выделяются по активности щелочной фосфатазы. В боковом суставном хряще по всему периметру параллельно суставной поверхности матрикс содержит минеральные компоненты (Рис.4). В эпифизах формируется минерализованная зона между суставным хрящом, врастающей вглубь периостальной костью и ростковым хрящом. Таким способом у взрослых лягушек укрепляются эпифизы.

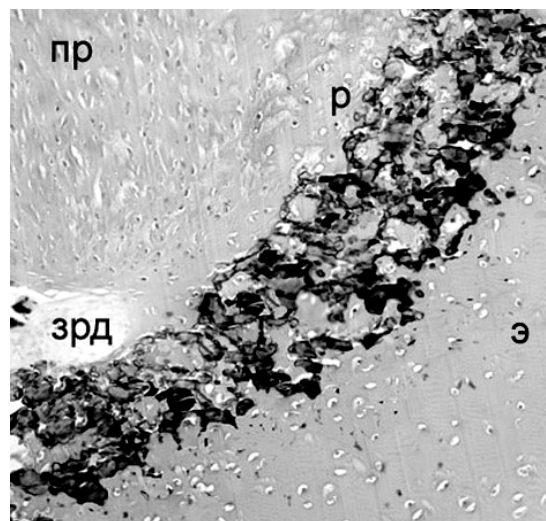


Рис. 4. Минерализованный хрящ бедренной кости 1-годовалой лягушки. Зоны: э – эпифиз, пр – пролиферации, р –резервная, зрд – зона роста диафиза (см.Рис.1). Реакция Косса -гематоксилин. Ок.12, об.25.

Ростковый хрящ, который находится внутри диафиза, сохраняет характерные зоны: резерв-

ная, пролиферации, созревания и гипертрофии. Резервная зона граничит с минерализованным хрящом эпифиза. В пролиферативной зоне хондроциты имеют удлиненную форму поперек длинной оси закладки, не формируют “изогенные группы” и структуры в виде колонок. Количество хондроцитов по длине закладки остается почти таким же, как и у сеголеток.

Диаметр кости в зоне пролиферации и созревания по сравнению с сеголетками увеличивается в 2 раза. Наиболее длинной (до 900 мкм) по-прежнему остается зона гипертрофированных хондроцитов, где высота клеток достигает $42.4 \pm 1,9$ мкм. В клетках и матриксе этой зоны реакцией Гомори и Косса щелочная фосфатаза и минеральные субстраты не обнаружены. Их наличие зафиксировано только в остеообластах и матриксе костного диафиза. Толщина кости постепенно увеличивается от зоны метафиза, граничащей с пролиферирующими хондроцитами, к центру. В длинных костях 1-летних лягушек сохраняется потенциал в виде эпифизарных хрящей для дальнейшего роста.

Полученные данные позволяют утверждать, что в ростковых хрящах скелета задних конечностей бесхвостых амфибий не происходит минерализация при терминальной дифференцировке хондроцитов и эндохондральная кость не формируется. В зонах замещения хрящ с гипертрофированными хондроцитами подвергается резорбции и за счет этого процесса обеспечивается продольное увеличение костномозговой полости. Однако постепенно минерализуется обширная поверхность глубокой зоны суставного хряща, что можно рассматривать как механизм адаптации их скелета к локомоторным нагрузкам с большой амплитудой движений от состояния покоя, при котором колени сильно согнуты, до плавания и прыжков с преодолением гравитации.

Перспективы дальнейших исследований.

Изучение клеточных механизмов роста и моделирования скелета конечностей наземных позвоночных при адаптивной перестройке скелета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Грушко М.П. Особенности строения органов кроветворения в личиночный период развития земноводных /М.П.Грушко, С.В.Хвостова// Морфология.-2011.-Т.140, № 5.-С.38.
2. Дабагян Н.В. Траваяная лягушка *Rana temporaria* /Н.В. Дабагян, Л.А. Слепцова// В кн.: Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975.- С.442-462.
3. Житников А.Я. Зона пролиферации эпифизарного хряща костей конечностей животных с разными темпами и продолжительностью роста /А.Я. Житников//Вісник ортопедії, травматології та протезування, Київ. – 2007.- № 3.-С.69-72.
4. Житников А.Я. Метаболические и структурные предпосылки набухания и гипертрофии хондроцитов /А.Я.Житников, М.А. Исламова//Український морфологічний альманах, Луганськ.- 2009.-Т. 7, № 2.- С. 43-46.
5. Мажуга П.М. Развитие скелета конечностей у наземных позвоночных /П.М. Мажуга, А.Я. Житников, Т.П. Нищевич// К.: Наукова думка, 1993.- 183 с.
6. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная /С. Пирс// М.: Ин. лит.,1962.-962с.
7. Хамидов Д.Х. Кровь и кроветворение у позвоночных животных / Д.Х. Хамидов, А.Т. Акимов, А.А. Турдыев // Ташкент: Фан, 1978.-165 с.
8. Anderson H.C. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization / Y.C. Anderson, R. Garimella, S.E. Tague // Front Biosci.-2005.-10.-P.822-837.
9. Dell'Orbo C. Morphology of epiphyseal apparatus of a ranid frog / C. Dell'Orbo, L. Gioglio, D. Quacci // Histol. Histopathol.-1992.-7.-P.267-273.
10. Dickson R.G. Ultrastructure of growth cartilage in the proximal femur of the frog, *Rana temporaria* /R.G.Dickson // J.Anat.-1992.-135.-P.549-564.
11. Felisbino S.I., Carvalho H.F. The epiphyseal cartilage and growth of long bones in *Rana catesbeiana* / S.I.Felisbino, H.F. Carvalho // Tissue and Cell.- 1999.- V.31, N3.-P.301-307.
12. Frost H.M. Changing concepts in skeletal physiology /H.M. Frost // Am.J.Hum.Biol.-1998.-V.10, N5.-599-605.
13. Minina E. BMP and IHH/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocytes proliferation and differentiation / E.Minina, H.M.Wenzel, C.Kreschel [et al]// Development.- 2001.-128.-P.4523-4534.
14. Provot S., Schipani E. Molecular mechanisms of endochondral bone development / S. Provot, E. Schipani// Biochem. Biophys. Res. Commun.- 2005.-V.328, N3.-658-665.
15. Roach H.I. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes / H.I. Roach, T. Aigner, J.B. Kouri // Apoptosis, 2004.-V.9, N3.-P.265-277.
16. Robson H. Interaction between GH, IGF-1, glucocorticoids and thyroid hormones during skeletal growth / H. Robson, T. Sielber, S.M. Shalet, G.R. Williams // Pediatr.Res.-2002.-V.52, N2.-P.137-147.
17. Silvestrini G. Resorption of uncalcified cartilage in the diaphysis of the chick embryo tibia / G. Silvestrini, M.E. Ricordi, E. Bonucci // Cell Tissue Res.-1979.-V.196, N3.-P.221-235.
18. Ulici V. The PISK pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation / V. Ulici, K. Hoenselaar, J. Gillespie, F. Beier// BMC Developmental Biology.-2008.-8: 40 doi: 10.1186/1471-213X-8-40.
19. Veen S.J. Intermittent compression stimulates cartilage mineralization / S.J. Veen, J.W. Hagen, F.C. Van Ginke [et al] // Bone.- 1995.-17.-461-465.
20. Wagner E.F. Genetic control of skeletal development / E.F. Wagner, G. Karsenty // Curr.opin.genet.dev.-2001.-V.11, N5.-P.527-532.

Надійшла 17.11.2011 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін