

#### СОДЕРЖАНИЕ

BBE	ДЕНИ	1E	5
1.	ФУН ПРИ	ІКЦИОНИРОВАНИЕ ЭПИФИЗАРНЫХ ХРЯЩЕЙ И РОСТ СКЕЛЕТА ВОЗДЕЙСТВИИ МЕХАНИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ	7
2.	БИО	ЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	15
3.	MOF Koc	РФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГИСТОГЕНЕЗА ТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ	19
	3.1.	Моделирование закладок скелета конечностей в эмбриогенезе амфибий, птиц и млекопитающих	19
		3.1.1. Размножение хондроцитов в зонах роста коротких и длинных костей конечностей	24
		3.1.2. Метаболизм хондроцитов при терминальной дифференцировке по по- казателям белкового и полисахаридного биосинтезов	30
		3.1.3. Структурные изменения созревающих и гипертрофированных хондроцитов	32
	3.2.	Роль эпифизарных хрящей в морфогенезе длинных костей амфибий и птиц в условиях становления опорно-двигательной активности	35

© Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины, 2014

	3.3.	Сопоставление структуры эпифизарных хрящей и моделирование длинных костей у грызунов ( <i>Rattus norvegicus</i> ) и летучих мышей ( <i>Nyctalus noctula</i> )	40
	3.4.	Гистологическая конструкция эпифизарных хрящей в коротких и длинных костях конечностей и структурно-метаболические изменения в хондроцитах и матриксе эпифизов при формировании вторичных центров окостенения	47
4.	ГЕТ МО ХРЯ ДВИ	ЕРОХРОННОСТЬ РОСТА КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ И ОСОБЕННОСТИ ДЕЛИРОВАНИЯ ЭНДОХОНДРАЛЬНЫХ ТРАБЕКУЛ В ЗОНАХ ЗАМЕЩЕНИЯ ІЩЕВОЙ ТКАНИ КОСТНОЙ У ЖИВОТНЫХ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ІГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ	51
ЗАК	ЛЮч	ІЕНИЕ	61
СПІ	1COI	<i>КЛИТЕРАТУРЫ</i>	64
ИЛЛ	ІЮС	ГРАЦИИ	71

Засновники (видавці) — Національна академія наук України (вул. Володимирська, 54, Київ, 01601 Україна) та Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України (вул. Б. Хмельницького, 15, Київ, 01601, Україна)

Затверджено до друку вченою радою (протокол № 5, 27.05.2014)

Адреса редакції:

Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України вул. Б. Хмельницького, 15, Київ, 01601, Україна

Редактори: Н. С. Новиченко, Н. С. Филимонова Комп'ютерна верстка: О. Цудзинович

Підписано до друку 12.11.2014. Формат 70×108/16. Папір офсетний. Гарн. Minion Pro. Ум. друк. арк. 10,4. Обл.-вид. арк. 8,8. Тираж 200 прим. Зам № 4041.

Оригінал-макет підготовано редакцією журналу «Вестник зоологии»

Друкарня Видавничого дому «Академперіодика» НАН України вул. Терещенківська, 4, Київ, 01004 Україна Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 544 від 27.07.2001 Национальная академия наук Украины Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена

#### А. Я. Житников

# СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ДИНАМИКА ЗАМЕЩЕНИЯ ХРЯЩЕВОГО СКЕЛЕТА КОСТНЫМ У НАЗЕМНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ С РАЗНЫМИ ЛОКОМОТОРНЫМИ НАГРУЗКАМИ

#### A. Ya. Zhitnikov

# STRUCTURAL-METABOLIC FEATURES AND DYNAMICS OF REPLACEMENT OF CARTILAGE WITH BONE SKELETON IN TERRESTRIAL VERTEBRATES WITH DIFFERENT LOCOMOTOR LOADS

УДК 591.471.36/.37:591.3:576.344

Житников А. Я. Структурно-метаболические особенности и динамика замещения хрящевого скелета костным у наземных позвоночных с разными локомоторными нагрузками. — Представлены эмбриологические, гистологические, гистохимические и авторадиографические данные по динамике формирования, структуре, особенностям минерализации ростковых хрящей и моделирование длинных и коротких костей конечностей животных (Rana temporaria, Gallus domesticus, Rattus norvegicus, Nyctalus noctula) с разными условиями развития (личиночные, яйцевые, плацентарные) и опорно-силовыми нагрузками на скелет. Обсуждаются клеточные механизмы гетерохронного роста и адаптации скелета конечностей наземных позвоночных к различным локомоторным и механическим нагрузкам. Полученный фактический материал и привлечённые научные данные позволили установить взаимосвязь интенсивности биосинтеза хондроцитами эпифизарных хрящей коротких и длинных костей скелета конечностей сульфатированных гликозаминогликанов с темпами их терминальной дифференцировки и скоростью роста. Показано, что регулирование объёма хрящевой и костной ткани в зонах замещения и остеогенеза длинных и коротких костей осуществляется путём изменения темпов и масштабности структурной трансформации хондроцитов и матрикса эпифизарных хрящей. Прочностные свойства и функциональные возможности костей конечностей разных групп позвоночных животных достигаются в онтогенезе за счёт усиления кальцификации матрикса эпифизарных хрящей, содержащих гипертрофированные хондроциты, и увеличения относительного количества компонентов эндохондральной кости в зонах метафизов. В процессе постнатального развития скелета животных, когда выполнение локомоторных функций в значительной мере происходит при разной массе тела и связано с преодолением гравитации, активируются локальные регуляторные системы в зонах роста и моделирования скелета, обеспечивающие интенсивную минерализацию хряща и способствующие усилению конструкции костей.

Ключевые слова: позвоночные, развитие, эпифизарные хрящи, кости конечностей, минерализация, ремоделирование.

Zhitnikov A. Ya. Structural-Metabolic Features and Dynamics of Replacement of Cartilage with **Bone Skeleton in Terrestrial Vertebrates with Different Locomotor Loads.** — In the paper presents the embryological, histological, histochemical and autoradiographic data on the dynamics of the formation, structure and mineralization characteristics of cartilage growth plates and modeling of short and long limb bones of animals (Rana temporaria, Gallus domesticus, Rattus norvegicus, Nyctalus noctula) with different conditions of development (larval, egg, placental) and support-power load on the skeleton. We discuss the the cellular mechanisms of growth heterochrony and adaptation of the skeleton limbs of terrestrial vertebrates to various locomotor and mechanical loads. The resulting amount of factual material and attracted scientific data allowed to establish the relationship of the intensity of the biosynthesis by chondrocytes of the epiphyseal cartilage of short and long bones of limbs sulfated glycosaminoglycans with the pace of their terminal differentiation and growth rate. It is shown that the regulation of the volume of cartilage and bone in the areas of bone formation and replacement of long and short bones is achieved by changing the speed and magnitude of the structural transformation of chondrocytes and matrix of epiphyseal cartilage. Strength properties and functionality of limb bones of different groups of vertebrates are achieved in ontogenesis by enhancing matrix calcification of epiphyseal cartilage containing hypertrophic chondrocytes, and an increase in the relative amounts of the components of the endochondral bone in the zones of metaphyses. During the postnatal development of the skeleton of animals when the execution of locomotor function largely occurs at different body weight and involves overcoming gravity activated local regulatory systems in the zones growth and modeling of the skeleton supporting intense mineralization of cartilage and contribute to strengthening the structure of the bones.

Key words: vertebrates, development, epiphyseal cartilage, limb bones, mineralization, remodeling.

#### введение

В период пренатального и постнатального роста животных кости конечностей имеют правильную, генетически обусловленную форму и длину, соотносительные пропорции и симметричны между двумя сторонами тела. Это достигается регулированием роста и морфогенеза скелета, в который вовлекаются генетические, гормональные, пищевые и экологические факторы (Farnum, Wilsman, 1998; Kronenberg, 2003; Nilson et al., 2005). Изменения в растущем скелете обычно возникают при различных внешних нагрузках (изменение среды обитания, влияние антропогенных и механических факторов) и в значительной степени зависят от свойств росткового хряща (Blunk et al., 2002). Однако у каждого вида животных существует определённый уровень внутреннего контроля и адаптивного регулирования роста и моделирования костей в пределах физиологических величин. Считается, что если нагрузки действуют в пределах физиологической величины и частотных диапазонов, то они имеют ограниченное влияние на генетические и гормональные средства управления этими процессами. Тем не менее в течение развития и физиологического функционирования скелет конечностей испытывает постоянное давление (растяжение, сжатие, скручивание) и на него действует сила гравитации, обеспечивающие моделирование, рост кости и её массу в зонах преобладания механических сил (Rauch, 2005). В зависимости от особенностей действующих механических сил, каждый скелетный элемент подвергается ряду характерных изменений, включающих в себя дифференцировку хондрогенных и остеогенных клеток, разрушение хряща, эндохондральный остеогенез и формирование в эпифизах вторичных центров окостенения (Putz, 1996; Parfitt, 1997). Однако недостаточно полно представлены научные данные, касающиеся особенностей моделирования и гетерохронии роста костей скелета свободных конечностей у животных с разным типом локомоции.

Известно, что в эмбриональный период развития животных формирование в почке конечности хондробластем, проспективно соответствующих будущим скелетным элементам, происходит по общим биологическим законам и имеет проксимодистальный градиент распространения. Структуры, возникающие первыми (закладки стилоподия), имеют определенное временное преимущество по уровню дифференцированности перед хондробластемами, из которых формируются скелетные элементы предплечья и фаланг. Однако в последующие периоды эмбрионального морфогенеза скелета конечностей и в постнатальном онтогенезе многих позвоночных темпы роста костей зейгоподия и автоподия могут доминировать (Thurston et al., 1983; Kirkwood et al., 1989; Kuhn, 1996; Ковтун, Житников, 1995; Farnum et al., 2008). В результате у взрослых животных их абсолютные размеры значительно превышают кости стилоподия. Основную роль в этом процессе выполняют генетические механизмы контроля морфогенеза и роста скелета, закреплённые эволюционно и гетерохронно активирующиеся в скелетных закладках животных разных классов, отрядов, видов (Hunziker, 1994; Серов, 2004; Лисков, 2001; Корочкин, 2001; Sears, 2008). В то же время исследование клеточных механизмов роста скелетных элементов конечностей у позвоночных позволило также установить, что на их соотносительные размеры и темпы роста могут влиять репродуктивные и метаболические свойства хондроцитов эпифизарных хрящей (Ianotti, 1990). Существующее разнообразие морфологических форм и размеров костей в скелете конечностей позвоночных предполагает также проявление в онтогенезе животных видовой специфичности в темпах и направленности репродукции и дифференцировки хондроцитов эпифизарных хрящей (Житников, 1976; Kember et al., 1990; Ковтун, Житников, 1995; Kirkwood, Kember, 1993). По этой причине гомологичные скелетные элементы животных достигают дефинитивных размеров и определённой морфологической структуры за разный период развития. Имеющиеся научные данные не раскрывают в полной мере клеточных взаимодействий в эпифизарных хрящах, обеспечивающих разный по интенсивности и продолжительности соотносительный рост костей, т. е. гетерохронию развития скелета, и не позволяют установить роль клеточных и молекулярно-генетических процессов в его адаптации к различным локомоторным и механическим нагрузкам в онтогенезе и филогенезе животных.

### 1. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЭПИФИЗАРНЫХ ХРЯЩЕЙ И РОСТ СКЕЛЕТА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МЕХАНИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Скелет свободных конечностей позвоночных всех классов закладывается в принципиально одинаковом виде (Tickle, 2004). Изначально это проявляется при формировании хондробластем, а в дальнейшем — при развитии провизорных хрящевых закладок. Важно отметить, что скелетные элементы не только формируются в неразрывной связи друг с другом, но и сохраняют структурную взаимосвязь в дальнейшем. На таком общем фоне, который обеспечивается влиянием формообразующих факторов и генетическим контролем, развитие каждого из элементов скелета свободных конечностей происходит относительно самостоятельно. Установлено, что развитие и морфологическая конструкция гомологичных костей животных однотипной популяции является генетически предопределённой по интенсивности роста и морфогенеза, характеризуется сходными параметрами клеточного метаболизма и репродукции в эпифизарных хрящах и в зонах периостального и энхондрального остеогенеза (Kember, Kirkwood, 1987; Kember et al., 1990; Kirkwood, Kember, 1993). Это подтверждается научными данными общебиологического уровня генетического контроля дифференцировки и метаболизма клеток (Корочкин, 2002; Серов, 2004; Миташов, 2005, 2007). На основании этих данных был сделан вывод, что функционально важные для развития гены (обеспечивающие дифференцировку, транскрипционную функцию, кодирующие трансмембранные белки и контролирующие проведение между клетками индукционных регуляторных сигналов) эволюционно консервативны и обеспечивают у позвоночных выполнение сходных функций при развитии (Серов, 2004). Достижения молекулярной биологии и генетики были востребованы и успешно применены при изучении хондрогенеза и процессов, связанных с замещением хрящевой ткани костной (Садофьев, Подгорная, 1999; St.-Jacques et al., 1999; Horner et al., 1999; Engsig et al., 2000; Matsuo et al., 2001; Akiyama et al., 2004; Andrade et al., 2007). В то же время широкое разнообразие морфологических форм животных предполагает обязательным условием развития, в том числе скелета конечностей, наличие видовой специфичности. В связи с чем в настоящее время внимание большинства зарубежных исследователей сосредоточено на изучении молекулярных регуляторных систем активности хондроцитов в зонах роста скелета (Robson et al., 2002; Adams et al., 2007; Mikic et al., 2008; Cooper et al., 2013). Исследуются метаболические и транспортные пути передачи информации от гуморальных, трофических и локальных систем контроля на геном хондроцитов с последующей экспрессией специфических генов их дифференцировки (Mansfield et al., 1999; Serra et al., 1999; Wu Qingian et al., 2000; D'Angelo et al., 2001 a, b; Farquharson et al., 2001; Nakashima et al., 2002; Ehlen et al., 2006; Weiguang Wang et al., 2009 и др.). Это направление является в настоящее время наиболее перспективным с точки зрения практической реализации Международной программы по разработке фармакологических и молекулярно—генетических методов борьбы с врожденными патологиями развития скелета — ахондроплазии (Robson, 2002). При нарушениях и дисбалансе локальных факторов дифференцировки клеток формируется укороченный скелет свободных конечностей, ограничивается рост органов, массы всего тела (Robson, 2002).

Второе направление исследований формировалось как фундаментальное. Основой его являлось сравнительное изучение механизмов роста скелета у различных позвоночных животных или же исследование действия на эти процессы физических, гуморальных факторов, а также факторов загрязнения окружающей среды (Житников, 1976, 1980, 1998, 2004 а; Бруско, 2005; Гортинская, 2005; Ковешников и др., 2005; Гайко и др., 2007; Никитюк и др., 2007; Reno et al., 2007; Wilsman et al., 2008; Zuscik et al., 2008). Основное заключение по результатам этих исследований состоит в том, что возможности интенсивности и продолжительности роста скелета, кроме перечисленных выше молекулярно-генетических механизмов, определяются и зависят также от структуры эпифизарных хрящей по концентрации хондроцитов, их размеров при терминальной дифференцировке. Такие особенности эпифизарных хрящей формируются ещё в период эмбрионального развития животных (Житников, 2003) и в постнатальном онтогенезе обеспечивают рост скелета при системном (гуморальном и трофическом) и локальном (цитокины, морфогенные белки) регулировании процесса по интенсивности и продолжительности (Kirkwood, Kember, 1993). Таким образом, структура эпифизарных хрящей в значительной мере зависит от продолжительности и темпов линейного роста скелетных элементов (Житников, 2007 б; Wilsman et al., 2008).

Важную роль в функционировании эпифизарных хрящей выполняют и некоторые типы углеводосодержащих и белковых макромолекул, которые синтезируются в хондроцитах и являются энергетическим субстратом, участвуют в формировании межклеточного матрикса: гликоген, гликопротеины, гликозаминогликаны, коллаген (Lash, Vasan, 1983; Buckwalter et al., 1987; Wezeman, 1998; Hall, 2005). Их количество и соотношение в хондроцитах и матриксе структурных зон эпифизарных хрящей постоянно изменяются (Buckwalter, 1987; Wezeman, 1998), что может влиять на темпы терминальной дифференцировки, минерализацию хряща и особенности замещения хрящевой ткани костной (Zhitnikov, 1978). Исходя из изложенного, исследование метаболизма, репродукции и терминальной дифференцировки хондроцитов в эпифизарных хрящах длинных и коротких костей у животных разных классов, отличающихся условиями развития и способом локомоции, позволит установить значимость каждого из этих процессов на темпы и продолжительность роста скелетных элементов с целью разработки способов его регулирования.

В то же время многие морфогенетические закономерности развития скелета конечностей у различных видов млекопитающих изучены недостаточно (Lahiji, 2000; Фатхутдинов, 2005; Bluteau, et al., 2007). Установлено, что рост длинных костей во многом связан с функциональной активностью хондроцитов пластинки роста (Nemoto et al., 2000; Tachibana et al., 2000; Anderson, Shapiro, 2010). Следует отметить, что сведения об особенностях морфофункциональной организации эпифизарных хрящей в онтогенезе у различных видов позвоночных в современной отечественной и зарубежной литературе не нашли должного отражения. Однако было установлено, что в различные периоды индивидуального развития организма рост скелетных закладок конечностей осуществляется неравномерно. В процессе формирования хрящевой ткани из мезенхимы, а затем на стадии провизорного хряща изменяются отношения в системе «клетка-матрикс», что реализуется в изменении её гистохимических особенностей и выполнении специфических функций. Хрящевая пластинка возникает в эмбриогенезе как провизорная структура, обеспечивая функцию роста скелета свободных конечностей, и исчезает после его завершения (Ballock, O'Keefe, 2003; Anderson, Shapiro, 2010; Lui et al., 2011). Рост и моделирование скелетных элементов это активный и динамический процесс, который обеспечивается взаимодействием

трёх структур: эпифизарного хряща, периостальной и эндохондральной костей (Ulici et al., 2008). В пределах ростковой пластинки хондроциты размножаются, гипертрофируются и синтезируют хрящевой матрикс (Nilsson et al., 2005). Формирующаяся по наружному контуру периостальная кость вместе с эпифизарным хрящом обеспечивают продольный рост кости. И, наконец, образование метафизарной губчатой кости (эндохондральной), создающей достаточно прочную костно-хрящевую структуру в зонах замещения хряща костью, обеспечивает скелетному элементу адаптацию к возникающим в процессе онтогенеза различным опорно-силовым нагрузкам. Таким образом, рост и формообразование кости как органа локомоции происходит в результате последовательного размножения хондроцитов, синтеза и минерализации внеклеточного матрикса, гипертрофии клеток, инвазии сосудов и, в конечном счёте, гибели клеток в зонах эндохондрального остеогенеза (Provot, Schipani, 2005; Житников, 2007 а, б; 2011). Кровеносные сосуды и сопутствующие остеогенные клетки проникают в ростковый хрящ, где локализованы уже гипертрофированные хондроциты. Они дифференцируются в остеобласты и обеспечивают синтез костной субстанции на основе хрящевого матрикса. Последний в этом процессе выступает биологической матрицей при условии определённой биохимической и структурной его готовности (Nilsson et al., 2005). Регулирование развития костей при участии эпифизарных хрящей по скорости, продолжительности и интенсивности обеспечивается сложным системным и локальным взаимодействием гормонов и факторов роста. К ним относятся гормон роста, инсулиноподобный фактор роста 1, глюкокортикоиды, гормон щитовидной железы, эстрогены, андрогены, витамин D и leptin (Juul, 2001; Eerden van der et al., 2003; Nilsson et al., 2005; Shao et al., 2006). На системном уровне это происходит при тесном взаимодействии циркулирующих в крови гормонов, а на локальном — в результате синтеза пептидных факторов роста, которые инициируют в цитоплазме каскад реакций, обеспечивающих специфическую генную экспрессию в хондроцитах пластинки роста (Ballock, O'Keefe, 2003; Lefebvre, Smits, 2005; Tryfonidou et al., 2010). Кроме того, для формирования в зонах замещения на основе хряща костной ткани требуются постоянные взаимодействия между хрящом, инвазией в него кровеносных сосудов и дифференцировкой остеогенных клеток (Odgren et al., 2003; Anderson, Shapiro, 2010). Способствует терминальной дифференцировке хондроцитов и является необходимой предпосылкой для взаимодействия хондрогенеза и остеогенеза накопление в зонах гипертрофированного хряща ростковых пластинок кальция и фосфорных соединений — минерализация (Rodriguez et al., 2005). Этот процесс регулируется витамином D (Hendy, Goltzman, 2005). Определяющим для нормального роста скелетной закладки является баланс и корреляция между пролиферацией и дифференцировкой хондроцитов эпифизарных хрящей и остеобластов периоста и эндоста. Взаимодействие клеточных популяций контролируется различными гормонами, включая гормон роста и инсулиноподобный фактор роста 1 (Bex, Bouillon, 2003; Savendahl, 2005; Tryfonidou et al., 2010). Исследования на лабораторных животных позволили установить и роль эстрогенов в росте длинных костей, в регулировании их массы и структурных изменений (Juul, 2001). Эти гормоны влияют на дифференцировку хондроцитов в период постнатального развития скелета и способствуют раннему закрытию пластинки роста. Они могут ингибировать периостальный остеогенез в растущей кости и в то же время усиливать эндостальное рассасывание кортикальной кости (Eastell, 2005; Savendahl, 2005). Деформации в растущем скелете обычно возникают при различных внешних нагрузках (изменение среды обитания, влияние антропогенных и механических факторов) и в значительной степени зависят от свойств росткового хряща (Blunk et al., 2002; Reich et al., 2005). Однако у каждого вида животных существует определённый уровень внутреннего контроля и адаптивного регулирования роста и ремоделирования костей в пределах физиологических величин. Считается, что уровень физической активности (или нагрузки на скелет) оказывает мало влияния на возможный размер и высоту животных. Нагрузки на скелет имеют ограниченное влияние на генетические и гормональные средства управления ростом, если действуют в пределах физиологической величины и частотных диапазонов.

Приведенные данные по структурно-метаболическим и физиологическим аспектам развития кости позволяют осмыслить процессы, связанные с влиянием двигательной активности, давления и растяжения на эпифизарную пластинку и формирующуюся кость у животных с разным типом локомоции (полёт, прыжки, бег). В течение развития и физиологического функционирования скелет конечностей испытывает постоянное давление (растяжение, сжатие, скручивание) и на него действует сила гравитации, обеспечивающие моделирование, рост кости и её массу в зонах преобладания механических сил (Rauch, 2005). Силы давления, растяжения и скручивания начинают влиять на рост скелета конечностей и формирование морфологической конструкции костей ещё в период эмбриогенеза в связи с началом подвижности эмбрионов. Их влияние ещё более усиливается после рождения, когда на растущий скелет начинает оказывать действие сила гравитации и постоянно увеличивающаяся масса тела, что приводит к структурно-метаболическим изменениям в зонах роста и моделирования скелетных закладок, обеспечивая рост костей и их массу в направлении преобладания механических сил. По данным Парфитт (Parfitt, 1997), у каждого индивидуума формирование костной массы различных скелетных закладок является детерминированным процессом, который регулируется двумя классами генов. Первый класс генов обеспечивает рост мышц и костей. Второй класс генов ответсвенен за увеличение плотности кости в ответ на нагрузку. Поэтому в зависимости от локомоторных нагрузок и действия механических сил, каждый скелетный элемент подвергается ряду характерных изменений, включающих разрушение хряща, эндохондральный остеогенез и формирование вторичных центров оссификации (Putz, 1996). Кроме того, продольный рост костного диафиза и увеличение толщины кортикальной кости взаимосвязаны с периостальным остеогенезом (Parfitt, 1997). Согласно данным Рауха (Rauch, 2005), аппозиционный рост толщины кости при участии периоста регулируется биомеханическими факторами. При нагрузке трабекулы эндоста в зоне замещения и кортикальная кость диафиза становятся толще за счёт аппозиционного формирования костной ткани, что и способствует увеличению её плотности (Parfitt, 1997). В самой кости, как органе, внутренние метаболические процессы и биофизические силы обеспечивают её развитие, в то время как внешние силы оказывают сопротивление её расширению в функциональных пределах (трабекулярная конструкция и внешняя форма) (Forriol, Shapiro, 2005). Установлено также, что механические нагрузки (факторы) стимулируют синтез внеклеточных белков in vitro и in vivo и могут влиять на окончательную структуру кости в зонах роста (Kao, Smith, 1997). Передача механических сигналов к хондроцитам пластинки роста происходит в результате давления на клетки при сжатии или растяжении и зависит от биохимического состава окружающего их внеклеточного матрикса. Тонкая пластинка роста, которая размещена в пределах жесткой костной ткани, подвергается большим гравитационным и мышечным нагрузкам, испытывает давление в нормальных физиологических условиях и в ней происходит медленный обмен изза низкой проходимости жидкости в смежной кости (Radhakrishnan et al., 2004; Villemure et al., 2007). Механические свойства пластинки роста сопоставимы с суставным хрящом, и обе хрящевые ткани имеют общее сходство в структуре и биохимическом составе. При давлении на ростковую пластинку её механические свойства не однородны на различной глубине. Эта неоднородность отличается у различных видов животных и на разных стадиях развития. Однако наименее жёсткой областью в ростковых хрящах разных животных является зона гипертрофированных хондроцитов. Высокому давлению подвергаются резервные и гипертрофиче-

ские зоны ростковых хрящей, а более низкому — зоны пролиферации (Villemure et al., 2007). В пластинке роста локтевой кости быка эпифизарная-резервная зоны в продольной и поперечной оси были в два раза жёстче, чем зоны пролиферации-гипертрофии (Cohen et al., 1994; Sergerie et al., 2009). Эти данные позволяют предположить, что более плотная резервная зона, которая составляет значительную часть высоты пластинки роста у крупных животных, может выполнять большую механическую функцию в эпифизарных пластинках крупных видов, которые растут медленно, но длительное время, испытывая значительные механические нагрузки на скелет конечностей. Натяжение ткани также неоднородно в пределах росткового хряща, и имеются различия между клетками и межклеточным матриксом в зонах пролиферации и гипертрофии (Bachrach et al., 1995). Беспорядочно ориентированная сеть коллагена в резервной зоне, по сравнению с его продольной ориентацией в зонах пролиферации и гипертрофии, может частично объяснить эти различия (Fujii et al., 2000). Локальные изменения в механических свойствах пластинки роста на поперечном сечении обнаружены при её сжатии. Так, в образцах ростковых хрящей бедренных костей быка внутренние участки были приблизительно на 40 % более твёрдыми и на 75 % менее водопроницаемыми, чем те, которые расположены на периферии. Этот феномен обоснован исследователями повышенной концентрацией клеток и содержанием воды в периферийных областях пластинки роста (Chen et al., 1984). Продольная твёрдость пластинки роста при давлении может меняться в зависимости от стадии развития скелетных закладок и животного в целом. Например, пластинки роста большеберцовой кости крыс, которые исследовались на четырёх стадиях развития в условиях полной неподвижности или комбинировании различных воздействий, уменьшались на 12 % у 35-дневных крыс и увеличивались у 56- и 80-дневных крыс на 20 и 94 % по сравнению с 21-дневными (Villemure et al., 2009). При натяжении жёсткость пластинки роста изменяется неравномерно в различных структурных зонах. Так, боковая (латеральная) область пластинки роста большеберцовой кости быка является более крепкой и твердой по отношению к средним и центральным (Williams et al., 2001). Согласно закону Хюнтера-Фолькмана принято считать, что увеличение давления (сжатие) на пластинку роста снижает скорость роста, а растяжение, наоборот, увеличивает. Однако при такой трактовке не принималась во внимание характеристика самой нагрузки (её скорость, статическая или циклическая), а также такие факторы как размеры пластинки роста, стадия зрелости и связанные с ней темпы роста, которые могут влиять на восприимчивость структуры к механической нагрузке. Подтверждением сказанному являются экспериментальные данные Хун Парка с соавтор. (Hoon Park et al., 2012). Уменьшив нагрузку на задние конечности 1,5-месячных крыс путём подвешивания в течение 3 недель по методу Морей-Холтон и Глобас (Morrey-Holton, Globus, 2002), исследователи установили, что в ростковых хрящах снижается количество пролиферирующих хондроцитов. Размер эпифизарных хрящей в большеберцовой кости уменьшается за счёт зон пролиферации и гипертрофии, что может привести к задержке роста. После дополнительной нагрузки на такие конечности в течение одной недели пролиферативный потенциал хондроцитов снова возрастает, равно как и высота структурных зон эпифизарного хряща. Таким образом, очевидно, что пониженная нагрузка на растущие кости конечностей также может ингибировать их рост. Однако в пластинках роста костей, на которые действуют длительные статические нагрузки с повышенным давлением (сжатием), также происходят изменения, свидетельствующие о снижении темпов продольного роста (Cancel et al., 2009; Stokes et al., 2005, 2006, 2007). Необходимо также отметить, что статические и динамические нагрузки оказывают существенный положительный эффект прежде всего на прочность кости и её поперечное сечение, вызывая, согласно закону Вольфа, изменения во внутренней архитектуре кости, особенно трабекулярной. Изменения в ориентации и размере трабекул прямо взаимосвязаны с направлением и величиной преобладающего циклического механического давления: при наибольшем давлении плотность кости повышается и обеспечивается её аппозиционный рост. Хотя многочисленные эксперименты показывают, что рост кости и её масса зависят от продолжительности нагрузки, однако при разных уровнях двигательной активности различия в интенсивности роста являются незначительными (Niehoff et al., 2004), т. е. темпы роста скелета не очень зависят от влияния динамической нагрузки. В экспериментах in vivo для количественного определения механических колебаний на темпы роста скелета использовали аппарат, обеспечивающий различную нагрузку на эпифизарные пластинки костей (Stokes et al., 2006). Темпы роста измеряли путём сопоставления длины кости у контрольных и подопытных животных радиографически или с помощью введения одного или более флуорохромов, которые in vivo метили минерализующуюся кость. Было установлено, что между продолжительностью растяжения или сжатия и изменением скорости роста существует прямая зависимость. Влияние давления на темпы роста скелета авторы исследования определяли на примере развития позвонков и пластинок роста большеберцовых костей трёх разновидностей животных (Rattus norvegicus, Oryctolagus cuniculus, Bos taurus). Эти эпифизарные пластинки обеспечивали разные, свойственные каждой кости темпы роста, изменяющиеся от 30 мкм/день для позвонков крысы до 366 мкм/день для проксимальной зоны большеберцовой кости кролика. Исследователи не получили доказательств какого-либо порогового давления, при котором темп роста мог бы не изменяться под влиянием механической нагрузки. Регрессивная зависимость между темпами роста и фактическим давлением (скорость роста чувствительна к давлению) не отличались у животных разных видов и различного возраста, но были несколько большими в большеберцовой кости, чем в позвонках. Пластинки роста костей крыс, которые были подвергнуты сжатию давлением 0,1 МПа только в течение 12 ч из 24-часового цикла, имели такие же размеры как и те, которые подвергались 24-часовому сжатию давлением такой же величины (Stokes et al,. 2005). Картер и Вонг (Carter, Wong, 1988) предложили модель оссификации кости, которая учитывала влияние гидростатического и деформационного давления и растяжения. Анализ такой модели показал, что многогранное, деформационное давление способствует развитию энхондральной оссификации, а гидростатическое давление способствует сохранению хрящевой ткани и дальнейшему развитию суставного хряща. Однако эта модель основывается лишь на двумерных стимулах и не учитывает направление роста и анизотропную природу самого эпифизарного хряща (Lin et al., 2009). Очень сильное сжатие кости, как известно, задерживает рост. Экстраполяция средней нормы подавления роста на 17,1 % при давлении 0,1 МПа предполагает, что длительное давление на уровне 0,6 МПа привело бы к 100 %-ому подавлению роста. Таким образом, отношение давление-рост подчиняется определённым линейным закономерностям. Эта точка зрения поддержана исследованиями, непосредственно изучающими влияние давления на задержку или остановку роста. По данным Белски-Аустров с соавтор. (Bylski-Austrow et al., 2001), для задержки или остановки роста необходимо давление соответственно 0,51 и 1 МПа или больше чем 0,3-0,5 МПа (Bonnel et al., 1983; Safran et al., 1992). Задержку (остановку) роста костей можно осуществить хирургическим способом, применяя скобы поперёк пластинки роста. Однако такой подход может привести к значительному её разрушению (Farnum et al., 2000), нарушению оссификации хряща и кости и преждевременному формированию эпифизарно-диафизарного синостоза (Ehrlich et al., 1972). Измерения деформации при применении скоб показывают, что при давлении приблизительно 1 МПа происходила остановка роста в зонах проксимального эпифизарного хряща большеберцовой кости людей (Bylski-Austrow et al., 2001).

Для решения поставленных в исследовании задач возникла необходимость детального рассмотрения данных научной литературы, касающихся биологических

механизмов минерализации в ростковых хрящах. Этот процесс является важной составляющей обеспечения механической прочности скелета животных в условиях разных локомоторных нагрузок (Ali, 1983; Hunziker, 1994; Anderson et al., 2005; Anderson, Shapiro, 2010). В настоящее время ещё не сформулирована научнообоснованная концепция, касающаяся особенностей формирования и отложения в матриксе хряща минеральных субстратов, их взаимосвязи с различными органическими компонентами. Это затрудняет понимание причин отсутствия кальцификации в зонах гипертрофии ростковых хрящей скелета некоторых позвоночных (Житников, 2012 а, б). Известно, что кальцификация в ростковых хрящах скелете представляет собой комплекс физико-химических и физиологических процессов, при взаимодействии которых образуется и откладывается в матриксе определённых зон хряща неорганическое вещество в виде нерастворимых солей фосфата кальция. Формирование твёрдой фазы неорганического минерального вещества хрящевого матрикса происходит в течение нескольких этапов. На первом из них растворимые ионы кальция и фосфора объединяются, формируя нерастворимый компонент в виде небольших твёрдых частиц фосфата кальция — Ca<sup>3</sup>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. На втором этапе эти частицы растут, формируя первые кристаллы апатита. На третьем — происходит увеличение количества кристаллов и продолжается их рост до насыщения хрящевого матрикса. Однако высокая концентрация кальция и фосфора в сыворотке и межклеточной жидкости хряща ещё не является достаточным основанием, чтобы de novo формировать кристаллы. В связи с этим выделяют три дополнительные группы факторов, которые обязательны для того, чтобы инициировать или не препятствовать кальцификации: 1) наличие в ткани полимерных макромолекул, которые могли бы способствовать формированию центров отложения минерала. Если же макромолекулы присутствуют, то необходимо убрать барьеры, блокирующие их активность; 2) наличие локальных факторов, повышающих концентрацию растворимых ионов Ca<sup>2+</sup> и PO<sup>4-</sup> до уровней, при которых происходит спонтанное отложение минерала; 3) удаление из зоны минерализации хряща ингибиторов этого процесса. Локальным фактором инициации минерализации хряща может быть щелочная фосфатаза (фосфомоноэстераза) и присутствие в хондроцитах фосфорилазы и гликогена (Robison, 1923). Последний является источником фосфатсодержащих субстратов. Расчепление гликогена при участии фосфорилаз и наличие щелочной фосфомоноэстеразы могут обеспечивать формирование фосфата кальция. Важную роль в этом процессе играют и другие белковые молекулы, которые не связаны с субстратами, содержащими фосфор. Анексин V, например, концентрируется на мембранах матриксных везикул и функционирует как переносчик ионов кальция по каналам мембран внутрь везикул, повышая таким образом концентрацию ионов кальция (Ca<sup>2+</sup>) и ортофосфата (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (Rojas et al., 1992; Kirsch, Wuthier, 1994; Kirsch et al., 1997; Roach et al., 2004). В ростковом хряще были обнаружены и другие не коллагеновые белки, которые в большей степени характерны для костной ткани: сиалопротеин (BSP), остеонектин (ON), остеокальцин (OC) (Missana et al., 1998). Однако только сиалопротеин оказался причастным к минерализации хряща (Hunter, Goldberg, 1993). Протеогликаны и коллаген хряща способствуют созданию инициаторных точек отложений фосфата кальция путём снятия или блокирования локальных факторов, ограничивающих этот процесс. Скорость роста кристаллов зависит и от внешних условий. К ним можно отнести уровень ионов Ca<sup>2+</sup> и PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> в межклеточной жидкости, которые при высокой концентрации ускоряют минерализацию; а также pH внеклеточной жидкости, содержащей молекулы, которые контролируют скорость отложения минерала (Howell, 1971). В эту группу входят также: 1) коллаген I и II типа, способствующие осаждению кальций-фосфатов (Kirsch, Wuthier, 1994; Wu et al., 1989); 2) Са-связанные протеины, включая костный сиалопротеин (BSP), которые способны усиливать минерализацию (Hunter, Goldberg,

1993); 3) связанные с кальцием кислые протеогликаны межклеточного матрикса, которые могут блокировать ионы Ca<sup>2+</sup>, ингибируя распространение минерала внутри ростковой пластинки хряща (Chen et al., 1984; Dziewiatkowski, Majznerski, 1985); 4) активность специфических щелочных фосфатаз и локальная концентрация за пределами матриксных везикул субстратов, содержащих РО<sub>4</sub><sup>3-</sup>(АТФ, ФМФ, РР), в освобождении фосфата которых они принимают участие (Anderson et al., 2004). Эти субстраты подвергаются гидролизу с освобождением неорганического фосфата, который включается в минерал при участии неспецифической щелочной фосфатазы. Можно считать, что минерализация внеклеточного матрикса хряща является комплексным и многофакторным процессом, ингибиторами и активаторами которого выступают матриксные протеины с различными свойствами и активностью (D'Angelo et al., 2001 a, b; Ortega et al., 2003). Всё более понятными становятся и молекулярные механизмы минерализации, которая обеспечивается экспрессией регуляторных протеинов хряща (D'Angelo et al., 2001 b). В то же время требуются дополнительные исследования и научные факты, которые могли бы позволить ответить на следующие вопросы, возникающие при исследовании хондрогенеза и роста скелета в сравнительном ряду позвоночных:

1. Почему в ростковых хрящах скелета млекопитающих матриксные везикулы локализуются только в продольных перегородках хрящевого матрикса, где и формируется минеральный субстрат?

2. Почему в ростковых зонах хряща скелетных закладок птиц происходит очаговая минерализация, охватывающая матрикс по периметру лакуны гипертрофированного хондроцита, при этом матрикс рядом расположенного хондроцита может быть неминерализованным?

3. Почему кальцификация не происходит в зонах созревания и гипертрофии ростковых хрящей длинных костей земноводных?

4. Почему в зоны росткового хряща с гипертрофированными хондроцитами скелетных закладок амфибий не врастают кровеносные сосуды и отсутствует эндохондральная оссификация?

Из представленной научной информации, очевидно, что кости, как и все другие ткани и органы тела, растут, постоянно моделируются, и их органический и минеральный компонент матрикса обновляется. Эти процессы в скелете чувствительны к изменяющимся условиям внешней среды и механическим факторам, они отличаются у животных с разным типом локомоции. С позиций фундаментальной биологии и медицины сведения о возрастных особенностях формирования скелета свободных конечностей у животных позволяют приблизиться к пониманию возникающих аномалий и пороков развития его структурных компонентов, установить клеточные и молекулярно—генетические механизмы роста и адаптации скелета конечностей наземных позвоночных к различным локомоторным и механическим нагрузкам в процессе эволюционного развития.

Цель — изучить динамику формирования эпифизарных хрящей, особенности их минерализации, роста и моделирование костей конечностей животных (на примере: *Rana temporaria, Gallus domesticus, Rattus norvegicus, Nyctalus noctula*) с разными условиями развития (личиночные, яйцевые, плацентарные) и опорно-силовыми нагрузками на скелет;

 исследовать особенности репродукции и метаболизма хондроцитов при формировании и функционировании эпифизарных хрящей в коротких и длинных костях скелета конечностей животных с разными локомоторными нагрузками на скелет;

— определить метаболические изменения в хондроцитах и матриксе эпифизарных хрящей при замещении костью и формировании вторичных центров окостенения у животных с разным типом локомоции.

#### 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологическими объектами исследования являлись животные с разными локомоторными функциями конечностей и испытывающие неодинаковую механическую нагрузку на элементы скелета при развитии и функционировании. Проведено гистологическое исследование развития длинных костей задних конечностей амфибий (*R. temporaria*) с 30 сут личиночного развития до наступления метаморфоза (70 сут), сеголеток, 1- и 2-леток. Личинок земноводных выращивали в подготовленных бассейнах с мая по август. Перед проведением экспериментов с радионуклидами их содержали в помещении в аквариумах при температуре 24 °C. Сеголеток включали в эксперимент в августе-сентябре, а лягушек 1 и 2-летнего возраста — в марте-апреле. Эмбрионы птиц (G. domesticus) разных стадий развития (от 10 сут до выклева) получали, инкубируя яйца при температуре 37 °С в лабораторных условиях. Птенцов до 1 мес выращивали в виварии. Кроме этих биологических объектов, исследовали также структуру ростковых хрящей и эндохондральных трабекул в длинных костях эмбрионов и плодов других позвоночных. К ним относятся белые крысы (*R. norvegicus*) от 15 сут эмбриогенеза до рождения (21 сут), крысята от рождения до 1 мес; 1-недельные кроли (O. cuniculus); плоды летучих мышей (N. noctula) длиной туловища 1,5–2,5 см (новорожденные) и до 12– 30 сут постнатального развития. Выделяли кости передних или задних конечностей, которые фиксировали в 10 %-ном формалине или по Шабадашу (Пирс, 1962). Объекты декальцинировали в 10 %-ной ЭДТК, обезвоживали в этанолах возрастающей концентрации, 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 эпифизом до зоны зрелых клеток. Измеряли диаметр росткового хряща по фронту созревающих хондроцитов, костномозговой полости в центре диафиза и толщину компактной или трабекулярной периостальной кости в этих участках. Определяли также высоту, ширину и объём гипертрофированных хондроцитов.

Методические приёмы для исследования размножения хондроцитов в развивающихся коротких и длинных костях животных разных классов подбирали с учётом особенностей их индивидуального развития (плацентарные, яйцевые и личиночные).

Для расчёта продолжительности фаз митотического цикла хондроцитов непосредственно в зоне пролиферации эпифизарных хрящей скелета свободных конечностей были проведены эксперименты на лабораторных животных (*R. norvegicus*) с <sup>3</sup>Н-тимидином (одноразовое и многократные введения). Этот нуклеотид включается в молекулы ДНК в период их биосинтеза в клетках, которые готовятся к делению. Маркируя таким способом популяцию хондроцитов, мы определяли в растущих костях количество размножающихся клеток и по этому признаку оценивали масштабность и интенсивность их роста (Киселёва и др., 1983). Специальные подходы с использованием <sup>3</sup>Н-тимидина позволили определить также временные параметры фаз митотического цикла и пул размножающихся клеток (Киселёва и др., 1983). Такой принцип анализа кинетики пролиферации особенно важен при исследовании растущих органов с чётким размежеванием клеток по пролиферации и биосинтезу специфических макроиолекул. К таким системам роста, в частности, относятся эпифизарные хрящи скелетных закладок, в которых эти свойства хондроцитов постоянно изменяются: от интенсивного размножения в соответствующей зоне до приобретения признаков гипертрофированных клеток с потерей метаболической и репродуктивной активности в зоне замещения. Кинетику размножения хондроцитов в хрящевых закладках 17-19-суточных плодов и крысят после рождения (2 недели) исследовали в нескольких экспериментах с использованием <sup>3</sup>Н-тимидина. Радионуклид в дозе 74 кБк/г вводили самкам внутрибрюшинно импульсно на 17 сут беременности или молодым крысятам 2-недельного возраста. Использовали крысят одного-двух помётов. Животных забивали с интервалом 3 ч в течение 72 ч после одноразового введения радионуклида. Для более четкой фиксации метки радионуклида над ядрами хондроцитов, пребывающими в фазе митоза, за час до умершвления животным вводили колхицин из расчета 0,004 мг/г. Такая схема экспериментов позволила рассчитать параметры митотического цикла хондроцитов по изменению процента меченых митозов и по изменению средней интенсивности метки над ядрами делящихся клеток. В другом эксперименте <sup>3</sup>Н-тимидин вводили крысам внутрибрюшинно, многократно в дозе 37 кБк/г с интервалом 6-8 ч в течение 36 ч. Такая схема позволила определить общее количество делящихся хондроцитов, т. е. пролиферативный пул клеток. Для определения продолжительности фазы синтеза ДНК хондроцитов проведён опыт с введением животным малой (37 кБк/г) и через 2 и 4 ч большой (185 кБк/г) дозы <sup>3</sup>Н-тимидина. Одновременно с большой дозой вводили колхицин (0,004 мг/г), забивая животных через 45 мин.

Особенности размножения хондроцитов в зонах роста скелетных закладок передних конечностей летучих мышей в эмбриогенезе и после рождения мы также исследовали с использованием <sup>3</sup>Н-тимидина. Однако незначительное количество беременных животных, отсутствие возможности получить экспериментальные объекты с датированными сроками внутриутробного развития ограничило наши возможности по использованию радионуклида. Поэтому его вводили лишь импульсно на 1, 24, 48 и 96 ч в дозе 37 кБк/г. Состояние скелетных закладок оценивали на гистологических препаратах по длине костей, степени развития костномозговой полости, структуре эпифизарных хрящей. Исследовали скелетные закладки плодов, имеющих теменно-копчиковую длину 1,5; 1,7 и 2,5 см (период рождения), а также у животных от 1 до 15 сут после рождения.

Параметры размножения хондроцитов в хрящевых закладках эмбрионов кур 5–19 сут развития, 1-недельных и 1-месячных цыплятах исследовали в нескольких экспериментах с <sup>3</sup>Н-тимидином. Радионуклид в дозе 1100 кБк на яйцо вводили в воздушную камеру на 5-е, 9-е и 15-е сут эмбрионального развития, 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 <sup>3</sup>Н-тимидина. Закладки скелета задних конечностей фиксировали в 10 %-ном формалине через 1, 3, 9 ч, 1, 6 и 10 сут. В другом эксперименте <sup>3</sup>Н-тимидин (доза 370 кБк на яйцо) инъецировали в воздушную камеру на 9-е и 19-е сут развития и 2-дневным цыплятам многократно (доза 37 кБк/г) 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 проведён опыт с введением животным малой (37 кБк/г) и через 4 ч большой (185 кБк/г) дозы <sup>3</sup>Н-тимидина. Одновременно с большой дозой вводили колхицин (0,004 мг/г), забивая животных через 45 мин.

В опытах на земноводных радионуклид вводили головастикам, указанных ранее стадий развития (доза 74 кБк/г). Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 4, 12, 24, 36 и 96 ч после импульсного введения <sup>3</sup>Н-тимидина. В другой группе земноводных (43-я–44-я стадия и после метаморфоза) <sup>3</sup>Н-тимидин инъецировали в дозе 37 кБк/г многократно с интервалом 7 ч на протяжении 42 ч. Животных умерщвляли через час после каждого введения радионуклида. И наконец головастикам и лягушатам вводили <sup>3</sup>Н-тимидин (37 кБк/г), а через 4 ч 10-кратную его дозу с колхицином (0,004 мг/г) на 1 ч. У головастиков и лягушат выделяли задние конечности, которые фиксировали в 10 %-ном формалине. Такие схемы экспериментов позволили рассчитать параметры митотического цикла хондроцитов (Tc), соотношение делящихся и неделящихся клеток (Np), а по изменению средней интенсивности метки над ядрами — определить количество повторных делений хондроцитов в зонах пролиферации быстро и медленно растущих костей.

Подсчитывали меченые ядра среди 500–1000 хондроцитов в зонах пролиферации длинных и коротких костей при однократном и многократном введении <sup>3</sup>Н-тимидина, а также над хондроцитами количество зёрен восстановленного серебра фотоэмульсии через 1–57 ч после однократного введения радионуклида. Исследовали соотношение меченых и немеченых митозов при импульсном введении <sup>3</sup>Н-тимидина, рассчитывая графическим методом временные параметры фаз митотического цикла (Епифанова и др., 1977). В каждом случае количество зёрен восстановленного серебра определяли над 50–100 ядрами хондроцитов. На полученных гистограммах исследовали распределение клеток по интенсивности метки через различные интервалы времени после однократного введения изотопа. В опытах с применением малой и большой доз радионуклида определяли соотношение сильно- и слабомеченых хондроцитов и по этим результатам рассчитывали продолжительность фазы синтеза ДНК.

Биосинтетическую активность хондроцитов в зонах созревания и гипертрофии оценивали в экспериментах с использованием радиоактивных индикаторов коллагенового (<sup>3</sup>Н-глицин и <sup>3</sup>Н-пролин), гликозаминогликанового (<sup>35</sup>S-сульфат натрия) и полисахаридного (<sup>3</sup>Н-глюкоза) биосинтезов. Радионуклиды вводили животным раздельно, внутрибрюшинно, импульсно на 1–96 ч, из расчета 37–370 кБк/г массы тела. Готовили радиоавтографические и гистологические препараты коротких и длинных костей. Интенсивность биосинтеза различных типов макромолекул определяли по концентрации зёрен восстановленного серебра фотоэмульсии над хондроцитами и матриксом хряща.

Скорость роста скелетных закладок оценивали по темпам приобретения хондроцитами, меченых <sup>3</sup>Н-тимидином, морфологических признаков созревающих или гипертрофированных клеток через 4, 6 и 9 сут после его введения, а также по изменению длины диафиза костей и костномозговой полости в процессе личиночного или эмбрионального развития животных. Темпы аппозиционного формирования костной ткани в диафизе определяли по перемещению в матриксе кости <sup>3</sup>Н-пролина через 1–96 ч после однократного введения животным. Гистохимическими методами в клетках и гиалиновом матриксе исследовали распределение гликогена и гликопротеинов (ШИК-реакция), сульфатированные глюкозаминогликаны (альциановый синий, сафранин О), щелочной фосфомоноэстеразы и кальция (реакция Гомори и Косса). Минерализацию хряща и кости оценивали по реакции Косса (Пирс, 1962) на недекальцинированных срезах, изготовленных с использованием микротома криостата MK–25. С этой же целью на 14 и 17 сут инкубации в воздушную камеру яиц кур вводили <sup>45</sup>Са в дозе 74 кБк/г массы тела на 1 и 72 ч. Через 1 ч остатки радиоактивного кальция удаляли физиологическим раствором, продолжая инкубацию в течение 72 ч. Ультраструктурные особенности созревающих и гипертрофированных хондроцитов изучали в эпифизарных хрящах длинных и коротких костей 10-суточных крыс и кроликов, 1-недельных цыплят. Из костей вырезали отдельные сегменты хряща, соответствующие исследуемым зонам (1 мм<sup>2</sup>). Материал фиксировали 2,5 %-ным раствором глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) в течение 30–45 мин. После кратковременной промывки в фосфатном буфере образцы помещали в осьмиевый фиксатор на 1,5 ч. Затем проводили обезвоживание в этанолах, насыщенных уранилацетатом, и заливали в эпон–812. Готовили ультратонкие срезы, которые дополнительно контрастировали и исследовали в электронном микроскопе «Тесла ВС–500».

Во всех экспериментах подопытных животных умерщвляли после эфирного наркоза, соблюдая все правила обращения с ними, согласно Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментах и в других научных целях. Проведена статистическая обработка и дана оценка морфометрических результатов с использованием программы Statistica (Windows).

### 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГИСТОГЕНЕЗА КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ

# 3.1. Моделирование закладок скелета конечностей в эмбриогенезе амфибий, птиц и млекопитающих

Провизорные хрящевые закладки скелета свободных конечностей в эмбриогенезе позвоночных формируются единым механизмом, который в общих чертах может быть представлен так. Первоначально в почке конечности образуются скопления клеток мезенхимы (хондробластемы), отличающиеся размерами и проспективно соответствующие будущим скелетным элементам (Мажуга и др., 1993). По мере их дальнейшего морфогенеза по периметру удлинённых хондробластем формируется перихондр, а локальные проявления генетически детерминированных взаимоотношений между темпами репродукции и дифференцировки хондрогенных клеток обеспечивают развитие хрящевых закладок разной длины и ширины с неодинаковыми структурными зонами и разным соотношением клеток и гиалинового матрикса (рис. 1, 2; табл. 1, 2). По морфологическим и функциональным признакам в них можно выделить нескольких зон: центр диафиза, два полюса (эпифизы) и две промежуточные зоны. Внутренний рост закладок осуществляется в основном за счёт размножения клеток и синтеза ими белковых и полисахаридных компонентов гиалинового матрикса, а продольный рост обеспечивает интенсивная пролиферация хондроцитов в промежуточных зонах, их последующая гипертрофия при сопутствующей дифференцировке остеогенных клеток периоста в зонах метафизов.

Особенностью роста и формообразования диафизарной части хрящевых закладок личинок лягушки травяной и эмбрионов курицы является продолжительная гипертрофия клеток в центре диафиза без последующего формирования костномозговой полости. Первоначальное увеличение объёма хондроцитов в центре диафиза связано с усилением метаболической активности этих клеток. Усиливается базофилия и альцианофилия цитоплазмы хондроцитов и их биосинтетическая активность, нарастает объём межклеточного матрикса. Постепенно объём хондроцитов по отношению к клеткам промежуточных зон увеличивается в 8–10 раз за счёт чрезмерной гидратации цитоплазмы. В ней появляется большое количество вакуолей, происходит фрагментация и дезагрегация эндоплазматического ретикулума (Dell<sup>°</sup>Orbo et al., 1992). Ядра набухают или становятся чрезмерно компактными. По всем морфологическим и метаболическим показателям в клетках нарушается сопряжение процессов транскрипции, трансляции, биосинтезов.

Состояние гипертрофированных хондроцитов с компактными ядрами определяется исследователями как хондроптоз, вариант апоптоза клеток (Roach et al., 2004). В них не обнаружена активность щелочной фосфомоноэстеразы, а межклеточный матрикс неминерализован (рис. 3, *A*). Наружный контур закладки — перихондр постепенно становится многослойным и хорошо васкуляризированным, в клетках его

внутреннего слоя гистохимическим методом обнаруживается щелочная фосфатаза (рис. 3, Б).

У личинок лягушки травяной на 30-е сут развития (40-я стадия) закладки бедренной и большеберцовой костей ещё хрящевые с чётким разграничением хондроцитов по морфологическим признакам на структурные зоны: два эпифиза, центр диафиза и две промежуточные, где локализована большая часть размножающихся хондроцитов (рис. 4). По периметру закладок в центре диафиза начинает формироваться периостальная кость за счёт клеток внутреннего слоя перихондра, что регистрируется по активности щелочной фосфомоноэстеразы — маркера дифференцировки остеобластов (рис. 3, Б). Перихондр становится периостом. Костная ткань, образующая наружный контур хрящевых закладок, тонкая и компактная, формируется по периметру закладки от центра в дистальном и проксимальном направлении одновременно с гипертрофией хондроцитов ростковых хрящей (рис. 3). За счёт взаимосвязи этих процессов, т. е. пролиферации и гипертрофии хондроцитов и дифференцировки остеогенных клеток периоста в зонах метафизов, хрящевые закладки растут в длину в течение последующих 15-20 сут (стадия 44), без формирования костномозговой полости (рис. 1, Б). Например, у личинок на 25-30 сут развития отношение длины диафиза к длине зоны гипертрофированных хондроцитов в бедренной или большеберцовой кости составляет 3 : 1. Через 15-20 сут удельный вес зоны с гипертрофированными хондроцитами равен около 80 % длины всего диафиза (рис. 1). Этот процесс взаимосвязан с распространением периостального остеогенеза по наружному контуру закладки: костная манжетка по периметру диафиза достигает границы с зоной размножающихся хондроцитов, проникая в глубь эпифиза (рис. 4, 8). Кость в этих участках тонкая, но ближе к центру диафиза существенно утолщается (до 25 мкм) за счёт продолжающегося аппозиционного формирования при участии периоста. Аппозиционный прирост кости диафиза составляет по нашим расчётам 1-1,2 мкм/сут. Это очень важный критерий, так как его можно использовать при характеристике скорости роста костей у земноводных в разные периоды развития и при варьирующей температуре окружающей среды. Сопоставляя толщину периостальной кости от края диафиза закладки, где она начинает формироваться, к центру, можно рассчитать продолжительность и интенсивность роста костей конечностей. В закладках скелета эпифиз как бы нанизан на покрытый костью хрящевой цилиндр диафиза. Латерально от метафизарных хрящевых зон диафиза он является продолжением суставного хряща, обеспечивая формирование большей площади сферической суставной поверхности (рис. 4, 8). При таких особенностях морфогенеза хрящевых закладок формируются подвижные сочленовные поверхности двух костей, а ширина всего диафиза сохраняется равномерной на протяжении длительного периода развития. Это обусловлено тем, что увеличение поперечного диаметра костей ограничено по наружному контуру — периостальной костью, а изнутри — самими же недостаточно активными по участию в наработке гиалинового матрикса гипертрофированными хондроцитами (рис. 4, 8). Поэтому на протяжении длительного периода роста закладок скелета диаметр хрящевого диафиза не изменяется по всей длине, составляя 240-250 мкм. Отношение его длины к ширине перед формированием костномозговой полости может быть выражено как 12 : 1 (табл. 3).

У эмбрионов кур уже к 12-м сут инкубации, т. е. перед началом формирования костномозговой полости, большая часть диафиза также представлена гипертрофированными хондроцитами. Их высота в два раза меньше, чем у личинок амфибий, составляя соответственно  $21,1 \pm 1,26$  и  $36,6 \pm 1,42$  мкм. Отношение длины диафиза к поперечному сечению в центре перед началом резорбции хряща составляет 16 : 1 (табл. 4). Исходя из этого соотношения, которое только возрастает в последующие сутки развития эмбрионов, очевидно, что продольный рост хрящевой закладки значительно опережает увеличение её поперечного диаметра. Изменение

Таблица 1. Структура зон пролиферации эпифизарных хрящей и скорость роста скелетных элементов конечности в онтогенезе *Rattus norvegicus* (1) и *Nyctalus noctula* (II)

1			
Период развития	Морфометрические показатели	Плечевая кость	Фаланги
15 arm	L	500	100
15 сут	n	60	7
	L	750	160
19 сут	n	70	11
	V (до рождения)	750-800	175
Lloponovinovino	L	350	160
поворожденные	n	32	13
2	L	200	100
2 недели	n	18	8
	L	180	75
4 недели	n	18	8
	V (после рождения)	270-300	90-100

# T a ble 1. Structure of the proliferation zones of the epiphyseal cartilage and the growth rate of the skeletal elements of the limb in *Rattus norvegicus* (1) and *Nyctalus noctula* (II) ontogenesis

Длина плодов* и период развития	Морфометрический показатель	Плечевая кость	Метакарпальная кость <sub>3</sub>	Фаланги
1,5 см		100	90	45
	L	900	630	480
1,7 см	n	120	80	50
	V (до рождения)	300	280	160
Uababayyyayyyya	L	1300	1100	560
поворожденные	n	165	130	60
	L	1550	1080	600
12 сут	n	145	130	65
	V (после рождения)	385	450	260

\* Пренатальный онтогенез.

т

П

Условные обозначения. L — общая длина дистальной и проксимальной зон (мкм); n — количество хондроцитов по длине зон; V — скорость роста костей (мкм/сут).

индекса, отражающего отношение длины диафиза к его поперечному сечению или только к диаметру хряща с гипертрофированными хондроцитами и костномозговой полостью, для каждого животного и для различных костей одного животного определяется генетической программой развития. Она реализуется в онтогенезе путём регулирования размножения и биосинтетической активности, а также скорости терминальной дифференцировки хондроцитов ростковых хрящей, метаболической активности остеобластов и остеокластов периоста и эндоста, продолжительности их функционирования. Костная ткань, опоясывающая весь диафиз хрящевой закладки курицы, постепенно становится губчатой с множеством трабекул, пространство между которыми заполнено кровеносными сосудами и остеогенными клетками (рис. 5). Максимальная толщина таких трабекул составляет 5–8 мкм и постоянно увеличивается в результате аппозиционного биосинтеза костного матрикса (табл. 4). Подтверждением сказанному является высокая активность щелочной фосфатазы по всему фронту формирования кости и включение в эти участки радиоактивного Таблица 2. Структура зон пролиферации эпифизарных хрящей и скорость роста скелетных элементов конечности в онтогенезе Gallus domesticus (1) и Rana temporaria (II)

Период развития	Морфометрические показатели	Бедренная кость	Большая берцовая кость	Фаланги
15 cum	L	750	750	200
15 Cy1	n	75	75	10-12
	L	800	850	200
19 сут	n	130	125	12
	V (до выклева)	2000	2500	250
Π	L	550	600	210
После выклева 1 сут	n	110	110	11
1	L	450	500	200
т неделя	n	95	100	11
	L	450	500	170
4 недели	n	60	55	15
	V (после выклева)	520	650	135

T a ble 2. Structure of the proliferation zones of the epiphyseal cartilage and the growth rate of the skeletal elements of the limb in *Gallus domesticus* (1) and *Rana temporaria* (II) ontogenesis

TT	
	II
11	11

Период развития	Морфометрические показатели	Бедренная кость	Большая берцовая кость	Фаланги
Ст. 41-42	L	400	410	ua purparkana
38-40 сут	n	32	34	не выражена
Ст. 43	L	220	250	35
43-45 сут	n	20—24	24	5—6
Ст. 44	L	220	230	35
47-49 сут	n	22	23	5
Ст. 54	L	200	210	45
70 сут	n	18	20	4
метаморфоз	V (стадия 41–54)	150	150	60

Условные обозначения. L — общая длина дистальной и проксимальной зон (мкм); n — количество хондроцитов по длине зон; V — скорость роста костей (мкм/сут).

кальция (Ca<sup>45</sup>). Метка локализуется по фронту остеогенеза и минерализации костной ткани. Щелочная фосфатаза обнаружена также в гипертрофированных хондроцитах и матриксе вдоль границы с периостальной костью (рис. 6). Однако по результатам реакции Косса и включению радиоактивного кальция отложение минеральных кристаллов в матриксе хряща не происходит (рис. 7). Хрящевой диафиз длинных костей кур постепенно незначительно расширяется по направлению к ростковым зонам. Если в центре закладки ширина зоны гипертрофированных хондроцитов составляет 250–270 мкм, то на границе зоны созревающих хондроцитов может быть 600–700 мкм. В эпифизах хрящевых закладок по форме и концентрации хондроцитов на эквивалентной площади среза можно выделить поверхностную зону суставного хряща, где 2–3 ряда клеток приобретают удлинённую, овальную форму, промежуточную и центральную зоны. Две последние отличаются между собой в основном концентрацией клеток на эквивалентной площади гистологического среза.

Из представленных результатов, очевидно, что при развитии хрящевых скелетных закладок лягушки наблюдаются определенные структурные особенности при формировании эпифизов, которые как бы нанизаны на костный диафиз в виде спи-

T

чечной головки. Поэтому поперечный рост хрящевых закладок от зоны созревания хондроцитов до центра диафиза ограничивается периостальной костной манжеткой и самими же гипертрофированными хондроцитами, объём которых достигает максимальных величин по всей длине закладки и её расширение за счёт дальнейшего набухания этих клеток уже невозможно (рис 3). При развитии и росте скелетных закладок кур хрящевые эпифизы и зона метафизов постоянно увеличиваются в объёме в результате их внутреннего роста, в связи с чем шире становятся как ростковые хрящи, так и зоны метафизов, где начинает формироваться периостальная костная манжетка. При таких особенностях диаметр диафиза изменяется пропорционально увеличению эпифизов и ширины росткового хряща. Однако отношение длины диафиза к его поперечному сечению в центре закладки длительный период развития изменяется только лишь за счёт её продольного, а не поперечного роста и перед формированием костномозговой полости составляет у лягушек и курицы соответственно 12 : 1 и 16 : 1 (табл. 3, 4).

Различная ширина хряща в метафизарных зонах костей этих животных, равно как и продольно-поперечный индекс, может рассматриваться как функциональная адаптация, определяемая условиями их развития, способом локомоции и подвижностью суставов, пониженными гравитационными нагрузками на скелет в период ранних фаз личиночного и эмбрионального развития амфибий и птиц, особенностями становления внутрикостного гемопоэза. Достигаются такие соотношения при разной интенсивности и продолжительности роста скелета. Эксперименты с меткой <sup>3</sup>Н-тимидина подтверждают этот вывод (Житников, 2009). Меченые хондроциты появляются в зоне гипертрофированного хряща в зависимости от темпов перехода их в это состояние, отражая скорость роста скелетной закладки.

Обобщая эту часть исследований, следует указать, что хрящевые закладки личинок лягушки и эмбрионов кур растут в результате постоянного перехода в гипертрофированное состояние хондроцитов промежуточных зон, где они размножаются. Однако индекс меченых <sup>3</sup>Н-тимидином хондроцитов и их количество от резервной зоны до зоны созревания в гомологичных костях земноводных и птиц существенно отличается (Житников, 2009). Эти показатели отражают темпы роста скелетных закладок земноводных и птиц и влияют на интенсивность периостального остеогенеза (табл. 2).

Наружный контур диафиза скелетных закладок исследованных нами представителей класса амфибий и птиц представлен костной тканью различной структуры. К моменту начала резорбции хряща и формирования костномозговой полости диафиз хрящевых закладок длинных костей амфибий на 80 % состоит из гипертрофированных хондроцитов, а у эмбрионов кур эти клетки составляют 70 % его длины (рис. 1). У эмбрионов кур такого состояния бедренная кость достигает на 12-е сут эмбриогенеза при общей длине закладки 7–8 мм, а у земноводных — на 47–48-е сут личиночного развития при общей длине кости 3–3,5 мм. У личинок лягушки высота гипертрофированных хондроцитов в диафизе в 2 раза больше, чем у эмбрионов курицы и составляет соответственно 36,6 ± 1,42 и 21,1 ± 1,26 мкм. Таким образом, скелетные закладки в эмбриогенезе курицы растут в 10 раз интенсивнее, чем у лягушки (табл. 2). Эти процессы обеспечиваются различными темпами размножения и дифференцировки хондроцитов в ростковых хрящах и интенсивностью периостального остеогенеза на проксимальном и дистальном концах диафиза (Житников, 2009).

Такая специфика хондрогенеза предопределена особенностями эмбрионального развития животных и становлением в костномозговой полости скелета полноценного гемопоэза. Уже установлено, что первичная резорбция хряща в закладках скелета позвоночных — детерминированный во времени биологический процесс, следствием которого является использование полости кости как органа кроветворения. До этого периода такую функцию выполняют эмбриональные источники гемопоэтических клеток: желточный мешок, печень, селезенка, тимус, кишечник. Хрящевой скелет растет при функционировании эмбриональных очагов кроветворения (Грушко, 2011). Однако продолжающееся развитие эмбрионов и постоянно возрастающая потребность в питательных веществах и кислороде для обеспечения биосинтезов, энергетических потребностей и обмена веществ в формирующихся органнотканевых системах не может быть удовлетворена за счёт эмбриональных источников гемопоэза. В организме активируется новый очаг дифференцировки кроветворных клеток — внутрискелетный. Костный мозг как специализированный орган впервые появляется у амфибий. Его пусковым механизмом является предварительная терминальная дифференцировка хондроцитов в центре хрящевых закладок и последующая инвазия в эти зоны кровеносных сосудов с сопутствующими кроветворными и остеогенными клетками (Мажуга, Хрисанфова, 1980; Silvestrini et al., 1979). В полости кости возникают новые межклеточные взаимодействия, обеспечивающие дифференцировку остеогенных и гемопоэтических клеток, формирование эндохондральной кости и резорбцию хрящевого матрикса.

Всё изложенное позволяет заключить, что при формировании хрящевых закладок у представителей класса амфибий и птиц можно наблюдать специфические особенности морфогенеза этих структур, определяемые, по всей видимости, средой обитания и развития, а также локомоторной подвижностью личинок и эмбрионов:

— продолжительный рост диафизов в результате терминальной дифференцировки хондроцитов, но без формирования костномозговой полости;

— формирование компактной диафизарной кости у личинок лягушки и трабекулярной, сильно васкуляризированной кости у эмбрионов птиц;

— увеличение площади суставной поверхности эпифизов в закладках костей амфибий за счёт разрастания латеральных участков и проникновения проксимальных и дистальных концов костных диафизов внутрь эпифизов;

— увеличение в хрящевых закладках птиц площади эпифизов за счёт синтеза белково—углеводных компонентов матрикса с одновременным расширением росткового хряща, что влияет на поперечно-продольное моделирование диафиза;

— наличие щелочной фосфатазы в хондроцитах и матриксе хряща в зонах периостального остеогенеза;

— отсутствие минеральных субстратов в хондроцитах и матриксе хрящевых закладок личинок амфибий и эмбрионов кур.

#### 3.1.1. Размножение хондроцитов в зонах роста коротких и длинных костей конечностей

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 (Kember, 1983; Ianotti, 1990; Житников, Родионова, 2003). Количество ДНК-синтезирующих хондроцитов в этих структурных зонах эпифизарных хрящей является в определённой степени индикатором интенсивности роста скелетных закладок. Однако для установления продолжительности митотического цикла, соотношения делящихся и неделящихся хондроцитов в эпифизарных хрящах различных по интенсивности роста и в гомологичных костях животных с разным способом локомоции требуются дополнительные исследования (Kirkwood, Kember, 1993; Byers, Moore, 2000). В этой связи представляется перспективным исследование пролиферации хондроцитов ростковых хрящей в коротких и длинных костях свободных конечностей животных, отличающихся условиями развития и темпами соотносительного роста скелетных закладок. Исследования в этом направлении могут существенно дополнить фундаментальные данные по особенностям роста, моделирования, адаптивной перестройке скелета, коррекции его роста и восстановления.

Хрящевые закладки длинных и коротких костей 15-суточных эмбрионов крыс существенно отличаются линейными размерами (рис. 9, 10). Различными по высоте являются и зоны пролиферации, хондроциты которых имеют уплощённую форму. Индекс меченых клеток через 1 ч после введения <sup>3</sup>Н-тимидина составляет в фалангах и плечевой кости соответственно 15 ± 0,7 % и 20 ± 0,9 %. После 4 инъекций <sup>3</sup>Н-тимидина с интервалом 6 ч (18 ч «насыщения») процент меченых хондроцитов увеличивается соответственно до 50 ± 1,2 % и 70 ± 1,6 %.

У 19-суточных плодов крыс в длинных костях уже сформирована костномозговая полость и её последующее увеличение обеспечивается резорбцией костнохрящевых трабекул в зонах замещения одноядерными и многоядерными хондро- и остеокластическими клетками. Формирование же новых трабекул осуществляется на основе гиалинового хряща при постоянной дифференцировке хондроцитов вплоть до приобретения ими гипертрофированного состояния. Индекс меченых клеток в зонах пролиферации эпифизарных хрящей длинных костей составляет  $19 \pm 0.8$  %, а коротких —  $16 \pm 0.6$  %. В этот период эмбриогенеза закладки коротких костей ещё остаются хрящевыми и с 15-е по 19-е сут эмбриогенеза увеличиваются вдвое. Такая разная гистологическая конструкция закладок скелета длинных и коротких костей уже сама по себе свидетельствует о гетерохронности их развития, обусловленная последовательностью формирования в эмбриогенезе и клеточной массой хондробластем в почке конечности (Житников, 1976, 2007 а, б). Отличается при этом и индекс пролиферации хондроцитов в зонах роста скелетных элементов. При повторных инъекциях <sup>3</sup>Н-тимидина в течение 24 ч с интервалом 6 ч этот показатель в зонах пролиферации плечевой кости и фаланг достигает соответственно  $75 \pm 1,7$  % и  $65 \pm 1,7$  %. Основываясь на этих данных, можно считать, что именно такое количество и составляет пул размножающихся хондроцитов. Это подтверждается также данными экспериментов с однократным введением <sup>3</sup>Н-тимидином и анализом интенсивности метки над ядрами хондроцитов через 1-48 ч. Деление меченых <sup>3</sup>Н-тимидином хондроцитов предполагает снижение интенсивности метки над ядрами в 2 раза, если фазу митоза проходят все первоначально включившие радионуклид клетки (Епифанова и др., 1977). Действительно, через 12 ч средняя интенсивность метки над ядрами хондроцитов снижается вдвое. Через 24 ч средний показатель интенсивности метки по отношению к 12-часовой экспозиции не изменяется, так как популяция меченых клеток ещё пребывает в пресинтетической фазе митотического цикла и не достигла фазы очередного митоза. И только через 36 ч отмечено повторное уменьшение метки над ядрами хондроцитов (рис. 11). Но делятся повторно не все такие клетки. За это время некоторые из них приобрели свойства зрелых хондроцитов, формируя соответствующую зону эпифизарного хряща. Метка над их ядрами составляет половину 1-часовой. Такие же хондроциты встречаются и в зонах пролиферации, что видно при анализе гистограмм распределения ядер хондроцитов по интенсивности метки через 1-48 ч после введения <sup>3</sup>Н-тимидина (рис. 12). Полученные результаты дают основание утверждать, что часть меченых хондроцитов выходит из митотического цикла уже после первого деления. Большинство же хондроцитов этой зоны в течение 32-38 ч делятся ещё раз, в результате чего распределения ядер по интенсивности метки смещается на гистограмме влево (т. е. становится больше ядер хондроцитов с малым количеством зёрен восстановленного серебра), а средний показатель уменьшается до 12-14 зёрен (рис. 12).

Распределения клеток по интенсивности метки и расчеты параметров митотического цикла по формулам указывают на то, что в коротких и длинных костях белых крыс продолжительность митотического цикла хондроцитов в зонах роста существенно не отличается, составляя 20–24 ч. Продолжительность фазы синтеза ДНК, постсинтетического периода митотического цикла ( $G_2$ ) и митоза составляет соответственно 7–8; 4 и 1 ч.

Однако количество размножающихся клеток (пролиферативный пул) больше в зонах роста длинных костей. Из данных опытов с многократными введения <sup>3</sup>Н-тимидина также следует, что размножаются не все хондроциты ростковых зон. Пул пролиферирующих клеток в эпифизарных хрящах длинных и коротких костей составляет 50–70 % в зависимости от периода онтогенеза крыс. Так, после 4 инъекций радионуклида с интервалом 6 ч в зонах пролиферации фаланг и плечевой кости 2-недельных крысят метку содержат соответственно  $39 \pm 1,2$  % и  $47 \pm 1,6$  % клеток.

Структура эпифизарных хрящей костей летучих мышей и скорость их роста в преи постнатальном онтогенезе уже описаны нами ранее (Ковтун, Житников, 1995). Кинетику пролиферации хондроцитов, соотношение делящихся и неделящихся клеток, их топографию в эпифизарных хрящах костей конечностей летучих мышей мы оценивали по распределению зёрен восстановленного серебра над ядрами через 24, 48 и 96 ч после введения <sup>3</sup>Н-тимидина. У эмбрионов с длиной туловища 1,5 и 1,7 см в зонах пролиферации ростковых хрящей длинных и коротких костей индекс меченых хондроцитов через 1 ч после введения радионуклида составляет соответственно  $15 \pm 1,1 \%$ и  $10 \pm 1,1 \%$ . Средняя интенсивность метки над ядрами равна 32-38 зёрнам восстановленного серебра. Через 96 ч некоторые меченые хондроциты эпифизарных хрящей плечевой, лучевой и пястных костей уже имеют признаки созревающих и находятся в этой зоне. Интенсивность метки над их ядрами снизилась до 18-20 зёрен, что предполагает однократное деление таких клеток после введения <sup>3</sup>Н-тимидина. Для расчётов примерной продолжительности митотического цикла хондроцитов сопоставляли интенсивность метки над ядрами в зонах пролиферации через 1, 24, 48 и 96 ч (рис. 13).

Так через 24 ч средняя интенсивность метки уменьшилась до 18–20. Через 48 ч после введения <sup>3</sup>Н-тимидина встречались меченые хондроциты в фазе митоза, что предполагает завершение ими уже второго митотического цикла. Спустя 96 ч большинство хондроцитов зоны пролиферации (до 70 %) имели среднюю интенсивность метки 6–8 зерён, т. е. разделились за это время несколько раз (рис. 14). Основываясь на этих данных, установлено, что средняя продолжительность митотического цикла таких хондроцитов может быть 22–24 ч. Вместе с тем через 96 ч в зоне пролиферации сохраняется некоторое количество хондроцитов с интенсивной меткой над их ядрами (от 17 до 30 зёрен), т. е. они разделились лишь один раз после введения <sup>3</sup>Н-тимидина. Причём в зонах пролиферации фаланг таких хондроцитов больше, чем в длинных костях. Сопоставляя гистограммы распределения метки <sup>3</sup>Н-тимидина над ядрами хондроцитов в период от 1 до 96 ч после введения <sup>3</sup>Н-тимидина, можно предположить, что в интенсивно растущих костях (плечевая, лучевая, пястные) после очередного деления в цикле репродукции эпифизарных хрящей остаётся больше хондроцитов, чем в фалангах.

Последовательность формирования в эмбриогенезе летучих мышей хрящевых закладок передних конечностей такая же, как и у других млекопитающих и имеет проксимально-дистальный градиент распространения: вначале формируются закладки плечевого пояса, затем предплечья и, в последнюю очередь, фаланги (Ковтун, Житников, 1995). На хрящевой стадии развития закладок (длина тела эмбрионов 1,5 см) соотношение длин плечевой, лучевой, пястных костей и фаланг может быть выражено как 1:0,75:0,5:0,25. Однако адаптация летучих мышей к полёту и развитие летательной перепонки обеспечило им в эволюции иной принцип роста и соотносительных размеров костей передних конечностей (Ковтун, 1984; Adams, 2008). После

рождения животных указанное выше соотношение изменяется таким образом, что длина лучевой и пястных костей становится равной плечевой. У 12-дневных летучих мышей длина костей передних конечностей уже имеет соотношение 1 : 1,4 : 1,25 : 0,5, а у взрослых особей 1 : 1,7 : 1,7 : 0,6 (рис. 15).

Таким образом, скелетные закладки передних конечностей растут с разной скоростью, хотя индекс пролиферации (процент меченых <sup>3</sup>Н-тимидином хондроцитов в эпифизарных хрящах) существенно не отличается. В таком случае, за счёт каких процессов обеспечивается гетерохронность роста костей? Прежде всего, такой эффект достигается за счёт постепенного увеличения концентрации хондроцитов в зонах размножения. Это возможно при условии, что в таких структурах, при сходных индексах мечения <sup>3</sup>Н-тимидином, хондроцитов образуется больше, чем дифференцируется и в последующем гипертрофируется. Действительно, уже после рождения животных структура зон пролиферации и эпифизарных хрящей в целом разных скелетных закладок передних конечностей существенно отличается размерами и концентрацией хондроцитов (табл. 1). Основываясь на данных экспериментов с импульсным введением <sup>3</sup>Н-тимидина и полученными гистограммами по распределению метки над ядрами хондроцитов через 1-96 ч, можно утверждать, что в интенсивно растущих костях летучих мышей (лучевой и пястных) увеличение количества хондроцитов в зонах пролиферации преобладает над темпами их терминальной дифференцировки. В этих зонах прогрессивно нарастает концентрация клеток, и у новорожденных летучих мышей сохраняются массивные зоны пролиферации с большим количеством клеток. Исключение составляют лишь проксимальные эпифизарные хрящи плюсневых костей и фаланг, где эти зоны, как и интенсивность роста кости с их участием, слабо выражены. Есть основания полагать, что основной причиной формирования структурного различия эпифизарных хрящей растущих костей передних конечностей летучих мышей являются специфические особенности пролиферации хондроцитов, выражающиеся в неодинаковом количестве их повторных делений до приобретения гипертрофированного состояния. Установлено также, что некоторые из пролиферирующих клеток этих структур могут выходить из цикла репродукции после одного деления. Большинство же хондроцитов, первоначально расположенных ближе к эпифизам, могут делиться несколько раз до того как приобретают морфологические и метаболические признаки созревающих и гипертрофированных клеток. Причем такое деление происходит по принципу дифференцирующегося митоза, когда одна из двух дочерних клеток снова проходит все метаболические фазы митотического цикла, удваивает количество ДНК и делится. Другой же хондроцит этой пары переходит в гетеросинтетическую интерфазу, обеспечивая лишь биосинтез белковоуглеводных макромолекул матрикса (рис. 16).

Такой механизм взаимодействий репродукции и дифференцировки хондроцитов в эпифизарных хрящах длинных и коротких костей приводит к тому, что в «изогенных» группах накапливается разное их количество (Житников, 2001). Поэтому даже при одинаковых показателях индекса репродукции хондроцитов их концентрация в этих зонах постепенно будет отличаться. Если же в эпифизарных хрящах и разная скорость терминальной дифференцировки хондроцитов, то комплекс этих процессов существенно изменяет соотношение клеток и гиалинового матрикса, влияет на структуру и количество костно-хрящевых трабекул в зонах замещения и интенсивность роста костей (Житников, 2006). Однако темпы роста костного диафиза закладок отличаются из-за разной скорости созревания и гипертрофии хондроцитов, а в зонах пролиферации эпифизарных хрящей лишь восстанавливается или увеличивается клеточная популяция. При оценке продольного роста костей животных с разным количеством хондроцитов в колонках зоны пролиферации эпифизарных хрящей обязательно необходимо учитывать их распределение в «изогенные» группах. После ряда делений хондроциты могут формировать «изогенные» группы в виде монетных столбиков, располагаясь в них по одной в направлении продольного роста кости, или же в дополнение образовывать группы клеток ещё и по ширине закладки. В последнем случае более эффективно обеспечивается продольно-поперечный рост кости в зоне метафиза. Такая особенность структуры эпифизарных хрящей важна для достижения определённого соотношения ширины и длины костного органа (Житников, 2006). В наших исследованиях состояние «изогенных» групп хондроцитов эпифизарных хрящей определяли на поперечных срезах этих структур в экспериментах с импульсным введением <sup>3</sup>Н-тимидина. Установлено, что количество хондроцитов на поперечных срезах «изогенных» групп непосредственно в зоне созревания разных эпифизарных хрящей может варьировать от двух до семи клеток.

Полученные данные позволяют утверждать, что формирование в длинных и коротких костях эпифизарных хрящей с разным количеством хондроцитов в зонах пролиферации происходит на протяжении каждого митотического цикла в результате изменения соотношения клеток, вступающих в очередной цикл репродукции. Скорость же роста костей зависит от продолжительности функционирования хондроцитов в зонах созревания эпифизарных хрящей и их размера при последующей гипертрофии и замещении хрящевой ткани костной. Размножение хондроцитов обеспечивает лишь восстановление их численности в соответствующих структурных зонах эпифизарных хрящей. Время, в течение которого замещается клеточной популяции, пропорционально продолжительности митотического цикла и обратнопропорционально пулу размножающихся хондроцитов независимо от того, какой из этих механизмов регулирования изменяется в каждом скелетном органе. Полученные в различных экспериментах с <sup>3</sup>Н-тимидином данные убеждают в том, что в разные периоды пре- и постнатального онтогенеза в зонах пролиферации эпифизарных хрящей длинных и коротких костей индекс меченых <sup>3</sup>Н-тимидином хондроцитов существенно не изменяется.

В эпифизах длинных костей эмбрионов и плодов птиц значительное количество хондроцитов постепенно выходит из митотического цикла и к моменту их выклева в фазе синтеза ДНК находится менее 1 % клеток. В эпифизах коротких костей темпы репродукции хондроцитов сохраняются 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 неделящихся хондроцитов (пролиферативный пул). Эти показатели определяли при многократных введениях в инкубируемые яйца и 2-дневным цыплятам <sup>3</sup>Н-тимидина, а также графическим методом, когда радионуклид вводили импульсно на разное время (от 1 ч до 9 сут). Расчётные данные 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 зона при их терминальной дифференцировке и при разных темпах роста скелетных закладок? Прежде всего, в длинных и коротких костях отличается общее количество размножающихся хондроцитов. Если в зонах пролиферации длинных костей в направлении от эпифизов к зоне созревания насчитывается до 120 клеток, то в коротких костях всего лишь 15-20 (табл. 2). Поэтому большая популяция размножающихся хондроцитов обеспечивает и большее их количество при прохождении митотического цикла и, следовательно, компенсацию тех, которые гипертрофируются при продольном росте кости. Однако для оценки ростовых возможностей хондроцитов эпифизарных хрящей наиболее объективным является показатель удвоение исходной клеточной популяции (Т<sub>2</sub>). Он прямо зависит от

продолжительности митотического цикла хондроцитов (Tc) и находится в обратной связи с пролиферативным пулом (Np):  $T_2 = Tc/Np$ . Если удвоение клеточной популяции в зонах роста преобладает над количеством хондроцитов, перешедших в гипертрофированное состояния, то в этих участках повышается их концетрация. Хондроциты сильно уплощаются, располагаются в виде монетных столбиков вдоль длинной оси закладки. Наблюдаемое до и после выклева 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 объёме внеклеточного гиалинового матрикса. Между терминальной дифференцировки хондроцитов при утанавливаются такие взаимоотношения по темпам проявления, когда увеличение количества клеток в зоне пролиферации происходит быстрее, чем подвергается гипертрофии.

Особенность роста костных закладок скелета конечностей у земноводных такова, что хондроциты в эпифизарных хрящах делятся всего лишь 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. Расчёты показывают, что пролиферативная активность хондроцитов в зонах роста длинных и коротких костей в разные периоды развития земноводных изменяется за счёт продолжительности митотического цикла (Tc) и соотношения в популяции делящихся и неделящихся клеток (Np). Продолжительность цикла постепенно увеличивается до 40 ч, а пролиферативный пул снижается до 40–50 % (рис. 17).

Таким образом, относительно медленному росту костей у земноводных (отличается в 10 раз от птиц) соответствует структура формирующихся эпифизарных хрящей и темпы размножения хондроцитов (табл. 2). 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.

Формирование в костях скелета свободных конечностей эпифизарных хрящей с высокой концентрацией хондроцитов происходит за счёт 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 отстаёт, то количество клеток здесь постепенно уменьшается, а эпифизарные хрящи прекращают функционировать как структуры, обеспечивающие рост скелетных закладок. Переход клеток в гетеросинтетическую интерфазу (выход из митотического цикла) подразумевает последующее выполнение ими определённых функций, обеспечивающих лишь синтез специфических макромолекул (Садофьев, Подгорная, 1999). Изменение же параметров митотического цикла отражает, изменение уровня дифференцировки всей пролиферирующей популяции хондроцитов в разные периоды развитии скелета (Byers, Moore, 2000). Популяция хондроцитов, которая размножается, обеспечивает в течение всего периода продольного роста костей их обновление в процессе терминальной дифференцировки и внутренний рост эпифизарных хрящей. Изменение численности пролиферирующих хондроцитов в эпифизарных хрящах длинных и коротких костей происходит в результате перехода в гетеросинтетическую интерфазу (неделящаяся фракция клеток) их разного количества. Формируются эпифизарные хрящи с разной концентрацией хондроцитов в зонах размножения. Корреляция между скоростью терминальной дифференцировки хондроцитов и темпами их размножения позволяет функционировать и сохраняться эпифизарным хрящам в коротких и длинных костях на протяжении всего периода продольного роста скелета. Если один из этих процессов начинает преобладать, происходит либо увеличение размеров зоны пролиферации и концентрации в ней хондроцитов, либо постепенное уменьшение структурных зон эпифизарного хряща и прекращение его функционирования как зоны роста кости.

#### 3.1.2. Метаболизм хондроцитов при терминальной дифференцировке по показателям белкового и полисахаридного биосинтезов

Проведённые нами эксперименты с радиоактивными индикаторами полисахаридного и белкового биосинтезов не могут быть использованы при сопоставлении биосинтетической активности однотипных хондроцитов в эпифизарных хрящах скелетных закладок различных биологических объектов. Даже при соблюдении методической идентичности применения радиоактивных индикаторов (доза и способ введения, концентрация, время экспонирования и др.), индивидуальные физиологические особенности общего метаболизма у животных делают такие сопоставления некорректными. Поэтому биосинтетическую активность созревающих хондроцитов сопоставляли в однотипных клетках скелетных закладок одного вида животных, которые отличались темпами роста.

После введения животным радиоактивных предшественников полисахаридного или белкового биосинтезов наиболее интенсивно их включают хондроциты зоны созревания эпифизарных и суставных хрящей скелетных элементов (рис. 18). Однако хондроциты зоны созревания в пределах одной или разных скелетных закладок одного животного отличаются интенсивностью биосинтеза гликозаминокликанов и коллагена. Если включение радиоактивных индикаторов этих биосинтезов созревающими хондроцитами, например, плечевой кости одного из двух эпифизарных хрящей длинных костей белых крыс принять за 100 %, то в противоположном эпифизарном хряще оно будет составлять лишь 60 %, в суставном хряще — 10 %, а в идентичных клетках эпифизарных хрящей коротких костей — не более 50 %. Таким образом, хондроциты зоны созревания разных эпифизарных хрящей существенно отличаются интенсивностью биосинтеза сульфатированных гликозаминогликанов и коллагена.

По нашим данным, между уровнем биосинтетической активности хондроцитов и скоростью их терминальной дифференцировки существует взаимосвязь: чем активнее синтез, тем быстрее клетки приобретают гипертрофированное состояние (Zhitnikov, 1978). Отличается ли в этих зонах хряща концентрация в матриксе гликопротеинов и гликозаминогликанов? При проведении гистохимической реакции с альциановым синим (рН 1,5) сульфатированные протеогликаны регистрируются во всех структурных зонах суставного и эпифизарного хрящей. В зонах созревания эпифизарных хрящей разных скелетных закладок исследованных животных их концентрация существенно не отличается, независимо от уровня биосинтетической активности хондроцитов. Этот феномен может быть следствием нескольких причин. Прежде всего, варьирует продолжительность активного биосинтеза клетками каждой из структурных зон эпифизарных хрящей белково-углеводных макромолекул, из которых формируется внеклеточный матрикс. Особенно это касается хондроцитов зон созревания. При быстром росте скелетного элемента они меньший период времени обеспечивают активный биосинтез. Таким образом, чем быстрее растёт скелетная закладка, тем меньший период времени эти хондроциты интенсивно синтезируют белково-углеводные макромолекулы, формирующие хрящевой матрикс. В течение этой наиболее активной метаболической фазы жизненного цикла хондроциты должны синтезировать и выделить в

межклеточное пространство такое количество белковых и углеводных макромолекул, которое обеспечило бы структурную прочность и преемственность между хрящом и костью в зонах замещения. Если же период созревания и последующей гипертрофии хондроцитов растягивается во времени, то такой же объём белково-углеводных компонентов гиалинового матрикса может быть достигнут при менее выраженной биосинтетической активности клеток. Варьирование же в закладках скелета конечностей позвоночных структуры эпифизарных хрящей по ширине зон и концентрации хондроцитов предполагает синтез и накопление разного объёма гиалинового матрикса к моменту замещения этой хрящевой ткани костной. Иными словами, структура каждого эпифизарного хряща является отражением взаимодействия метаболизма и репродукции хондроцитов в процессе формирования скелетных закладок. Поэтому в различных закладках скелета костная ткань (зона метафиза), формирующаяся на основе хряща, обеспечивает такую прочность растущего скелетного элемента, которая соответствует опорно-силовым и локомоторным нагрузкам.

После введения животным <sup>3</sup>Н-глюкозы интенсивная метка над хондроцитами зоны созревания отражает включение радионуклида в гликоген, так как предварительная (до нанесения фотоэмульсии) обработка препаратов амилазой приводит к ферментативному расщеплению гликогена и исчезновению метки над клетками. Сохранившаяся в матриксе хряща радиоактивность отражает включение глюкозы в гликопротеины. Наибольшая концентрация <sup>3</sup>Н-глюкозы отмечена в хондроцитах зоны созревания эпифизарных хрящей (рис. 19, А). При выявлении гликогена гистохимическим способом (ШИК-реакция) установлено, что в хондроцитах зоны созревания его содержится больше всего (рис. 19, Б), а в матриксе хряща этой зоны обнаружена высокая концентрация гликопротеинов. Сопоставление включения радиоактивного сульфата и глюкозы в сульфатированные гликозаминогликаны хряща позволило предположить, что эти углеводосодержащие макромолекулы могут отличаться не только количественным соотношением и длиной хондроитинсульфатных цепей, но и степенью их сульфатации. Именно последнее обстоятельство может быть тем ключевым фактором, который вызывает со временем гидратацию и гипертрофию хондроцитов. При гипертрофии хондроцитов, скорее всего, 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.

Установлено, что пребывание хондроцита в активной биосинтетической фазе, т. е. время функционирования его как созревающего, может отличаться и это определяется метаболическими процессами, которые способствуют переходу хондроцита к терминальной дифференцировке. В зависимости от скорости гипертрофии инициируется и реализуется периостальный остеогенез и, следовательно, рост в зонах метафизов диафизарного костного стержня закладки.

Окончательный размер хондроцитов у зоны замещения хряща костью регулируется системными и локальными факторами, определяющими направленность внутриклеточного метаболизма, физико-химические и структурные свойства внеклеточного матрикса (Kember, 1993; Engsig et al., 2000; D'Angelo et al., 2001 a, b; Matsuo et al., 2001; Никитюк и др., 2007). Объём клеток может изменяться в различных скелетных закладках одновременно с метаболической активностью созревающих хондроцитов. Установлено, что на фоне снижения биосинтеза сульфатсодержащих протеогликанов, гипертрофирующиеся хондроциты продолжают интенсивно включать <sup>3</sup>Н-глюкозу в гликопротеины.

Максимального объёма хондроциты достигают уже после периода интенсивной метаболической активности в зонах созревания. Постепенно их метабозизм снижается в результате структурной разобщенности взаимодействия в цитоплазме субстратов и ферментных комплексов, обеспечивающих биосинтезы. Уменьшение ко-

личества внутриклеточных вакуолей с гидрофильными субстратами не способствует дальнейшему накоплению воды и увеличению объёма хондроцитов. В то же время интенсивный биосинтез протеин-хондроитинсульфатов не может быть тем единственным процессом в цикле внутриклеточных метаболизмов созревающих хондроцитов, который бы определял продолжительность их активного функционирования с последующей гидратацией и гипертрофией. Возможно, что этот процесс инициируется также повышающейся внутриклеточной активностью лизосом с гидролитическими ферментами (Farnum, Wilsman, 1987).

# 3.1.3. Структурные изменения созревающих и гипертрофированных хондроцитов

В эпифизарных хрящах коротких и длинных костей размножение хондроцитов обеспечивает внутренний рост хряща и компенсацию клеток, которые подвергаются терминальной дифференцировке (Житников, 2008, 2009). Эти процессы разобщены в пространстве и во времени и следуют один за другим. Так, продольный рост диафиза скелетной закладки сопровождается постепенным угасанием пролиферативной активности хондроцитов эпифизарных хрящей с одновременной интенсификацией биосинтеза белково-углеводных макромолекул, формирующих гиалиновый матрикс (Byers, Moore, 2000). В последующем в цитоплазме хондроцитов накапливается вода, они за счёт этого существенно увеличиваются в объёме, и вместе с матриксом создают благоприятные условия для периостального и энхондрального остеогенеза. Считается (Kember, Sisson, 1976; Kuch et al., 1996), что в каждом эпифизарном хряще, диаметр которого достигает гипертрофированный хондроцит в зонах замещения хрящевой ткани костной, косвенно отражает интенсивность роста скелетной закладки. Однако сравнительное исследование этих процессов у животных разных классов, отличающихся особенностями роста костей в онтогенезе, такой вывод не подтверждает (Житников, 1980; Kirkwood et al., 1989).

Рост скелетных закладок с участием эпифизарных хрящей предполагает обязательную терминальную дифференцировку хондроцитов и формирование по периметру хряща с такими клетками периостальной кости. Исследования с использованием радионуклидов показали, что повышение биосинтетической активности уплощённых хондроцитов зоны пролиферации сопровождается и значительным увеличением объёма клеток, которые в структуре эпифизарных хрящей выделяются как созревающие. Компетентность к усилению биосинтезов хондроциты приобретают после того как совершают одно или несколько митотических делений, находясь в зоне пролиферации. Интенсивный метаболизм регистрируется по аккумуляции радиоактивных индикаторов синтеза гликогена, сульфатированных гликозаминогликанов и коллагена (рис. 18, 19). На ультраструктурном уровне это заметно по появлению в цитоплазме расширенных цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, уменьшению количества свободные рибосом и появлению большого количества и различного диаметра вакуолей комплекса Гольджи (рис. 20). Установлено, что через 1 ч после введения животным <sup>35</sup>S-сульфата натрия такие хондроциты содержат интенсивную метку, в то время как гипертрофированные 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 <sup>35</sup>S 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.

Существенно возрастает объём клеток за счёт цитоплазматических органоидов и накопления жидкости. В возрастающем объёме 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 (Lash, Vasan, 1983). Формируясь в зоне комплекса Гольджи, вакуоли перемещаются к плазматической мембране, обеспечивая элиминацию содержимого за пределы хондроцита путём экзоцитоза (рис. 20, Б). Постепенно, по мере гидратации цитоплазмы, увеличивается расстояние между отдельными цистернами эндоплазматического ретикулума и везикулами комплекса Гольджи. Изменяется структура ядра. Оно увеличивается в объёме и становится оптически неплотным. У ядерной мембраны хроматин не конденсируется, а равномерно распределён в объёме ядра. Нарастающая гидратация гиалоплазмы приводит к ещё более выраженной дезорганизации цитоплазматических органоидов и ядерного хроматина, а электронная плотность содержимого эндоплазматического ретикулума и вакуолей Гольджи снижается за счёт накопления воды (рис. 21). Метаболическая активность хондроцитов постепенно угасает, что и регистрируется по незначительному включению радиоактивных маркеров белковых и полисахаридных биосинтезов. Хондроциты приобретают морфологические и, что важно, функциональные признаки гипертрофированных. В гомологичных скелетных закладках животных разных классов они отличаются размерами и формируют неодинаковые по ширине зоны. Не установлена зависимость интенсивности роста хрящевых закладок от этих показателей. Так, в зонах роста длинных костей Gallus domesticus диаметр таких клеток в 2 раза меньше, чем у Rana temporaria, однако у птиц кости растут значительно интенсивнее.

Гидратация и набухание хондроцитов с одновременной потерей функциональных свойств может быть обусловлена, по нашему мнению, перераспределением воды между клетками и матриксом, в результате чего матрикс 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 объём клетки ( $V = 4/3\pi R^3$ ) в этих случаях составит 523, 4180 и 14 130 мкм<sup>3</sup> соответственно, т. е. отличается от первоначального в 8 и 27 раз. В связи с увеличением объёма многократно возрастает и поверхность плазматической мембраны, что, безусловно, сказывается на транспорте воды и метаболитов. Есть основания полагать, что объём гипертрофированных хондроцитов является лабильным морфологическим признаком при терминальной дифференцировке. В каждом эпифизарном хряще скелетных закладок объём клеток может варьировать и изменяться в зависимости от содержания и структурированности воды в межклеточном матриксе, гидрофильные свойства которого определяются концентрацией хондроитинсульфатов и гликопротеинов различной молекулярной массы. Их окончательный размер у зоны замещения хряща костью регулируется системными и локальными факторами, определяющими направленность внутриклеточного метаболизма, физико-химические и структурные свойства внеклеточного матрикса: интенсивность и продолжительность биосинтеза хондроитинсульфатов и гликопротеинов, соотношение клеток и гиалинового матрикса, его минерализацию. Объём клеток может изменяться в различных скелетных закладках и в онтогенезе животных одновременно с метаболической активностью созревающих хондроцитов. Установлено, что на фоне снижения биосинтеза сульфатсодержащих протеогликанов, гипертрофирующиеся хондроциты продолжают интенсивно включать <sup>3</sup>Н-глюкозу в гликопротеины. Таким образом, увеличение объёма 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 объём клеток возрастает. При этом общая площадь зоны хряща, включающая гипертрофированные хондроциты и матрикс, не изменяется по ширине диафиза кости. На окончательный объём 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 невелика, как в суставном хряще большинства длинных костей или в зонах роста скелетных закладок земноводных, то объём гипертрофированных хондроцитов может быть значительным. В растущих костях конечностей птиц и амфибий сохраняются обширные зоны, где по длине диафиза насчитывается 200–250 гипертрофированных хондроцитов. Максимального объёма клетки достигают уже после периода интенсивной метаболической активности. Постепенно метаболизм снижается и последующее уменьшение количества внутриклеточных вакуолей с гидрофильными субстратами не способствует дальнейшему накоплению воды и увеличению объёма. Возможно, что этот процесс инициируется также повышающейся внутриклеточной концентрацией лизосом с гидролитическими ферментами (Farnum, Wilsman, 1987). Продукты их каталитической активности в виде гиалуронатов, галактозаминов и др. обладают ещё 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 (Мапsfild et al., 1999; Mikic et al., 2008), а также активация рецессивного гена achondroplasia (Thurston et al., 1985). Изменение функциональных свойств, размеров хондроцитов и интенсивности роста закладок скелета происходит при избытке в организме животных гидрокортизона и дефиците витамина D (Ali, 1983; Житников, 1998; Frost, 1998; Гайко и др., 2007).

Таким образом, гипертрофия хондроцитов в эпифизарных хрящах скелетных закладок представляет собой процесс увеличения объёма клеток с изменяющейся относительной скоростью, что сопровождается дезорганизаций 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, что подтверждается недавними молекулярно-генетическими исследованиями (Mikic et al., 2008). 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 периостального и эндостального остеогенеза.

### 3.2. Роль эпифизарных хрящей в морфогенезе длинных костей амфибий и птиц в условиях становления опорно-двигательной активности

Формирование костномозговой полости в скелетных закладок амфибий и последующее её продольное увеличение в результате резорбция гипертрофированного хряща 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 (Dickson, 1982). Хрящ в этих участках не минерализован и кровеносные сосуды со стороны полости диафиза не проникают в него. Обширные зоны гипертрофированных хондроцитов, достигающие в закладке бедренной кости с каждой стороны диафиза 1600 мкм, контактируют непосредственно с костью диафиза, что ограничивает возможность её субэндостального моделирования. На поверхности кости диафиза со стороны костномозговой полости очень редко встречаются многоядерные остеокласты. Поэтому в течение длительного периода роста скелетных закладок земноводных поперечный диаметр полости кости не изменяется, а соотношение длины диафиза к поперечному сечению возрастает у сеголеток до 21 : 1 в основном за счёт продольного роста (табл. 3).

Кроме того, у пойкилотермных животных изменяющаяся температура окружающей среды может оказывать влияние на интенсивность метаболизма, в результате чего формируются другие структурные взаимодействия между провизорным хрящом и костью диафиза. Так, например, в зону гипертрофированного хряща никогда не врастают из полости диафиза кровеносные сосуды. При проведении реакции Косса и Гомори на недекальцинированных срезах костей лягушек сеголеток мы не обнаружили минеральных компонентов в ростковом хряще и в эпифизах. В зонах замещения скелетных элементов конечностей земноводных не формируется эндохондральная кость (рис. 3, 8). Однако при её отсутствии дополнительную прочность им создают структурные взаимоотношения росткового хряща с костным диафизом. Несмотря на постоянную резорбцию хряща, что обеспечивает с каждой стороны диафиза увеличение костномозговой полости, длина зоны хряща с гипертрофированными хондроцитами может составлять на каждом конце диафиза 1500 мкм. Это указывает на то, что темпы терминальной дифференцировки хондроцитов ростковых хрящей и скорость резорбции хряща в зонах замещения какой-то период времени уравновешены. По наружному контуру матрикса хряща с гипертрофированными хондроцитами, начиная от зоны пролиферации, формируется периостальная кость за счёт дифференцировки в остеобласты клеток внутреннего слоя периоста. Скорость её аппозиционного прироста составляет 1-1,2 мкм / сут. Эту величину мы

Период развития (сут)	L	D	D <sub>2</sub>	L:D <sub>1</sub>	L:D <sub>2</sub>	s
40	1300	225	250	6:1	5:1	12
49	2900	225	260	12:1	11:1	18
54	4100	260	300	15:1	13:1	22
70	5500	260	350	21:1	15:1	45
360	8700	425	640	20:1	16:1	110

Т а б л и ц а 3. Некоторые морфометрические параметры бедренной кости в онтогенезе Rana temporaria

Table 2	Sama marnhamatr	a narromators of the far	nur in antogonosis of Dawa	tombouguia
I abre 5.	some morphometi	c parameters of the fen	iur in ontogenesis of Kana	iemporaria

Условные обозначения. L — длина диафиза (мкм); D<sub>1</sub> — диаметр костно-мозговой полости (мкм); D<sub>2</sub> — диаметр кости в центре диафиза (мкм); S — толщина костной ткани в центре диафиза (мкм).

установили по перемещению метки <sup>3</sup>Н-пролина через 1-72 ч после введения радионуклида. За это время (72 ч) меченый матрикс кости сместился в глубь на 3-4 мкм. Используя эти данные, мы смогли дополнительно определить и скорость роста длинных костей амфибий. Например, на границе гипертрофированного хряща и костномозговой полости толщина кости может характеризовать скорость роста кости. Определяем вдоль диафиза кости у лягушат сеголеток расстояние от созревающих до терминально дифференцированных хондроцитов у зоны замешения (примерно, 1600 мкм). Измеряем толщину кости диафиза у зоны замещения (24 мкм) и, зная, что аппозиционный прирост кости в сутки составляет 1 мкм, рассчитываем скорость роста: V = 1600 мкм/24 мкм/1мкм. Она равна примерно 65-70 мкм/сут с каждой стороны диафиза. Однако у пойкилотермных животных этот показатель роста скелетных закладок может постоянно изменяться в зависимости от температуры внешней среды. Например, мы содержали лягушат после метаморфоза в течение 2 сут при температуре 4 °С и затем, исследуя пролиферацию хондроцитов в ростковых хрящах по показателю включения <sup>3</sup>Н-тимидина, обнаружили, что ядра хондроцитов зоны пролиферации не включали радиоактивный индикатор синтеза ДНК. В то же время среди клеток костного мозга было достаточно много меченых. В этих условиях либо блокируется размножение хондроцитов в ростковых хрящах, либо растягивается во времени продолжительность митотического цикла. Однако определённый уровень обмена веществ и дифференцировка гемопоэтических клеток в костном мозге поддерживается, что видно по наличию здесь большого количества ДНК-синтезирующих клеток (метка <sup>3</sup>Н-тимидина).

У 1–2-летних лягушек рост костей продолжается. К этому времени значительно большей становится площадь эпифизов и суставная поверхность костей, что заметно по увеличению межклеточного матрикса в эпифизах и снижению количества хондроцитов на эквивалентной площади среза (рис. 8, 22). В эпифизах 2-летних лягушек чётко выделяются две зоны: суставной хрящ и боковой суставной хрящ, внутренняя поверхность которого связана с внешней поверхностью периостальной кости. В зоне контакта хряща и наружного слоя периоста много кровеносных сосудов. На поверхности формирующейся кости диафиза присутствует большое количество остеогенных клеток, дифференцирующиеся здесь в остеобласты (рис. 22). В этих зонах обнаружена высокая активность щелочной фосфатазы. В боковом суставном хряще по всему периметру параллельно суставной поверхности также отмечена высокая активность щелочной фосфатазы. При проведении реакции Косса отложения фосфата кальция имеются в матриксе бокового суставного хряща, формируя минерализованную сферу между суставным хрящом, врастающей в глубь эпифиза периостальной костью и ростковым хрящом (рис. 23).

Таким способом за счёт минерализации у 2-летних лягушек существенно укрепляется внутренняя зона эпифиза. В ростковом хряще, который находится внутри костного диафизарного стержня, структурно выделяются зоны: резервная, пролиферации, созревания и гипертрофии (рис. 23). Резервная зона граничит с минерализованным хрящом эпифиза. В пролиферативной зоне хондроциты удлинённые поперёк продольной оси закладки и не формируют «изогенные группы» и структуры в виде колонок. Однако по сравнению с однолетними лягушками эта зона становится шире, а количество хондроцитов в ней относительно длины закладки остаётся почти таким же, как и у сеголеток. Эти особенности росткового хряща определяют внутренний диаметр диафиза кости, который достигает 600–700 мкм и в сравнении с сеголетками увеличивается вдвое. В зоне созревания хондроциты приобретают более округлую форму, несколько увеличиваясь в объёме. Наиболее длинной (до 900 мкм) по-прежнему является зона гипертрофированных хондроцитов, где клетки набухают и увеличиваются. Продольный диаметр их достигает 40–50 мкм. Реакция Гомори и Косса не позволяет определить в клетках и матриксе этой зоны щелочную фос-
фомоноэстеразу и отложения в матриксе минеральных субстратов. Этот фермент и кальций-фосфатные соединения регистрировали лишь в остеобластах и матриксе кости диафиза. Толщина компактной кости постепенно увеличивалась от границы зоны метафиза с пролиферирующими хондроцитами до середины диафиза. Таким образом, в длинных костях 2-летних лягушек ещё сохраняется потенциал в виде эпифизарных хрящей для дальнейшего роста.

Результаты исследования позволяют выделить при развитии скелета конечностей амфибий от периода формирования костномозговой полости до двух лет следующие характерные особенности:

— матрикс хряща с гипертрофированными хондроцитами длительный период остаётся не минерализованным и его резорбция при формировании костномозговой полости осуществляется мононуклеарными клетками с кластическими свойствами;

 сохранение в зонах замещения обширных участков хряща, содержащих гипертрофированные хондроциты и тесный контакт такого хряща с периостальной костью;

— на всех этапах развития скелета конечностей бесхвостых амфибий ростковые хрящи не кальцинированы и на их основе не формируется эндохондральная кость;

— в зонах замещения происходит только резорбция хряща, содержащего гипертрофированные хондроциты, и продольное увеличение костномозговой полости;

— постепенно в длинных костях конечностей минерализуется обширная поверхность глубокой зоны суставного хряща.

Эти особенности можно рассматривать как механизм адаптации скелета к локомоторным нагрузкам с большой амплитудой движений от состояния покоя, при котором колени сильно согнуты, до плавания и прыжков.

Формирование первичных центров окостенения в хрящевых закладках птиц сопровождается появлением в костномозговой полости клеточных элементов кроветворения и остеогенеза. Суть этого процесса состоит в том, что в центр диафиза хрящевой закладки с гипертрофированными хондроцитами врастают кровеносные сосуды (капиллярные почки), в терминальных участках которых локализованы переваскулярные клетки (Мажуга, Хрисанфова, 1980; Родионова, 1989). По данным Силвестрини (Silvestrini et al., 1979), полученным методом электронной микроскопии, на начальном этапе резорбции хрящевого матрикса в закладках птиц среди этих клеток можно выделить две субпопуляции. Одни из них, выделяя гидролитические ферменты, разрушают хрящевой матрикс. Другие, содержащие большое количество гетеролизосом, поглощают и расщепляют фрагменты матрикса. Оба типа клеток авторы относят к макрофагальной системе, выполняющей функцию одноядерных хондрокластов.

Постоянная резорбция хряща приводит к расширению полости диафиза, где накапливаются коммитированные и стволовые клетки остеогенеза и гемопоэза, и это способствует началу моделирования кости со стороны эндостальной поверхности диафиза. Очевидно, что ширина полости кости при её формировании у плодов и ширина у взрослых животных с дефинитивным скелетом существенно отличаются (табл. 4). Достигается это при постоянном сочетании резорбции кости на субэндостальной поверхности и аппозиционным приростом на субпериостальной поверхности за счёт активности остеобластов внутреннего слоя периоста.

При замещении хряща костью у птиц по морфологическим проявлениям и метаболическим показателям можно выделить два этапа. На первом этапе, как и у земноводных, значительная часть диафиза кости состоит из хряща с гипертрофированными хондроцитами, и увеличение костномозговой полости по длине закладки обеспечивается одноядерными клетками с кластическими свойствами, которые локализованы по фронту резорбции хряща (рис. 24).

Матрикс такого хряща ещё не минерализован, однако имеется активность щелочной фосфатазы в некоторых гипертрофированных хондроцитах вдоль границы

Период развития (сут)	L	D	s	D <sub>2</sub>	L:D <sub>1</sub>	$L:D_2$
10	4500	270	50-60	370-390	16:1	13:1
15	9300	600	150-170	900-950	15:1	10:1
19	16 000	800	250-300	1300-1400	20:1	12:1
2*	18 900	900	300-350	1500-1600	21:1	12:1
30*	36 500	1200	700-800	2600-2800	30:1	14:1

Таблица 4. Некоторые морфометрические параметры бедренной кости в онтогенезе *Gallus domesticus* Table 4. Some morphometric parameters of the femur in ontogenesis of *Gallus domesticus* 

\* Постнатальный онтогенез.

Условные обозначения. L — длина диафиза (мкм); D<sub>1</sub> — диаметр костно-мозговой полости (мкм); D<sub>2</sub> — диаметр кости в центре диафиза (мкм); s — толщина костной ткани в центре диафиза (мкм).

с периостальной костью (рис. 6, 7). Продольный рост закладок происходит в результате терминальной дифференцировки хондроцитов ростковых хрящей и периостального остеогеза в зонах метафизов. На втором этапе, который у эмбрионов курицы начинается на 15-16 сут развития, происходит очаговая (вдоль диафиза) резорбция хряща с гипертрофированными хондроцитами (рис. 6, Б). Формирующиеся в хряще каналы к 17-м суткам развития плодов достигают зоны созревающих хондроцитов и заполнены сосудами, на поверхности которых локализованы остеогенные клетки. Формирование каналов и васкуляризация хрящевого матрикса со стороны мозговой полости усиливается, и к 19-м суткам развития они пронизывают зоны, содержащие гипертрофированные хондроциты, достигая пролиферирующих клеток и проникая даже в эпифизы (рис. 25). По фронту васкуляризации хряща с гипертрофированными хондроцитами отмечается высокая активность щелочной фосфатазы (рис. 26, A). На 18–19-е сутки эмбриогенеза при проведении реакции Косса в матриксе такого хряща появляются очаговые, расположенные вдоль каналов, отложения фосфата кальция (рис. 26, Б). Здесь же в контакте с минерализованным хрящом дифференцируются остеобласты, которые синтезируют на его поверхности органические компоненты костной ткани (эндохондральная кость) (рис. 26, В).

Формирование каналов, особенно в пространстве между костным диафизом и гипертрофированным хрящом, позволяет обеспечивать моделирование кости, т. е. постепенное увеличение диаметра костномозговой полости за счёт субэндостальной резорбции костного диафиза при продолжающемся активном аппозиционном приросте кости со стороны периоста. А минерализация хрящевого матрикса, содержащего гипертрофированные хондроциты, усиливает прочность кости в местах её активного роста (метафизы). Это важная структурная особенность, связанная с укреплением костей птиц в период выклева, когда существенно увеличивается нагрузка на весь локомоторный аппарат и скелет в частности.

Костномозговая полость продолжает увеличиваться по длине костей за счёт активной резорбции мононуклеарными клетками неминерализованного хряща с гипертрофированными хондроцитами. Там, где такой матрикс содержит соли фосфата кальция, в этом процессе участвуют многоядерные хондрокласты (рис. 26,  $\Gamma$ ). Таким образом, в зонах замещения одновременно реализуются два процесса, обеспечивающие рост и моделирование скелета конечностей. Происходит формирование на обширных фрагментах локально минерализованного хрящевого матрикса костной ткани. Осуществляется резорбция хряща с гипертрофированными хондроцитами мононуклеарными и многоядерными хондрокластами, что обеспечивает продольное увеличение костномозговой полости, развитие в ней очагов гемопоэза и ремоделирование диафиза мо мере роста животных и увеличения нагрузки на скелет конечностей. В то же время интенсивное разрушение зоны хряща, содержащей гипертрофированные хондроциты (что заметно по темпам увеличения мозговой полости), не приводит со временем к её уменьшению.

Это обусловлено тем, что процессы терминальной дифференцировки хондроцитов в ростковых хрящах доминируют над темпами его резорбции. Например, у 15-суточных эмбрионов кур длина этой зоны со стороны дистального и проксимального диафиза бедренной кости составляла по 2600 ± 180 мкм, на 17-е сутки —  $3400\pm230$  мкм, а перед выклевом —  $4300\pm230$  мкм. У новорожденных цыплят такой хрящ расчленяется каналами на отдельные фрагменты (островки). Большая часть его постепенно разрушается и утилизируется, а те фрагменты, которые содержат минеральные кристаллы, сохраняются и используются как остов для синтеза костной субстанции (рис. 26, В). Преобладание после выклева цыплят хрящевой резорбции над темпами дифференцировки хондроцитов приводит к тому, что у 1-месячных кур длина зоны хряща с гипертрофированными хондроцитами с каждой стороны диафиза сокращается до 1000 мкм. В то же время в зоне метафиза (эндосте) сохраняются массивные островки минерализованного хряща с группами гипертрофированных хондроцитов (рис. 27). На его поверхности формируется эндохондральная кость. В этот период развития зона замещения в костях птиц похожа на структуру эндохондральной кости у млекопитающих. Разница лишь в том, что у млекопитающих эндохондральная кость формируется на сохраняющихся продольных кальцинированных фрагментах хрящевого матрикса. У птиц же основой для остеогенеза являются фрагменты хрящевого матрикса, расположенные между каналами и содержащие большое количество гипертрофированных хондроцитов (рис. 27). Такие костно-хрящевые минерализованные фрагменты постоянно разрушаются присутствующими здесь в большом количестве хондрокластами (рис. 26, Г).

При развитии длинных костей птиц можно выделить следующие особенности:

— в период эмбрионального развития (до 15 сут) в зонах роста длинных костей матрикс хряща с гипертрофированными хондроцитами длительный период остаётся неминерализованным и его резорбция при формировании костномозговой полости осуществляется мононуклеарными клетками с кластическими свойствами;

— после 15 сут эмбриогенеза в зоне гипертрофированных хондроцитов эпифизарных хрящей длинных костей начинается отложение минеральных компонентов. Этот процесс совпадает с появлением многоядерных хондрокластов и синтезом на фрагментах минерализованного хряща органических субстратов костной ткани. Инициировать дифференцировку многоядерных хондрокластов и остеобластов может минерализованный матрикс хряща;

— формирование перед выклевом цыплят в зонах гипертрофии и пролиферации ростковых хрящей большого количества хрящевых каналов с находящимися в них кровеносными сосудами, обеспечивает поступление энергетических и пластических субстратов и синтез остеобластами органических и минеральных компонентов костной ткани, что способствует укреплению и моделированию растущих костей при возрастающей гравитационной нагрузке после рождения.

— у цыплят после рождения усиливаются минерализация ростковых хрящей в зонах гипертрофированных хондроцитов и конструкция всей кости за счёт интенсификации эндохондрального остеогенеза и процессов ремоделирования, что является адаптивной реакцией длинных костей конечностей на возрастающую локомоторную и весовую нагрузку.

## 3.3. Сопоставление структуры эпифизарных хрящей и моделирование длинных костей у грызунов (*Rattus norvegicus*) и летучих мышей (*Nyctalus noctula*)

В пределах каждой хрящевой закладки длинной кости исследованных млекопитающих по морфологическим критериям (форма, размер, концентрация клеток) можно выделить центральную зону, два полюса или эпифизы и две промежуточные зоны. Наиболее зрелые дифференцированные хондроциты расположены в центре закладок, что подтверждается нарастанием массы цитоплазмы, усилением ее базофилии и альцианофилии. Постепенно они увеличиваются в объёме также за счёт гидратации цитоплазмы, приобретая морфологические признаки гипертрофированных. Параллельно с этим процессом по наружному контуру диафиза закладок происходят изменения структуры перихондрия. Он становится многослойным и хорошо васкуляризированным. В клетках его внутреннего слоя обнаружена активность щелочной фосфомоноэстеразы. Эти клетки дифференцируются в остеобласты и начинают синтезировать компоненты костной ткани (рис. 28).

В закладках скелета крыс и летучих мышей кость диафиза губчатая, сформирована большим количеством трабекул, которые отделены одна от другой кровеносными сосудами и остеогенными клетками. Хондроциты промежуточных зон имеют несколько уплощённую форму относительно длинной оси закладки. Они здесь интенсивно размножаются, дифференцируются и постепенно приобретают гипертрофированное состояние. Переход их от размножения в состояние созревающих и гипертрофированных является тем механизмом в формирующемся скелете, который обеспечивает рост хрящевых закладок. Эти процессы взаимосвязаны с периостальным остеогенезом: по мере приобретения хондроцитами гипертрофированного состояния происходит формирование периостальной кости по наружному контуру диафиза. Кость формируется вдоль хрящевой закладки, начиная от зон созревающих хондроцитов. Такова в общих чертах структура хрящевых закладок исследованных плодов летучих мышей и лабораторных белых крыс перед формированием первичной костномозговой полости.

Начало резорбции хряща в хрящевых закладках скелета — это очередной этап их структурно-функциональной перестройки, обеспечивающий формирование костномозговой полости для дифференцировки гемопоэтических клеток, ремоделирования кости с учётом локомоторной активности плодов и механических нагрузок на скелет после рождения животных (рис. 29). В результате этих процессов и начавшейся дифференцировки гемопоэтических клеток формируется первичная костномозговая полость. Последующее её расширение в дистальном и проксимальном направлении от центра скелетных закладок конечностей плодов крыс и летучих мышей происходит в условиях постоянной минерализации матрикса хряща в зоне гипертрофированных хондроцитов (рис. 30). Минерализуются продольно ориентированные фрагменты матрикса, в то время как поперечные перегородки, отделяющие один от другого гипертрофированные хондроциты, разрушаются одноядерными клетками, и в лакуны с хондроцитами проникают капиллярные почки.

Таким образом, минерализация в этих зонах скелетных закладок имеет определённые особенности, позволяющие осуществлять разрушение поперечных перегородок хрящевого матрикса с последующим внедрением в лагуны капиллярной сети с сопутствующими периваскулярными полипотентными клетками. Дифференцируясь в остеогенном направлении, они синтезируют компоненты костной ткани на продольных минерализованных фрагментах хряща (рис. 31). В зонах эндохондрального остеогенеза появляются в большом количестве и многоядерные остеокласты, которые разрушают формирующуюся эндохондральную кость, обеспечивая таким способом постоянное увеличение костномозговой полости и зоны гемопоэза. Формирование костномозговой полости способствует также и началу ремоделирования диафизарного костного стержня со стороны эндостальной поверхности. Если бы этого не происходило, то внутренний диаметр полости кости в центре закладки, а в дальнейшем, по мере резорбции хряща, и в направлении эпифизов оставался таким как первоначально в хрящевых закладках с гипертрофированными хондроцитами. Поэтому, чем длиннее зоны хряща с гипертрофированными хондроцитами в диафизе закладки кости, тем меньше вероятность его поперечного расширения за счёт процессов внутреннего ремоделирования. Это сказывается на соотношении длины и поперечного диаметра скелетных закладок у животных с разной локомоторной функцией скелета конечностей (табл. 5–8).

Следует отметить, что ещё в эмбриогенезе в зонах роста и замещения длинных костей конечностей млекопитающих начинают сосуществовать два альтернативных гистогенетических процесса: 1) каскад этапов дифференцировки хондроцитов рост-ковых хрящей, обеспечивающих рост скелетной закладки за счёт периостального остеогенеза; 2) формирование эндохондральной кости в зонах метафизов, которая постоянно разрушается. Их сочетание обеспечивает продольный рост костей и постоянное увеличение костномозговой полости, где полномасштабно развертывается гемопоэз. Какова роль эндохондральных трабекул в этом процессе? На примере исследования развития скелета конечностей земноводных и птиц нами было установлено, что в период эмбриогенеза или личиночного развития в зонах замещения костей не формируется эндохондральная кость и расширение по длине закладки костномозговой полости осуществляется одноядерными хондрокластами.

Костно-хрящевые минерализованные трабекулы в растущих длинных костях плодов крыс и летучих мышей являются структурами временными, постоянно обновляющимися, и их основное назначение состоит в укреплении кости в местах роста (зона метафизов).

Особенности локомоторной функции передних конечностей исследованных нами грызунов и летучих мышей оказывают существенное влияние на морфогенез, темпы роста и структуру ростковых хрящей. Эти структурные отличия зон роста хорошо заметны при сопоставлении гомологичных костей плодов крыс и летучих мышей. У 16-17-суточных плодов крыс после формирования костномозговой полости зона пролиферации в дистальном и проксимальном ростковом хряще плечевой кости имеет высоту 300 ± 21 мкм, а зона гипертрофированных хондроцитов — 354 ± 23,6 мкм. Внутренний диаметр диафиза не превышает 300 мкм (рис. 2). Соотношение длины диафиза к поперечному диаметру составляет примерно 5 : 1 (табл. 5). В гомологичных костях летучих мышей эти параметры составляют соответственно 351 ± 26,3; 557 ± 34,5; 353,2 ± 22,1 мкм и 7 : 1 (табл. 6-8). При таком начальном (после резорбции хряща и формирования костномозговой полости) соотношении структурных зон ростковых хрящей гомологичных костей крыс и летучих мышей начинается активный морфогенез скелетных закладок. Начиная с 19 сут эмбриогенеза до 30 сут постнатального развития крыс, длина костномозговой полости в плечевой кости увеличивается каждые сутки в среднем на 263 ± 24,7 мкм. Существенно не изменяются в течение пренатального периода развития крыс (21 сут) размер структурных зон дистальных и проксимальных эпифизарных хрящей плечевой кости. Так, на 19-е сутки эмбриогенеза высота зоны пролиферации и гипертрофии составляет соответственно 354 ± 21,5 и 262 ± 23,7 мкм (рис. 2). В зоне пролиферации хондроциты не формируют «изогенных» групп и располагаются в лакунах по 1-2 клетки. По направлению к костномозговой полости (зона созревания) они приобретают округлую форму, несколько увеличиваясь в продольном диаметре. В них содержатся большие скопления гликогена и выявляется щелочная фосфомоноэстераза, что определяется реакцией ШИК и Гомори. В зоне гипертрофии объём хондроцитов увеличивается ещё больше, они набухают, а базофилия цитоплазмы снижает-

Период развития (сут)	L	D	L:D
15*	900	240	4:1
17*	1600	300	5:1
19*	3000	500	5:1
1	4400	700	6:1
10	6400	800	8:1
30	11000	1100	10:1
60	14000	1650	9:1

Таблица 5. Некоторые морфометрические параметры плечевой кости в онтогенезе *Rattus norvegicus* Table 5. Some morphometric parameters of the humerus in ontogenesis of *Rattus norvegicus* 

\* Пренатальный онтогенез.

Условные обозначения. L — длина диафиза (мкм); D — диаметр костно-мозговой полости в центре дифиза (мкм).

#### Таблица 6. Некоторые морфометрические параметры плечевой кости в онтогенезе Nyctalus noctula

Table 6.	Some morphometric	parameters of the hun	perus in ontogenesis	of Nyctalus noctula
1 4 0 1 0 0	source morphometric	parameters or the han	ier us in ontogeneois	011190111110 110011111

Длина тела плодов* и период развития	L	D	L:D
1,5 см	2100	300	7:1
1,7 см	2700	400	7:1
1 сут	6000	550	11:1
12 сут	9300	750	12:1

\* Пренатальный онтогенез.

Условные обозначения. L — длина диафиза (мкм); D — диаметр костно-мозговой полости в центре дифиза (мкм).

Таблица 7. Некоторые морфометрические параметры лучевой кости в онтогенезе Nyctalus noctula

Длина тела плодов* и период развития	L	D	L:D
1,5 см	1800	270	6,5:1
1,7 см	3800	400	9:1
1 сут	8400	500	17:1
12 сут	12000	700	17:1

T a ble 7. Some morphometric parameters of the radial bone in ontogenesis of Nyctalus noctula

\* Пренатальный онтогенез.

Условные обозначения. L — длина диафиза (мкм); D — диаметр костно-мозговой полости в центре дифиза (мкм).

ся. Между гипертрофированными хондроцитами присутствует хрящевой матрикс, который разделяет лакуны с 1–2 хондроцитами. В пределах лакун клетки отделены одна от другой околоклеточным матриксом, который очень слабо окрашивается реактивом ШИФФ и альциановым синим. Продольные межтерриториальные перегородки хрящевого матрикса до рождения животных тонкие (примерно 2–3 мкм), что связано с непродолжительным периодом развития скелетных закладок, в течение которого хондроциты ростковых хрящей ещё не в состоянии формировать достаточно объёмные массивы хрящевого матрикса. Они содержат фосфат кальция и являются субстратной основой для отложения костной ткани в зонах замещения. Непосредственно перед рождением крыс и летучих мышей толщина эндохондраль-

Длина тела плодов* и период развития	L	D	L:D
1,5 см	1800	270	6,5 : 1
1,7 см	3800	400	9:1
1 сут	8400	500	17:1
12 сут	12000	700	17:1

Таблица 8. Некоторые морфометрические параметры метакарпальной кости (Mc<sub>3</sub>) в онтогенезе Nyctalus noctula

Table 8. Some morphometric parameters of metacarpal bone (Mc,) in ontogenesis of Nyctalus noctula

\* Пренатальный онтогенез.

Условные обозначения. L — длина диафиза (мкм); D — диаметр костно-мозговой полости в центре дифиза (мкм).

ных трабекул (включающая как массу матрикса хряща, так и сформированную на её основе костную ткань) в зонах замещения разных костей отличается (рис. 32). Она зависит от взаимодействия нескольких процессов: темпов роста скелетных закладок и продолжительности эмбриогенеза, соотношения в зонах пролиферации хондроцитов и межклеточного матрикса, репродуктивной и метаболической активности хондроцитов, размеров длинных костей конечностей перед рождением животных. Рост симметричных костей конечностей в эмбриогенезе крыс происходит синхронно и с одинаковой скоростью со стороны проксимального и дистального эпифизарного хряща. Эти результаты мы получили экспериментальным путём. Крысам на 18-е сутки беременности вводили <sup>3</sup>Н-пролин на время 1, 72 и 144 ч. Через трое суток исследовали плечевую кость новорожденных (<sup>3</sup>Н-пролин 72 ч), а через 6 сут — 3-дневных крысят (<sup>3</sup>Н-пролин 144 ч). На гистоавтографах продольных срезов кости определяли локализацию интенсивно меченых <sup>3</sup>Н-пролином костных трабекул диафиза. Через 1 ч после введения <sup>3</sup>Н-пролина беременным крысам максимальную метку радионуклида содержали те костные структуры плодов, которые наиболее интенсивно формировались. К ним следует отнести, прежде всего, периостальную и эндохондральную кость в зоне метафизов, которая наиболее интенсивно накапливала <sup>3</sup>Н-пролин (рис. 33, *A*). По мере роста кости сильно меченые структуры смещались от зоны метафизов в глубь диафиза, уступая место вновь образующейся периостальной и эндохондральной костной ткани, которая уже не содержала радиоактивный пролин. Таким способом через 3 сут после введения <sup>3</sup>Н-пролина мы обнаружили интенсивно меченые эндохондральные трабекулы на равном удалении (630-650 мкм) от терминально расположенных гипертрофированных хондроцитов дистального и проксимального эпифизарных хрящей. Через 6 сут после введения радионуклида (уже 3-суточные крысята) эти меченые трабекулы в большинстве своём были разрушены хондрокластами, за счёт чего и произошло увеличение по длине диафиза костномозговой полости. Однако интенсивно меченые фрагменты костного диафиза (периостальная кость) сохранились, но уже на удалении от проксимального и дистального метафиза примерно на 1350 мкм с каждой стороны диафиза (рис. 33, Б). Из полученных морфометрических данных по динамике смещения костной ткани с меткой <sup>3</sup>Н-пролина очевидно, что удлинение диафиза со стороны проксимального и дистального эпифизарных хрящей до рождения крыс происходит с одинаковой скоростью (200-220 мкм/сут).

В зонах пролиферации ростковых хрящей длинных костей 2–8-недельных крыс хондроциты имеют уплощённую форму, ядро смещено от центра, цитоплазма обширная, что позволяет предположить их высокую метаболическую активность. Так в проксимальном ростковом хряще плечевой кости 20-суточных крыс в каждой лакуне или хрящевом «дворике» локализовано от 2 до 10 клеток. Их количество в «изогенных» группах возрастает по направлению к зоне созревания и определяет конкретное участие проксимального и дистального эпифизарного хряща в росте скелетной закладки. На поперечных срезах кости на уровне зоны пролиферации росткового хряща хондроциты имеют вид обширных по площади клеток. В объёме — это дискообразные хондроциты. Диаметр ядер колеблется от 8 до 12 мкм с чётко выделяющимися 1-2 ядрышками. Цитоплазма обширная (диаметр 20-25 мкм), плотная, хорошо структурированная. В «изогенных» группах локализовано 2-3 клетки, однако общее количество зависит от топографического уровня гистологического среза. Ближе к зоне созревания количество хондроцитов увеличивается. Таким образом, общее количество хондроцитов в объёме «изогенной» группы может составлять 16–30 и более клеток. Так за время многократных циклов делений хондроцита резервной зоны в направлении зоны созревания и гипертрофии формируется клон в виде «изогенной» группы клеток (рис. 34). Однако реальное влияние на продольный рост закладки оказывают хондроциты, переходящие от состояния созревающих в гипертрофированные с увеличенной продольной высотой. Они располагаются в виде монетных столбиков, и их количество варьирует от 5 до 10-15 клеток в разных ростковых хрящах в зависимости от возраста животного и конкретной скелетной закладки (рис. 34). Расположение на поперечных срезах кости по несколько хондроцитов в каждой «изогенной» группе росткового хряща в большей степени способствует увеличению его ширины и диафиза в целом. Продольно-поперечное моделирование растущей кости в значительной мере определяется структурой «изогенных» групп хондроцитов в ростковых хрящах. Различия в структуре дистального и проксимального эпифизарных хрящей уже заметны на 10-е сутки постнатального развития крыс и сохраняются в последующем на протяжении роста скелета (рис. 36). Отличаются также и эндохондральные трабекулы в зонах замещения: они имеют большую длину в том метафизе, где скорость роста костного диафиза преобладает.

Одним из наиболее значимых адаптивных явлений в истории эволюции млекопитающих является управляемый полёт летучих мышей (Adams, 2008; Cooper et al., 2012). А ключевой инновацией — их крыло, которое состоит из мембраны кожи, натянутой между удлинёнными третьим-пятым пальцами передних конечностей (Ковтун, 1984). Клеточные механизмы, обеспечивающие удлинение лучевой кости и метакарпальных, исследовались нами ранее (Ковтун, Житников, 1995; Житников, 2008, 2011). Однако генетические механизмы, регулирующие дифференцировку хондроцитов в эпифизарных хрящах для ускоренного роста определённых костей, ещё недостаточно исследованы.

Лишь в последние несколько лет после расшифровки генома появляются исследования, в которых анализируется избирательная экспрессия отдельных генов, регулирующих пролиферацию и метаболизм хондроцитов ростковых хрящей и их последующую терминальную дифференцировку (Sears, 2008). Разнообразие морфологических особенностей гомологичных костей разных видов животных может быть связано с изменением активности всего лишь нескольких генов (Fondon, Garner, 2004). Ростковые хрящи скелетных закладок летучих мышей, в отличие от грызунов, в период эмбрионального развития уже приобретают морфологические особенности, обеспечивающие, прежде всего, развитие и адаптацию передних конечностей к полёту, а задних — к фиксации их тела в период отдыха. Рост отдельных костей должен обеспечиваться такими темпами, чтобы у взрослых особей соотношение длины плечевой, лучевой, метакарпальных и фаланг составляло примерно 1 : 1,7 : 1,7 : 0,5 (Ковтун, 1984) и вместе с летательной перепонкой обеспечивало бы локомоторную функцию. У новорожденных летучих мышей скелетные элементы передних конечностей (плечевая, лучевая и пястные кости) уже отличаются длиной и поперечным диаметром, размерами ростковых хрящей и их структурных зон (рис. 2, 15; табл. 6-8). Во всех длинных костях конечностей имеется костномозговая полость и её расшире-

ние в направлении проксимального и дистального эпифизов обеспечивается за счёт резорбции поперечных перегородок хрящевого матрикса и очень тонких эндохондральных трабекул. Происходит это при постоянной пролиферации и последующей гипертрофии хондроцитов ростковых хрящей и сопутствующей минерализации продольных перемычек межклеточного хрящевого матрикса (рис. 30). Формирующиеся костно-хрящевые трабекулы распространяются в глубь костномозговой полости на 500-1000 мкм. Их длина зависит от интенсивности роста конкретной скелетной закладки конечности летучей мыши и тех функциональных нагрузок, которые несёт каждая кость в передних или задних конечностях. Таким образом, количество и объём эндохондральных трабекул в зонах замещения и продольно-поперечное моделирование растущей кости в значительной мере определяется структурой «изогенных» групп хондроцитов в ростковых хрящах (рис. 34). Каким образом трабекулы формируются? Деление хондроцитов в эпифизарных хрящах происходит по принципу дифференцирующего митоза, когда одна из двух клеток переходит в фазу специфического функционирования, обеспечивая лишь биосинтез белково-углеводных макромолекул матрикса, или же приобретает свойства созревающей клетки, а другая — остаётся в репродуктивном цикле (Житников, 2011). Такой механизм кинетики репродукции и дифференцировки хондроцитов, когда в зонах пролиферации постоянно изменяется соотношение делящихся и неделящихся клеток, приводит к накоплению в «изогенных» группах эпифизарных хрящей разного количества хондроцитов. Начиная делиться у границы с резервной зоной, хондроциты формируют «изогенные» группы в виде монетных столбиков в направлении продольного роста кости, располагаясь по ширине клона по одной или несколько клеток (рис. 34). В последнем случае более эффективно обеспечивается продольно-поперечный рост кости от зоны метафиза. Эти морфологические особенности хорошо видны при сопоставлении структуры дистального и проксимального эпифизарных хрящей длинных костей крыс и летучих мышей и они сохраняются во время роста скелета (рис. 36, 37).

В растущих костях летучих мышей, как и у других млекопитающих, эндохондральные трабекулы в зонах замещения структуры временные, но постоянно образующиеся. Они обновляются здесь каждые 3–4 сут. В результате их резорбции остеокластами увеличивается по длине диафиза и костномозговая полость. Расстояние между трабекулами изменяться в зависимости от структуры ростковых хрящей, темпов роста скелетных закладок и составляет 50–100 мкм и более (рис. 38, 39).

Ростковые хрящи скелетных элементов передних конечностей летучих мышей (кроме фаланг) уже после рождения животных характеризуются достаточно высокой концентрацией хондроцитов в зонах пролиферации и созревания (рис. 34). Масса хрящевого матрикса между «изогенными» группами хондроцитов в таких структурах при их трансформации в созревающие и гипертрофированные клетки нарастает обратно пропорционально скорости терминальной дифференцировки и прямо зависит от их концентрации в структуре. Эти два показателя: структура «изогенных» групп и продолжительность интенсивной биосинтетической активности хондроцитов до перехода в гипертрофированное состояние определяют массу и количество трабекулярных хрящевых структур в виде продольно ориентированных тяжей в зоне замещения. Формирующаяся на их основе костная ткань (эндохондральная кость) является структурной основой, связывающей эпифизы и диафиз кости. Поэтому прочность кости в зонах роста (метафиз) зависит от концентрации костнохрящевых трабекул на единицу площади, их количества и объёмной массы. Если сопоставить дефинитивные размеры гомологичных костей крыс и летучих мышей (например, плечевые), то они существенно не отличаются (соответственно 25 и 31 мм). Однако общая концентрация хондроцитов в зонах пролиферации проксимального и дистального росткового хряща вдоль длинной оси закладки от резервной зоны до зоны созревания у 10-суточных крыс равна 28–30 хондроцитам, а у летучих мышей —

145 клеткам. В чём биологическая целесообразность такой структуры? Она определена особенностями онтогенеза каждого животного, интенсивностью анаболических процессов, обеспечивающих прирост массы тела и окончательный дефинитивный размер. Масса крыс при достижении половой зрелости, которая наступает примерно через 4-5 мес, составляет 200-250 г, а масса тела взрослой особи рыжей вечерницы (25-30 г) достигается через 2,5 мес. Таким образом, прирост массы тела в сутки у рыжей вечерницы составляет 0,4 г, а у крыс — 2,1 г. Общий уровень анаболизма, естественно, сказывается и на растущем скелете. Если бы структура зон пролиферации и созревания ростковых хрящей летучих мышей была такой, как у крыс, то при более интенсивных темпах роста плечевой кости (400-500 мкм/сут) очень быстро исчерпался бы резерв хондроцитов и рост скелета прекратился. Поэтому уже в эмбриональный период развития начинают формироваться зоны пролиферации с большим количеством хондроцитов. В этих зонах за счёт большего абсолютного количества клеток обеспечивается компенсация в результате терминальной дифференцировки (гипертрофированное состояние) при менее выраженных процессах анаболизма, включающих в определённой мере и интенсивность репродукции хондроцитов. А ростковые хрящи сохраняются в течение длительного периода роста скелета. Таким способом обширные зоны пролиферации и созревания некоторых ростковых хрящей длинных костей передних конечностей летучих мышей обеспечивают своевременную компенсацию хондроцитов, которые гибнут при замещении хряща костью (рис. 37). Но такие зоны хряща выполняют и другую важную роль в закладках скелета летучих мышей. Как известно, хрящевой матрикс представляет собой гидрофильную структуру, состоящую из коллагена и гликозаминогликанов. Обладая гибкостью и эластичностью, дистальные эпифизарные хрящи лучевой и метакарпальных костей конечностей могут обеспечивать в условиях полёта молодых летучих мышей прераспределение нагрузки на летательную перепонку, усиливая аммортизационные свойства крыла. Кроме того, эти эпифизарные хрящи сохраняются более продолжительное время, обеспечивая удлинение лучевой и метакарпальных костей и инициируя увеличение площади поверхности летательной перепонки в процессе продолжающегося роста летучих мышей. Структурные вариации в клетках и матриксе зон роста происходят на общем фоне изменений интенсивности метаболизма и соотношения в хряще тех типов макромолекул, которые являются энергетическим и пластическим внутриклеточным резервом (гликоген) и входят в состав основного вещества (гликопротеины, сульфатированные гликозаминогликаны, коллаген). Эти макромолекулы определяют свойства хряща при замещении костной тканью. Их количество и соотношение оказывает существенное влияние на морфогенез хрящевых закладок, дифференцировку клеток и минерализацию матрикса.

Сопоставляя в скелетных закладках передних или задних конечностей животных, отличающихся локомоторной и механической нагрузкой на скелет, структурные особенности ростковых хрящей и эндохондральных трабекул в зонах замещения хрящевой ткани костной, можно выделить следующее. Количественное соотношение и длина первичных костно-хрящевых трабекул в зонах замещения является результатом процессов, происходящих в ростковых хрящах, и зависит от:

1) соотношения длин скелетных закладок и массы тела;

2) темпов роста скелетных закладок и массы тела в постнатальном онтогенезе;

3) дефинитивных размеров скелетных элементов и продолжительности постнатального роста животных;

4) структуры клонов («изогенных» групп) хондроцитов в зоне пролиферации ростковых хрящей (распределение в виде монетных столбиков или группами), их количества по длине закладки.

### 3.4. Гистологическая конструкция эпифизарных хрящей в коротких и длинных костях конечностей и структурно-метаболические изменения в хондроцитах и матриксе эпифизов при формировании вторичных центров окостенения

Продольный рост костей со стороны дистального и проксимального края диафиза осуществляется при участии парных эпифизарных хрящей, структура которых на разных этапах развития скелета всех позвоночных животных косвенно отражает интенсивность этого процесса в длинных и коротких костях (табл. 1, 2). Эпифизарные хрящи отличаются в скелетных закладках, прежде всего, высотой пролиферативной и гипертрофической зон, диаметром набухших хондроцитов и соотношением клеток и гиалинового матрикса. Гипертрофированное состояние хондроцитов является терминальной фазой их дифференцировки в ростковых хрящах и предшествует замещению хрящевой ткани костной. Последовательные этапы дифференцировки хондроцитов ростковых зон, структурная и качественная перестройка гиалинового матрикса создают метаболические предпосылки для периостального и эндохондрального остеогенеза в длинных и коротких костях скелета позвоночных животных разных классов. Интенсивность роста скелетных закладок в онтогенезе может зависеть от темпов терминальной дифференцировки хондроцитов (Житников, 2004 б). Этот показатель, как и концентрация хондроцитов в «изогенных» группах и интенсивность биосинтеза ими коллагеновых белков, гликопротеинов и протеогликанов, влияет на объём гиалинового матрикса в зонах замещения быстро и медленно растущих скелетных закладках. То есть, чем продолжительнее хондроциты зоны созревания эпифизарных хрящей находятся в фазе интенсивной биосинтетической активности, не приобретая признаков набухших, гипертрофированных клеток, тем медленнее осуществляется периостальный и эндохондральный остеогенез и, следовательно, замещение хрящевой ткани костной. В зависимости от структуры «изогенных» групп хондроцитов (по одному в виде «монетных» столбиков или по 3-4 клетки поперёк длинной оси закладки) в зонах гипертрофии эпифизарных хрящей исследованных нами групп животных изменяется соотношение клеток и площади гиалинового матрикса. Продольно ориентированные фрагменты матрикса хряща, которые сохраняются после инвазии в лакуны с гипертрофированными хондроцитами кровеносных сосудов, являются субстратной основой для синтеза минеральных и органических компонентов костной ткани. Установлено, что на эквивалентной площади гистологического среза общее количество и длина продольных костнохрящевых трабекул в зонах замещения быстро и медленно растущих скелетных закладок одного животного существенно отличается. Размеры эпифизарных хрящей в скелетных закладках животных, как и структурные зоны каждого из них с разными функциональными свойствами хондроцитов, отличаются уже в период формирования в почке конечности хондробластем. Причём большими по массе клеток являются те закладки, хондробластемы которых в эмбриогенезе возникают раньше (Hinchliff et al., 1983). В этот период внутриутробного развития ещё полноценно не функционируют железы внутренней секреции и рост хондробластем, а также распределение в них клеток по темпам размножения и интенсивности биосинтезов, реализуются у каждого вида животных в соответствии с уровнем экспрессии генетической программы скелетогенеза. Например, у птиц (G. domesticus) практически не отличаются по массе клеток хондробластемы большеберцовой и малоберцовой костей. Однако в последующем происходит задержка продольного и поперечного роста хрящевой закладки малоберцовой кости, в то время как большеберцовая кость растёт и развивается соотносительно с другими скелетными элементами конечности (Hinchliff et al., 1983). В период развития плодов и после рождения животных в организме происходит становление интегрированной гормональной системы контроля репродукции, метаболизма и дифференцировки клеток. В это время взаимоотношения между метаболическими процессами в эпифизарных хрящах и в зонах периостального и эндохондрального остеогенезом становятся в большей мере гормонозависимыми и могут изменяться, исходя из степени нарушения гормонального гомеостаза (Ohlsson et al., 1998; Reinecke et al., 2000). Известно, например, что уровень и активность в организме гормона роста определяет интенсивность, продолжительность роста и соотносительные размеры скелетных элементов, что подтверждено клиническими наблюдениями за детьми с нарушениями функции гипофиза (гипофизарный нанизм) и в экспериментах с гипофизэктомированными животными (Thurston et al., 1983; Robson, 2002). Установлено, что при дефиците в организме гормона роста в эпифизарных хрящах растущего скелета существенно уменьшается размер зоны пролиферации, а основной причиной замедления роста скелета является задержка скорости созревания хондроцитов и, как следствие, нарушение формирования на основе гиалинового матрикса эндохондральной и периостальной костной ткани (Siebler et al., 2001). Гистологическая конструкция росткового хряща по соотношению клеток и гиалинового матрикса, по количеству, форме и размерам хондроцитов отражает его значимость в обеспечении продольного роста скелетной закладки, темпам и масштабности замещения хрящевой ткани костной. У животных одного вида их структура в разных скелетных закладках реально отражает значимость в росте по темпам и продолжительности. Однако эти же гистоморфометрические параметры в гомологичных костях животных разных отрядов, классов не могут являться достоверным признаком, на основании которого возможно сопоставление интенсивности роста скелетных органов (Житников, 2007 а, б). Существует множество вариаций таких взаимоотношений у разных групп позвоночных животных (Kirkwood, Kember, 1993). Варьирование соотношения клеток и матрикса в эпифизарных хрящах особенно сказывается в период активного роста скелета, когда колебания этих параметров существенно влияют на темпы роста и структурную композицию эндохондральных трабекул (Житников, Родионова, 2003). Максимальное увеличение костной массы и эндохондральных трабекулярных конструкций в зонах замещения отдельно взятого костного органа зависит от метаболических и репродуктивных свойств хондроцитов, которые могут изменяться под влиянием антропогенных факторов и локомоторных нагрузок на костный орган. При этом скорость и соотносительность роста разных скелетных элементов контролируется и регулируется системными гормонами и другими метаболитами общего и локального действия (Nilson, 1990; Hill, Logan, 1992; Nakashima, 2002; Robson, 2002; Mikic, 2008). В результате такого интегрированного, очень сбалансированного контроля роста ошибка в общей длине скелетных элементов симметричных конечностей в онтогенезе человека не превышает 0,2 % (Kember, 1993). Достигается это на уровне регулирования метаболизма и размножения хондроцитов эпифизарных хрящей и остеогенных клеток в зонах замещения.

Основными морфологическими признаками ростковых пластинок, по которым можно оценивать скорость роста длинных и коротких костей и структурную композицию эндохондральных трабекул метафиза, следует считать ширину зоны пролиферации, количество хондроцитов в колонках этой зоны и структуру формирующихся здесь «изогенных» групп. Эти особенности являются локальными внутренними свойствами каждой хрящевой пластинки на каждой стадии развития скелетной закладки и изменяются в онтогенезе под влиянием морфогенов и лигандов, ингибирующих или ускоряющих терминальную дифференцировку хондроцитов (Cubo, 2000). Такой принцип взаимодействий и последовательной индукции, когда специфические метаболиты одной клеточной системы или структурной зоны эпифизарного хряща могут влиять на темпы и последовательность дифференцировки клеток в другой зоне костного органа, является важным регулятором формирование новых межклеточных взаимодействий при замещении хрящевой ткани костной и росте скелета (Mikic, 2008). При этом в разных эпифизарных хрящах клетки одного цитотипа могут отличаться наличием и активностью рецепторов, чувствительных к факторам микроокружения и регуляторным системам эндогенного действия, что и определяет дальнейшую направленность и скорость их дифференцировки (Serra et al., 1999). В настоящее время уже установлено, что стимуляторы и ингибиторы роста, какой бы природы они не были, действуют на клетки тех скелетных органов, которые имеют соответствующие рецепторы (Серов, 2004). Затем, путём последовательных каскадных реакций с участием различных цитоплазматических посредников, они экспрессируют гены хондроцитов, контролирующие размножение, биосинтезы хондроитинсульфатов и коллагена (Chung et al., 2001). При таком действии регуляторных факторов у каждого вида животных (или адаптивной формы) устанавливаются определённые соотношения темпов роста, размеров отдельных скелетных элементов и всего скелета конечностей к массе тела и к тем локомоторным нагрузкам, которые испытывает каждый костный орган животного в период развития и функциональных адаптаций.

Таким образом, в пренатальном и постнатальном онтогенезе животных в длинных и коротких костях скелета формируются эпифизарные хрящи, отличающиеся размерами, количеством хондроцитов, соотношением клеток и матрикса. Эти особенности их гистогенеза определяют структурную композицию эндохондральных трабекул в зонах замещения, интенсивность и продолжительность роста, соотносительные размеры костей.

Развитие трубчатой кости — это не только объёмный рост её хрящевого предшественника, который происходит в результате увеличения популяции хондроцитов и синтеза ими субстратов межклеточного матрикса. Он включает и межклеточные взаимодействия в закладке в период образования первичных и вторичных центров оссификации. Начинается формирование вторичных центров окостенения в эпифизах длинных костей конечностей крыс и летучих мышей примерно на 10-е сут после рождения. В эти сроки развития скелетных закладок хондроциты в центре эпифиза начинают приобретать свойства гипертрофированных, а матрикс хряща минерализуется (рис. 40 А, Б). В эту центральную зону эпифиза врастают кровеносные сосуды с сопутствующими остеогенными клетками и появляются очаги резорбции хряща (Родионова, 1989; Мажуга и др., 1993). Формируется костномозговая полость, по периметру которой находятся в основном гипертрофированные хондроциты, заметные по характерным морфологическим признакам (рис. 41). Их цитоплазма и ядро набухают, клетки увеличиваются в объёме. Структурная упорядоченность внутриклеточных органоидов нарушается. Хрящ частично разрушается хондрокластами, а на оставшихся фрагментах дифференцирующиеся остеобласты синтезируют компоненты костной ткани. Этот процесс распространяется радиально от центра эпифиза, вовлекая постоянно гипертрофирующиеся хондроциты и внеклеточный матрикс. В клетках по-прежнему содержится гликоген. Полисахарид сначала накапливается в хондроцитах, расположенных в центре эпифизов. Эти клетки ещё не имеют признаков гипертрофированных, однако быстрее других увеличиваются в размерах. В них возрастает концентрация гликогена, который выявляется на гистохимических препаратах в виде хлопьевидных скоплений или диффузно распределённых гранул.

Его судьба при последующей резорбции хряща и формировании в центре эпифиза вторичного центра окостенения может быть различна: он может подвергаться фосфоролизу с образованием фосфорилированных остатков глюкозы, которые используются при минерализации матрикса хряща как источник неорганического фосфата; частично подвергается гидролизу под действием гидролитических ферментов, в результате чего его фрагменты и глюкоза попадают в костномозговую полость эпифиза и являются дополнительным пластическим и энергетическим субстратом для дифференцирующихся гемопоэтических и остеогенных клеток (Ali, 1983). Сам факт наличия гликогена в хондроцитах не позволяет оценивать его метаболическое состояние и время обновления. Известно, что синтез и распад гликогена в клетках тканей и органов (печень, мышцы) зависит от концентрации глюкозы в крови и регулируется гормонами (Юровицкий и др., 1978). Полученные нами результаты дают основание утверждать, что созревающие хондроциты эпифизарных и суставных хрящей содержат метаболически активный гликоген, который синтезируется в них и используется в течение времени терминальной дифференцировки.

Через некоторое время в хондроцитах и матриксе хряща, расположенного ближе к диафизам над зоной пролиферации ростковых хрящей, существенно снижается интенсивность окрашивания на наличие сульфатированных гликозаминогликанов (альциановый синий pH 1,5) и интенсивность включения радиоактивного сульфата, как индикатора их синтеза, а также <sup>3</sup>H-пролина (рис. 42). Эти клетки не гипертрофируются (рис. 36). Напротив, они уменьшаются в объёме, ядро становится компактным, а состояние цитоплазматических структур, включающих эндоплазматический ретикулум, секреторные вакуоли и комплекс Гольджи, указывает на снижение биосинтетической и секреторной активности (Мажуга и др., 1993). В матриксе хряща этой зоны начинают преобладать ШИК-положительные гликопротеины. При проведении реакции Гомори и Косса здесь не обнаружена щелочная фосфомоноэстераза и минеральные субстраты. Эта зона известна как буферная, ограничивающая распространение эндохондрального процесса в направлении диафиза (Мажуга и др., 1993). В то же время она является и резервной, пополняя пул хондроцитов для пролиферации и последующей терминальной дифференцировки в растущей скелетной закладке (Abad et al., 2002).

### 4. ГЕТЕРОХРОННОСТЬ РОСТА КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ И ОСОБЕННОСТИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭНДОХОНДРАЛЬНЫХ ТРАБЕКУЛ В ЗОНАХ ЗАМЕЩЕНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ КОСТНОЙ У ЖИВОТНЫХ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Ростковые хрящи в закладках скелета представляют собой растущие и обновляющиеся системы. В этих провизорных структурах последовательные этапы дифференцировки хондроцитов индуцируют по существу периостальный и эндохондральный остеосинтез. Особенностью клеточной кинетики является то, что не все хондроциты зоны пролиферации проходят несколько митотических циклов, до того как приобретают метаболические свойства и морфологические признаки гипертрофированных клеток. Изменение в формирующихся эпифизарных хрящах длинных и коротких костей в период эмбриогенеза соотношения делящихся и неделящихся хондроцитов в конечном итоге определяет их гистологическую структуру по общим размерам и соотношению клеток и матрикса (Житников, 2006). Однако отличия ростковых хрящей по размерам структурных зон и концентрации хондроцитов не являются достаточными аргументами, подтверждающими различную интенсивность роста костей. От этих морфологических параметров, включая и количество клеток в «изогенных» группах, прежде всего, зависит окончательная длина кости, в то время как интенсивность роста определяется скоростью терминальной дифференцировки хондроцитов. Взаимодействие пролиферации и дифференцировки хондроцитов в ростковых хрящах коротких и длинных костей таково, что интенсивность размножения (по времени прохождения митотического цикла и количеству делящихся клеток) обеспечивает компенсацию тех из них, которые переходят в гипертрофированное состояние и вместе с гиалиновым матриксом вовлекаются в периостальный и эндохондральный остеогенез. Поэтому реально влияет на интенсивность роста каждого скелетного элемента скорость трансформации (дифференцировки) хондроцитов от зоны пролиферации к зоне созревания и гипертрофии с одновременным формированием на основе такого хряща периостальной кости (рис. 35). Активация пролиферации хондроцитов в эпифизарных хрящах (либо за счёт сокращения продолжительности митотического цикла, либо увеличения пула размножающихся клеток) может обеспечить лишь повышение концентрации клеток, т. е. рост самих эпифизарных хрящей. Этот признак может быть косвенным показателям при оценке интенсивности роста коротких и длинных костей. Реальная же скорость роста кости как органа обеспечивается за счёт варьирования темпов созревания и гипертрофии хондроцитов.

Изменения функциональных и структурных признаков клеток при переходе к терминальной фазе дифференцировки (гидратация и гипертрофия) взаимосвязаны с продолжительностью митотического цикла хондроцитов, соотношением делящихся и неделящихся клеток (пролиферативный пул) и общим количеством клеток в этой зоне. Скорость размножения клеток в популяции может контролироваться разными генетическими механизмами, гуморальными и гормональными факторами. Может, например, блокироваться вхождение клеток в митотический цикл, однако его продолжительность не изменяется. Возможно увеличение продолжительности всего митотического цикла при постоянстве соотношения хондроцитов, которые делятся и не делятся. В таких случаях основным критерием для оценки значимости пролиферации хондроцитов в росте скелетных элементов может быть время удвоения размножающейся популяции клеток. Известно, например, что среди хондроцитов формирующегося суставного хряща снижение темпов размножения происходит как за счёт увеличения продолжительности митотического цикла, так и в результате уменьшения пула размножающихся клеток (Мажуга и др., 1993). Медленный же рост костей скелета конечностей человека происходит вследствие увеличения продолжительности митотического цикла хондроцитов эпифизарных хрящей до 20-25 сут при 100 %-ном пуле размножающихся клеток (Kember, Sisson, 1976). Поэтому при структурной идентичности хрящевых пластинок длинных и коротких костей скелета конечностей, в каждой из них эволюционно должен быть заложен эффективный механизм регулирования репродукции хондроцитов, имеющий разную чувствительность на действие гормональных и гуморальных систем контроля. Такая синхронизация процессов терминальной дифференцировки хондроцитов и темпов их размножения позволяет функционировать и сохраняться эпифизарным хрящам в коротких и длинных костях на протяжении всего периода линейного роста скелета. И лишь в ситуации, когда один из этих процессов начинает преобладать, происходит либо увеличение размеров зоны пролиферации и концентрации в ней хондроцитов, либо постепенное уменьшение структурных зон эпифизарного хряща и прекращение его функционирования как зоны роста кости (Byers, Moore, 2000).

Соотносительное развитие и рост скелетных закладок при участии эпифизарных хрящей регулируется несколькими механизмами: химическими факторами и гормонами; непосредственным контактом биостимуляторов с хондроцитами, пребывающими в разных фазах метаболической активности и дифференцировки; влиянием микроокружения на уровень проявления клетками хондрогенного фенотипа. Однако определяющим является генетический контроль их развития (Karsenty, 1998). Структурная конструкция эпифизарных хрящей в разных скелетных закладках формируется в соответствии с генетической программой развития каждого скелетного органа и обеспечивает их соотносительное увеличение при интегрированном действии на этот процесс всех общих и локальных систем контроля роста. При действии на хондроциты эпифизарных хрящей общих и локальных факторов (лиганды, гормоны, витамины) темпы их дифференцировки при продольном росте скелетных закладок могут отличаться (Silvestrini et al., 1999; Стойка и др., 2004; Рыбакова, 2007 и др.). Установлено, что увеличения массы тела, длины закладок осевого скелета и скелета свободных конечностей могут обеспечивать гормоны гипофиза и других эндокринных желёз (Robson et al., 2002). Так, при нарушении в гипофизе синтеза гормона роста происходит задержка развития. Это заболевание известно как гипофизарный нанизм, в результате которого пропорционально уменьшается масса всего тела, внутренних органов и скелета. Следовательно, карликовость является системным заболеванием всего организма. В этих условиях соотносительный рост скелета сохраняется и обеспечивается за счёт разной структуры зон пролиферации эпифизарных хрящей длинных и коротких костей и скорости терминальной дифференцировки хондроцитов. В эпифизарных хрящах присутствуют также локальные факторы контроля. Они функционируют в определённой мере независимо от внутреннего гомеостаза и окружающей среды, так как созданы всем ходом эволюционного развития животных и запускаются не случайными эндогенными или экзогенными факторами, а закономерной последовательностью развёртывания самого процесса скелетогенеза (Cubo, 2000). Можно считать, что эффективный механизм регулирования продольного роста скелетных закладок заключается в особенностях формирования структуры эпифизарных хрящей

длинных и коротких костей, которые уже в пренатальном онтогенезе, начинают отличаться размерами различных функциональных зон, концентрацией хондроцитов и количеством межклеточного матрикса, темпами их терминальной дифференцировки. Процессы, которые обеспечивают дифференцировку хондроцитов в эпифизарных хрящах, являются чувствительными к внутренним и внешним воздействиям, локомоторным нагрузкам и могут изменяться под их влиянием. Поэтому при всей структурной идентичности эпифизарных хрящей в трубчатых костях конечностей (длинные и короткие) они (кости) существенно отличаются темпами роста.

Каждому виду животных (или адаптивной форме) присущи свои особенности темпов и продолжительности роста скелетной системы, соотносительных размеров отдельных костей к массе тела, особенностям локомоции. Ширина пролиферативной и гипертрофических зон эпифизарных хрящей, а также длина и объём трабекул первичной губчатой кости в зонах замещения длинных и коротких костей отличаются. Эти взаимоотношения хондрогенной и остеогенной клеточных популяций уже подробно исследованы (Hunziken, 1989; Kuhn, 1996; Житников, Родионова, 2003). Установлено, что максимальное увеличение костной массы и трабекулярной конструкции в зонах замещения связано с метаболическими и репродуктивными свойствами хондроцитов эпифизарных хрящей и эти свойства клеток могут изменяться в зависимости от влияния антропогенных факторов на организм или изменения локомоторных нагрузок на костный орган. Известно, что скорость и соотносительность роста разных скелетных элементов контролируется и регулируется системными гормонами и другими факторами общего и локального действия (Hill, Logan, 1992; Nilsson et al., 1990; Wakita et al., 1998; Horner et al., 1999; Nakashima et al., 2002; Mikic et al., 2008). При недостаточности гормона роста в эпифизарных хрящах растущего скелета изменяются темпы размножения и дифференцировки хондроцитов и нарушается развитие на основе гиалинового матрикса эндохондральной и периостальной кости (Martha, Reiter, 1991).

Формирование в зонах роста коротких и длинных костей скелета свободных конечностей эпифизарных хрящей с высокой концентрацией хондроцитов происходит за счёт большего количества циклов репродукций клеток до перехода их 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 отстаёт, то концентрация клеток здесь постепенно снижается, а эпифизарные хрящи прекращают функционировать как структуры, обеспечивающие рост скелетных закладок (Byers, Moore, 2000). Гипертрофированного состояния созревающие хондроциты различных эпифизарных хрящей достигают за разный период времени. Эта особенность определяет интенсивность продольного роста костного диафиза, так как дифференцировка остеобластов периоста в зонах метафизов и удлинение костной диафизарной трубки происходит синхронно с переходом хондроцитов в гипертрофированное состояние (Житников, 2004 б; 2008; 2009). Поддерживать жизнеспособность такие клетки могут разное время, что зависит от интенсивности замещения хрящевой ткани костной со стороны эндоста (эндохондральный остеогенез). В зависимости от дефинитивных размеров скелетных элементов конечностей (длинные и короткие кости) для каждой из них в развитии характерны определённые темпы терминальной дифференцировки хондроцитов в эпифизарных хрящах и темпы дифференцировки остеогенных клеток, с участием которых формируется эндохондральная кость и растёт костный диафиз. При развитии костей в онтогенезе эти процессы синхронизированы по интенсивности и продолжительности, и их взаимодействие регулируется системными и локальными факторами (Wong, Carter, 1990; Wu Qiuqian et al., 2000; Robson, 2002; Mikic, 2008; Wiequang Wang et al., 2009). Такие взаимодействия формировались в эволюции при развитии целостного органа, обеспечивая его развитие в соответствии с генетической программой (Корочкин, 2002). В такую целостную систему клеточных взаимодействий может вклиниваться какой-либо экзогенный или эндогенный фактор, концентрация которого превышает физиологический порог. Этот фактор в состоянии ингибировать или активировать пролиферацию или метаболизм хондроцитов эпифизарных хрящей, нарушить минерализацию хряща или кости, изменить темпы гидратации и размеры гипертрофирующихся хондроцитов в зонах замещения. При этом нарушается генетически детерминированное развитие скелетных закладок и скелета в целом. Как примеры таких влияний можно рассматривать различные патологии при ахондроплазиях, гормональных дисбалансах, избытке или недостатке витаминов (Thurston, 1983; 1985; Wong et al., 1990; Mansfild, 1999; Silvestrini, 1999; Wakita et al., 1998; Chung et al., 2001; Лузин, Стклянина, 2005; Никитюк и др., 2007). Так, витамин А обеспечивает контроль состояния мембранных структур лизосом клеток, в которых сосредоточены протеазы и другие гидролитические ферменты. Этот витамин оказывает влияние на кислые протеазы, нарушая тем самым структуру мембран лизосом и других клеточных органоидов. При его недостатке в организме усиливается метаболическая активность клеток хряща и кости, что вызывает беспорядочный костный рост. Увеличивается также степень сульфатации гликозаминогликановой фракции основного вещества хряща, а содержание кальция и включение <sup>45</sup>Са снижается. В то же время избыток витамина А приводит к деструкции эпифизарных хрящей, сопровождающейся понижением концентрации сульфатированных гликозаминогликанов, снижением метаболической активности хондроцитов и остеобластов, уменьшением объёма костной массы в зонах периостального и эндохондрального остеогенеза. В таких условиях в эпифизарных хрящах зона пролиферации хондроцитов становится узкой (избыток витамина А ингибирует пролиферацию хондроцитов), а зона созревания более широкой, так как блокируется биосинтез гликозаминогликанов и продолжительность пребывания хондроцитов в таком состоянии увеличивается. При дефиците в организме животных витамина Д нарушается минерализация хряща, скорость созревания хондроцитов и темпы резорбции хряща в зонах замещения (Mansfild et al., 1999; Hall, 2005). Значительно шире становятся зоны созревания и гипертрофии, а формирующаяся периостальная кость подвергается деформации изза недостаточной минерализации. В продольных хрящевых перегородках матрикса эпифизарного хряща откладывается меньше солей кальция, а инвазия в лакуны с гипертрофированными хондроцитами со стороны эндоста кровеносных сосудов тормозится. Гипертрофию хондроцитов индуцирует также тироксин (Wakita et al., 1998). Таким образом, очевидно, что на каждую скелетную закладку, наряду с системными, действуют локальные факторы, обеспечивающие соотносительный рост. Определяющее значение для темпов роста скелетных элементов имеет скорость терминальной дифференцировки хондроцитов эпифизарных хрящей, размер этих клеток в зонах замещения хрящевой ткани костной.

В растущих закладках скелета замещение хряща костью происходит в условиях постоянно меняющейся функциональной активности хондроцитов и морфологической структуры эпифизарных хрящей. В закладках скелета постепенно уменьшаются размеры эпифизарных хрящей, снижается функциональная активность хондроцитов, и к моменту завершения физиологического роста животных эпифизарные хрящи как провизорные структуры исчезают, и в местах сочленения эпифизов и диафиза формируются костные синостозы. Терминальная дифференцировка хондроцитов в эпифизарных хрящах сопровождается усилением биосинтеза коллагеновых белков и глюкозаминогликанов — основных структурных компонентов межклеточного матрикса хряща. Биосинтез компонентов матрикса хряща преобладает в тех ростковых хрящах, где они обеспечивают интенсивный рост и морфогенез скелетного элемента. Продолжительность пребывания хондроцитов в состоянии активного биосинтеза,

когда клетка может нарабатывать белково-углеводные субстраты гиалинового матрикса, зависит от особенностей структуры эпифизарных хрящей, а именно концентрации (количества) клеток, располагающихся в них по длине закладки. Установлено, что в каждой скелетной закладке различных животных структуры эпифизарных хрящей с различным соотношением клеток и матрикса начинают формироваться ещё в период эмбриогенеза в результате генетически обусловленной взаимосвязи темпов репродукции и терминальной дифференцировки хондроцитов (Житников, 2007 а, б). Отличаться могут также размеры структурных зон дистального и проксимального ростковых хрящей (рис. 36). Более быстрый рост кости происходит при участии того росткового хряща (проксимального или дистального в зависимости от скелетного элемента), где зоны пролиферирующих и созревающих хондроцитов оказываются большими. Если бы интенсивность биосинтетической активности клеток одного морфологического типа в дистальных и проксимальных эпифизарных хрящах была бы одинаковой, то в матриксе росткового хряща быстро растущей части диафиза за время активного метаболического периода их функционирования (зона созревания) накапливалось бы меньше органических и минеральных субстратов; т. е. объём сформированного матрикса хряща у зоны замещения находился бы в обратной зависимости от скорости терминальной дифференцировки хондроцитов. Так как костно-хрящевые трабекулы в метафизе растущей кости, скорее всего, определяют её прочность в период активного роста, то при различной скорости этого процесса в зонах замещения формировались бы разные по массе эндохондральные структуры. Толщина хрящевых трабекул, которые сохраняются в зонах замещения и используются для формирования на их основе костной ткани, зависит от размеров зоны пролиферации, концентрации в ней хондроцитов и темпов роста костей конечностей. Теоретически возможно нарушить (замедлить) скорость перехода хондроцитов в гипертрофированное состояние, сохранив темпы пролиферации на прежнем уровне. В такой ситуации в «изогенных» группах будет увеличиваться количество хондроцитов, а сама зона становиться большей. Реально же эти процессы в зонах пролиферации взаимосвязаны с созреванием и гипертрофией хондроцитов и регулируются обратной связью при участии ряда морфогенов (Kodayahi et al., 2002; Kronenberg, 2006; Solomon et al., 2008). При физиологических параметрах развития различия в темпах роста диафиза с проксимального и дистального конца кости могут возникать по причине разной локомоторной активности костей растущего скелета конечностей. Они могут регулироваться цитокинами терминальной дифференцировки хондроцитов ростковых хрящей (Kronenberg, 2006; Solomon et al., 2008). В результате в зонах замещения при разных темпах и продолжительности роста костей формируются эндохондральные трабекулы такого объёма и количества, которые обеспечивают достаточную прочность кости для выполнения ею механической функции (опорной, локомоторной, рессорной, антигравитационной). Эпифизарные хрящи — это провизорные образования растущего скелета, в которых особенности размножения и терминальной дифференцировки хондроцитов создают метаболические и субстратные предпосылки для периостального и эндохондрального остеогенеза (Ballock, O'Keefe, 2003; Mackie, 2008). Концентрация хондроцитов в «изогенных» группах ростковых хрящей и интенсивность биосинтеза ими коллагеновых белков, гликопротеинов и протеогликанов влияют на объём гиалинового матрикса в зонах замещения. Чем продолжительнее хондроциты зоны созревания эпифизарных хрящей находятся в фазе интенсивной биосинтетической активности, не приобретая признаков набухших гипертрофированных клеток, тем медленнее осуществляется периостальный и энхондральный остеогенез и, следовательно, замещение хрящевой ткани костной. В зависимости от структуры «изогенных» групп хондроцитов (по одному в виде «монетных» столбиков или по 3-4 клетки поперёк длинной оси закладки) в зонах гипертрофии эпифизарных хрящей исследованных нами групп животных изменяется соотношение клеток и площади гиалинового матрикса. Продольно ориентированные фрагменты хрящевого матрикса, которые сохраняются после инвазии в лакуны с гипертрофированными хондроцитами кровеносных сосудов, являются субстратной основой для синтеза минеральных и органических компонентов костной ткани. Нами установлено, что в разных скелетных закладках одного животного общее количество и длина продольных костно-хрящевых трабекул в зонах замещения существенно отличается. Площадь (объём) хрящевого матрикса в зонах замещения, на основе которого формируется костная ткань, зависит от продолжительности пребывания хондроцитов в активной фазе специфических биосинтезов. Это определяет композицию хрящевых трабекул, на основе которых реализуется остеосинтез. Находиться же в гипертрофированном состоянии и поддерживать в какой-то мере метаболизм хондроциты могут разное время, что, в свою очередь, зависит от интенсивности энхондрального замещения в каждой конкретной скелетной закладке. При определённой корреляции биосинтетических процессов в хондроцитах эпифизарных хрящей и остеобластах эндоста, с одной стороны, и постоянном разрушении остеокластами энхондральных трабекул, с другой, в зонах замещения обеспечивается непрерывность их обновления, продольный рост и моделирование кости, а также объёмное увеличение костномозговой полости. Таким способом первичная губчатая кость в зоне метафизов обновляется и при интенсивном росте скелета (200-300 мкм/сут и более) она замещается новыми трабекулами в течение 3-4 сут. По этой же причине существенно варьирует длина эндохондральных трабекул в закладках скелета, отличающихся интенсивностью роста и замещения. В каждой из них эти структуры адаптированы к продолжительности и темпам роста, особенностям локомоторных и механических нагрузок на тот или иной скелетный орган. Состояние костно-хрящевых трабекул в зонах замещения (количество на единицу площади и масса) — это результат скоординированных по интенсивности метаболизма и репродукции хондроцитов эпифизарного хряща и остеобластов эндоста. Специфика такого метаболизма при дифференцировке хондроцитов определяет в конечном итоге состояние клеток и гиалинового матрикса, его дальнейшую роль и значимость при замещении хрящевой ткани костной. Установлено, что, если гиалиновый матрикс в зонах гипертрофированных хондроцитов остаётся неминерализованным, то он полностью разрушается со стороны эндоста одноядерными хондрокластами и костные трабекулы на основе хряща не формируются (Житников, 2011).

Первичная губчатая кость в скелете большинства млекопитающих формируется на основе фрагментов сохранившегося минерализованного гиалинового матрикса эпифизарного хряща, выполняющего в зоне замещения роль структуры, с участием и на основе которой осуществляется дифференцировка остеогенных клеток и остеосинтез. На уровне соединения хрящевого эпифиза с тонкой костью диафиза в зоне гипертрофированных хондроцитов эпифизарного хряща из-за их набухания и утончения межклеточных перемычек хрящевого матрикса существенно ослабляется механическая прочность кости в зоне роста. Поэтому её укрепление здесь происходит путём кальцификации матрикса, который может выполнять также роль индуктора остеогенной дифференцировки клеток, обеспечивающих формирования эндохондральной кости. Именно эндохондральная кость усиливает механическую прочность растущих элементов скелета конечностей по мере нарастания массы животных в процессе онтогенетического развития. Однако у большинства бесхвостых амфибий матрикс ростковых хрящей с гипертрофированными хондроцитами сохраняется неминерализованным, и на его основе не формируется эндохондральная кость. За счёт чего у этих животных достигается механическая прочность растущих костей скелета конечностей? По нашим данным, этому способствует специфическая структура эпифизарных хрящей. Они имеют обширные зоны гипертрофированных хондроцитов, которые находятся в тесном контакте с костью периоста (рис. 8). Их контакт с грубоволокнистой компактной костью диафиза обеспечивает растущей скелетной закладке необходимую механическую прочность в соответствии с увеличивающейся массой тела и локомоторной нагрузкой. В то же время неминерализованный матрикс хряща этой зоны растущего скелета конечностей земноводных полностью резорбируется хондрокластами и на его основе не формируется эндохондральная кость, что обеспечивает постоянное увеличение костномозговой полости.

В скелетных закладках птиц в течение значительного периода развития эмбрионов (до 17 сут) также происходит полная резорбция хряща, содержащего гипертрофированные хондроциты. Однако в последующем в пространстве между сосудистыми каналами сохраняются фрагменты уже минерализованного хрящевого матрикса с группами гипертрофированных хондроцитов и на этой основе формируется костная ткань. Наиболее типичным процессом при замещении является ситуация, когда в структуре эпифизарного хряща у зоны замещения сохраняются лишь продольно ориентированные фрагменты межтерриториального кальцинированного гиалинового матрикса, а поперечные перемычки неминерализованного хряща между хондроцитами в пределах «изогенных» групп разрушаются хондрокластами с одновременным врастанием в лакуны капиллярных сетей. Такой кальцинированный матрикс хряща вместе с локальными морфогенами может быть индуктором дифференцировки остеогенных клеток-предшественников в зоне замещения (Ulici et al., 2008). Объём и количество гиалиновых трабекул хряща, вовлекаемых для синтеза на их основе костной субстанции в зоне замещения, варьирует в зависимости от пролиферативной и биосинтетической активности хондроцитов, их концентрации в эпифизарных хрящах и скорости терминальной дифференцировки. Взаимосвязь всех этих процессов в эпифизарных хрящах определяет конструкцию первичной губчатой кости, одной из функций которой в метафизах растущих закладок скелета является сохранение достаточной прочности при различных механических и силовых нагрузках.

Структура первичной губчатой кости — лабильное образование и постоянно подвергается коррекции в зависимости от локомоторных и механических нагрузок, действующих на каждую растущую скелетную закладку передних или задних конечностей. Этому способствует также интегрированное влияние на поддержание морфотипа гуморальных, эндокринных и локальных систем контроля, значимость которых возрастает в постнатальном онтогенезе. Рост костного диафизарного стержня в длину и увеличение толщины кости взаимосвязаны и обеспечиваются пролиферацией и дифференцировкой в остеобласты клеток-предшественников. У молодых растущих животных трабекулы и кортикальная кость диафиза становятся более толстыми за счёт периостального и эндостального формирования. При этом одновременно с биосинтезом со стороны эндоста субстратов костной ткани происходит и её резорбция, обеспечивая расширение костномозговой полости и ремоделирование кости в соответствии с действием механических факторов. Существенно то, что внутренние процессы делают возможным увеличение объёма хондроцитов при терминальной дифференцировке, синтез межклеточного матрикса хряща и кости и содействуют развитию растущей кости. В то время как внешние биофизические силы направлены на то, чтобы оказать сопротивление расширению кости в её функциональных пределах, включающих внутреннюю трабекулярную конструкцию и внешнюю форму (Forriol, Shapiro, 2005). Регуляторные механизмы, обеспечивающие изменение морфогенеза и темпов роста длинных костей при механических нагрузках, следует искать в сложных взаимодействиях эпифизарных хрящей с периостальным и эндохондральным остеогенезом. Они, возможно, подобны механизмам, лежащим в основе нормального физиологического регулирования морфогенеза и роста скелета на различных этапах онтогенеза (Nilsson, 2005; Kronenberg, 2006). Хондроциты ростковых хрящей синтезируют также ряд морфогенных белков при терминальной дифференцировке, которые могут изменять их функциональную активность и регулировать минерализацию матриксе хряща (Tsumaki,Yoshikawa, 2005). Было установлено, что появление участков кальцинированного хряща в скелетных закладках млекопитающих совпадает с накоплением в зоне гипертрофированных хондроцитов коллагена типа X и активностью щелочной фосфомоноэстеразы (Anderson, Shapiro, 2010). При этом активность фермента и появление очагов минерализации могут не совпадать по времени (Felisbino, Carvalho, 2001), что подтверждают и наши данные (Житников, 2012 a, 6). На инициацию процесса кальцификации матрикса хряща оказывают влияние и металлопротеиназы-3, -9 и -13, которые были обнаружены в этих зонах (Reich, 2010). При их отсутствии индуктором минерализации может быть надхрящница или компактная кость периоста. По всей вероятности, в этот период развития скелетных закладок клетки периоста и костной ткани выделяют факторы, которые ускоряют дифференцировку хондроцитов и обеспечивают минерализацию матрикса хряща в участках, граничащих с ними. Такая локальная кальцификация матрикса хряща наблюдалась нами при развитии скелетных элементов курицы (Житников, 2012 б).

Результаты, полученные различными исследователями, дают некоторое представления относительно того, как варьирование нагрузки (растяжение или давление) преобразовывается во внутриклеточные метаболические процессы, и о сигнальных молекулах, которые обеспечивают изменения в функции пластинки роста под влиянием нагрузки. Длительное давление на ростковый хрящ затрагивает как пролиферацию и гипертрофию хондроцитов, так и их форму. Было обнаружено, что в ростковых хрящах уменьшалось количество и соотношение пролиферирующих хондроцитов, изменялась структура колонок хондроцитов (Farnum, Wilsman, 1998; Farnum et al., 2000). По данным Стоукс (Stokes et al., 2007), изменения в темпах роста костей при нагрузке были связаны с количеством пролиферирующих и гипертрофированных хондроцитов эпифизарных хрящей. При увеличении давления на пластинку роста становились тоньше зоны пролиферации и гипертрофии. При этом пластинка роста уменьшалась, но не исчезала, так как продолжалась пролиферация и гипертрофия хондроцитов. Наоборот, при длительном отсутствии давления на пластинку роста (или её натяжение) происходило её значительное утолщение, но темпы пролиферации хондроцитов не изменялись (Alberty et al., 1993; Apte, Kenwright, 1994). В этих условиях увеличение толщины пластинки роста происходило в основном за счёт количества хондроцитов, их высоты и объёма в зоне гипертрофии (Apte, Kenwright, 1994; Farnum, Wilsman, 1998; Ohashi et al., 2002; Stokes et al., 2002). По данным Виллемур (Villemure et al., 2005), при давлении на пластинку роста изменяется распределение коллагена II типа главным образом в верхней части гипертрофической зоны и коллагена Х типа в нижней части этой зоны (ближе к зоне замещения). Эти изменения потенциально могут отражаться на состоянии внеклеточного матрикса гипертрофичнской зоны хряща, как ключевом компоненте, который реагирует на механическую нагрузку. По данным Рейч (Reich et al., 2005, 2008), в пластинках роста костей конечностей цыплят при нагрузке дополнительным весом происходит экспрессия обоих типов коллагенов. В то же время Кансел (Cancel et al., 2009) не обнаружили существенных изменений в экспрессии мРНК для коллагенов типа II и X после длительного сжатия хвостовых позвонков крыс. Однако при использовании ими метода иммуноокрашивания количество обоих типов коллагеновых белков при давлении снижалось на 83 %. По данным исследователей, это могло быть связано с повыщением активности матриксного фермента ММР-3. Исследователи предположили три возможных объяснения причин таких изменений: 1) мРНК коллагена не участвовала в синтезе белка; 2) продолжительность жизни мРНК могла быть уменьшена; 3) нагрузка могла повредить коллагеновые фибриллы. Другие металлопротеазы, связанные с инвазией сосудов в зону метафиза, имели умеренную концентрацию (ММР-2) или значительно увеличенную (ММР-9) при продолжи-

59

тельном давлении на пластинку роста (Reich et al., 2005). При дополнительной нагрузке на скелет конечностей цыплят количество сосудов, проходящих через зону метафиза, было большим, чем в норме. Танг и Mao (Tang, Mao, 2006) после циклической нагрузки на сжатие не обнаружили каких-либо изменений в экспрессии генов, регулирующих биосинтез протеогликановых молекул матрикса хряща. При непродолжительной нагрузке оставалась без изменений экспрессия мРНК для рецептора паращитовидной железы (PTHrP), который вовлечён в петлю обратной связи с Indian Hedgehog (IHH). Основываясь на этих данных, Виллемур с соавторами (Villemure et al., 2005) предположили, что процесс дифференцировки хондроцитов эпифизарных хрящей не чувствителен к действию непродолжительного давления. Исследовали также активность и распределение других морфогенов, имеющих отношение к замещению хрящевой ткани костной и морфогенезу скелетных закладок. Установлено, что при длительном давлении на эпифизарные хрящи повышалась активность мРНК и уровень белка остеопонтина и щелочной фосфомоноэстеразы, участвующих в оссификации хряща и кости (Reich et al., 2005, 2008). Содержание остеопонтина было повышено в зоне гипертрофированных хондроцитов и в зоне замещения. По мнению исследователей, это предполагает усиление и ускорение оссификации при увеличении давления на растущую кость. Полученные в наших исследованиях данные с учётом изложенной выше информации позволяют также предположить, что прочностные свойства и функциональные возможности длинных костей конечностей разных групп позвоночных животных достигаются в онтогенезе за счёт усиления кальцификации матрикса хряща и увеличения относительного количества компонентов эндохондральной кости в зонах метафизов. Такая конструкция является важной составляющей при моделировании длинных костей, обеспечивая им достаточную прочность в зонах роста на границе эпифизов и диафиза (метафизы), где только начинает формироваться периостальная кость (Житников, 2013). Следовательно, повышение локомоторной подвижности плодов и усиление механической и гравитационной нагрузки на скелет конечностей после рождения животных могут активировать локальные регуляторные системы в зонах его роста и моделирования, которые обеспечивают интенсивную минерализацию хряща с гипертрофированными хондроцитами и усиливают конструкцию костей за счёт эндохондрального остеогенеза. На изменение темпов роста скелетных элементов и варьирование структуры ростковых хрящей, количества и толщины эндохондральных трабекул в зонах замещения хрящевой ткани костной в постнатальном онтогенезе животных оказывает влияние окружающая среда, её антропогенные факторы, характер двигательной активности, гравитационная и механическая нагрузка на скелет (Odgren et al., 2003; Niehoff et al., 2004; Mackie et al., 2008; Reich et al., 2008; Cancel et al., 2009; Житников, 2012; Hoon Park et al., 2012).

Таким образом, имеющиеся в настоящее время молекулярно-генетические, биохимические данные, с дополненными нами гистологическими, авторадиографическими и гистохимическими исследованиями развития, роста и моделирования скелетных закладок конечностей амфибий, птиц и млекопитающих, позволяют заключить, что поэтапная дифференцировка хондроцитов в сочетании с периостальным остеогенезом определяют моделирование и поперечно-продольный рост длинных костей. Однако специфические условия и продолжительность развития животных разных видов в пре- и постнатальном онтогенезе, масса их тела и длина звеньев скелета, характер локомоторных нагрузок (прыжки, бег, плавание) и амплитуда движений скелета конечностей вносят определённые метаболические нюансы в этот процесс и морфологические структуры ростковых хрящей. Интенсивность и продолжительность биосинтезов, пролиферативные свойства хондроцитов в клетках одного морфологического типа определяют состояние структуры и её последующую роль при взаимодействии ростковых хрящей и костной ткани. Гистологическая конструкция каждого росткового хряща по соотношению клеток и гиалинового матрикса, по количеству, форме и размерам хондроцитов отражает их роль в продольном росте скелетной закладки, в темпах и масштабности замещения хрящевой ткани костной. Этот процесс осуществляется при интегрированной взаимосвязи темпов и интенсивности метаболизма и репродукции хондроцитов, остеобластов, хондро- и остеокластов. В результате формируется скелетная закладка определённого морфологического типа, обеспечивающая выполнение локомоторной функции в конкретных условиях взаимодействий животного с окружающей средой, т. е., по существу, реализуется генотип развития.

Можно предположить, что количественные изменения структуры ростковых хрящей и эндохондральных трабекулярных конструкций являются результатом молекулярных и клеточных процессов, происходящих в период эмбрионального и постнатального развития скелета. Гетерохронность морфогенеза и формообразования различных костей у каждого животного и у животных разных отрядов, классов подразумевает формирование в каждой из них определённой структуры росткового хряща, который в состоянии обеспечить для растущей кости выполнение конкретных локомоторных и механических функций. Регуляторами этих процессов выступают морфогены дифференцировки хондроцитов. Первичная структура ростковых хрящей изначально определяется генотипом развития и в пренатальном онтогенезе гомологичных костей одного вида животного их морфотип повторяется в каждом поколении. Этому способствует также интегрированное влияние гуморальных, эндокринных и локальных систем контроля, значимость которых возрастает в постнатальном онтогенезе (Tryfonidou et al., 2010).

В постнатальный период развития скелета в структурную композицию эпифизарных хрящей и костей конечностей животных разных классов существенный вклад вносят изменяющаяся масса тела, продолжительность их роста и особенности двигательной активности. Их влияние сказывается на таких процессах, как темпы размножения и количество делящихся хондроцитов эпифизарных хрящей, интенсивность и продолжительность синтеза белково-углеводных компонентов межклеточного матрикса при терминальной дифференцировке, скорость их созревания и последующая гипертрофия, на уровне минерализации хрящевой ткани в зонах её замещения костной.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Хрящевые закладки личинок лягушки и эмбрионов кур длительный период растут за счёт гипертрофии хондроцитов ростковых хрящей и периостального остеогенеза без формирования костномозговой полости, обеспечивая лишь продольное моделирование скелетных элементов. Темпы роста и скорость терминальной дифференцировки хондроцитов ростковых хрящей гомологичных костей отличаются у этих животных в 10 раз.

2. На всех этапах личиночного и после метаморфозного развития скелета конечностей безхвостых амфибий ростковые хрящи не кальцинированы и на их основе не формируется эндохондральная кость. В зонах замещения происходит только резорбция хряща, содержащего гипертрофированные хондроциты и продольное увеличение костномозговой полости. Постепенно минерализуется обширная поверхность глубокой зоны суставного хряща. Эти особенности можно рассматривать как механизм адаптации скелета безхвостых амфибий к локомоторным нагрузкам с большой амплитудой движений от состояния покоя, при котором колени сильно согнуты, до плавания и прыжков.

3. Отсутствие кровеносных сосудов в зонах минерализации суставного хряща длинных костей безхвостых амфибий свидетельствует о том, что локальное накопление ионов кальция и фосфатов, необходимых для формирования кристаллов гидроксиапатита, не зависит от кровоснабжения.

4. Можно предположить, что резорбция хряща, формирование костномозговой полости и очагов гемопоэза в костях личинок амфибий и эмбрионов птиц инициируется, когда усиливается органогенез и увеличивается масса тела. В этих условиях эмбриональные источники кроветворения (печень, селезёнка, желточный мешок и др.) уже не могут удовлетворить потребность растущих эмбрионов в энергетических и пластических субстратах.

5. При формировании ростковых хрящей и замещении хрящевой ткани костной в костях амфибий и птиц проявляются следующие особенности:

— зоны с гипертрофированными хондроцитами в ростковых хрящах скелета длительный период остаются неминерализованными, а резорбция матрикса при формировании костномозговой полости осуществляется мононуклеарными клетками с кластическими свойствами;

— появление многоядерных хондрокластов и синтез органических компонентов костной ткани в скелетных закладках птиц взаимосвязан с отложением фосфата кальция в матриксе росткового хряща с гипертрофированными хондроцитами. Этот процесс может инициировать в зонах замещения дифференцировку многоядерных хондрокластов и остеобластов;

— интенсивный рост костей скелета птиц сопровождается появлением в зонах гипертрофированных хондроцитов эпифизарных хрящей большого количества хрящевых каналов с находящимися в них кровеносными сосудами, гемопоэтическими и остеогенными клетками. Они достигают зоны пролиферирующих хондроцитов, обеспечивая поступление энергетических и пластических субстратов, формирование на основе хряща костной ткани и моделирование костного диафиза;

— в ростковых хрящах костей конечностей птиц происходит минерализация матрикса с гипертрофированными хондроцитами, в результате чего усиливается их конструкция в зонах роста за счёт интенсификации эндохондрального остеогенеза, что является реакцией на возрастающую локомоторную и гравитационную нагрузку после рождения.

6. Соотносительная скорость роста и длина коротких и длинных костей у животных обеспечивается регулированием в эпифизарных хрящах количества хондроцитов в зонах пролиферации, последующей частоты их деления, скорости терминальной дифференцировки и размеров при гипертрофирофии. В процессе постнатального онтогенеза происходит постепенное снижение этих параметров в эпифизарных хрящах и темпов роста коротких и длинных костей.

7. У животных разных классов интенсивность биосинтеза коллагенового белка, протеогликанов, гликопротеинов и гликогена в хондроцитах зон созревания эпифизарных хрящей коротких и длинных костей отличается. Установлена структурно-метаболическая взаимосвязь между уровнем биосинтеза хондроцитами эпифизарных хрящей сульфатированных гликозаминогликанов, темпами их терминальной дифференцировки и скоростью роста костей.

8. Регулирование соотношения клеток и матрикса в эпифизарных хрящах коротких и длинных костей происходит за счёт разной интенсивности метаболизма хондроцитов и темпов их структурной трансформации в гипертрофированное состояние. В каждом эпифизарном хряще размер гипертрофированных хондроцитов может изменяться в зависимости от структурированности воды в межклеточном матриксе, гидрофильные свойства которого определяются концентрацией хондроитинсульфатов и гликопротеинов разной молекулярной массы.

9. Уровень биосинтетической активности созревающих хондроцитов эпифизарных хрящей длинных и коротких костей запрограммирован генетически и реализуется в процессе онтогенеза, обеспечивая рост каждой скелетной закладки в условиях системного, интегрированного контроля развития животных.

10. Адаптацию скелета конечностей к различным режимам локомоции (к полёту, прыжкам и передвижению по суше) обеспечивают специфические особенности кальцификации матрикса ростковых хрящей и эндохондрального замещения хряща костью. Функциональная интеграция растущих скелетных элементов конечностей к локомоторной и механической нагрузке достигается при разной интенсивности кальцификации матрикса хряща в зонах роста и варьирования объёма и относительной концентрации эндохондральных трабекул в местах соединения эпифизов и диафиза. Структура первичной губчатой кости — лабильное образование и может постоянно подвергаться коррекции в зависимости от локомоторных и механических нагрузок, действующих на каждую растущую скелетную закладку передних или задних конечностей.

11. Усиление на заключительном этапе эмбриогенеза кальцификации матрикса хряща в зонах роста и формирование на его основе эндохондральной кости делают более прочными скелетные закладки в местах соединения диафиза и эпифизов по мере возрастания массы тела, локомоторной активности плодов и опорно-силовой нагрузки на скелет конечностей после рождения.

12. Прочностные свойства костей конечностей разных групп позвоночных животных достигаются в онтогенезе за счёт усиления кальцификации матрикса хряща с гипертрофированными хондроцитами и увеличения относительного количества компонентов эндохондральной кости в зонах метафизов. Такая конструкция является важной составляющей при моделировании длинных костей, обеспечивая им достаточную прочность на границе эпифизов и диафиза (метафизы), где только начинает формироваться периостальная кость. 13. Механическая нагрузка, возникающая в связи с усилением опорно-двигательной активности в послеродовой период развития животных, может стимулировать структурно-метаболические изменения в эпифизах и способствует формированию вторичных центров окостенения в длинных костях конечностей. Изменение направленности метаболизма хондроцитов, формирующих резервную зону эпифизарных хрящей, ограничивает эндохондральный процесс в направлении диафиза и обеспечивает сохранение ростковых хрящей в течение всего периода роста скелета.

14. Взаимоотношения репродукции, метаболизма и скорости терминальной дифференцировки хондроцитов предопределяют структуру формирующихся в эмбриогенезе эпифизарных хрящей и эндохондральных трабекул в зонах замещения хрящевой ткани костной. Они определяют также потенциальные возможности роста костей по продолжительности и интенсивности, их прочностные свойства у животных с разной массой, механической и локомоторной нагрузкой на скелет.

15. Функциональная интеграция опорно-двигательного аппарата передних конечностей летучих мышей для обеспечения полёта включает в себя разную скорость роста и моделирования костей в пре- и постнатальном онтогенезе. Эти различия проявляются в структурных особенностях ростковых хрящей. Сохраняюшиеся после рождения летучих мышей обширные эпифизарные хрящи в дистальных отделах лучевой и метакарпальных костей обеспечивают животным в условиях становления полёта необходимое распределение нагрузки на скелет передних конечностей и более продолжительный рост. Обладая гибкостью и эластичностью, такие структуры усиливают аммортизационные свойства скелета крыла и одновременно могут являться индукторами роста летательной перепонки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Бруско А. Т., Гайко Г. В.* Функциональная перестройка костей и ее клиническое значение. Луганск, 2005. 211 с.
- *Грушко М. П., Хвостова С. В.* Особенности строения органов кроветворения в личиночный период развития земноводных // Морфология. 2011. **140**, № 5. С. 38.
- Гайко Г. В., Калашников Ал. В., Апуховская Л. И., Бруско А. Т. Влияние разных доз витамина Е на метаболизм и структурно-функциональное состояние костной и хрящевой тканей в условиях экспериментального алиментарного D-гиповитаминоза // Укр. морфол. альманах. 2007. 5, № 2. С. 19–24.
- Гортинская О. М. Морфологічні зміни епіфізарного хряща кісток скелету в умовах циркуляторної гіпоксії та дії несприятливих екологічних чинників // Укр. морфол. альманах. 2005. 3, № 2. С. 27–31.
- Епифанова О. И, Терских В. В., Захаров А. Ф. Радиоавтография. М. : Наука, 1977. 246 с.
- Житников А. Я. Кинетика пролиферации хондроцитов хрящевых закладок и формирующегося метаэпифизарного хряща скелета конечностей млекопитающих // Архив анат., гистол., эмбриол. — 1976. — № 2. — С. 74–81.
- Житников А. Я. Морфология хондрогенеза и кинетика репродукции хондроцитов скелета конечностей Rana temporaria // Докл. АН Украины. Сер. Б. — 1980. — № 7. — С. 74–78.
- Житников А. Я. Кинетика пролиферации и метаболизм хондроцитов в эпифизарных хрящах скелета в условиях избытка гидрокортизона // Укр. медичний альманах. — 1998. — № 2. — С. 85–87.
- *Житников А. Я.* Динимика дифференцировки ДНК—синтезирующих хондроцитов эпифизарных хрящей растущего скелета // Проблеми зооінженерії та ветер. мед. : 36. наук. праць. 2001. Вип. 8, ч. 2. С. 69–74.
- *Житніков А. Я.* Формування скелетних закладок кінцівок у пренатальному періоді онтогенезу деяких хребетних // Вісн. Білоцерків. аграр. ун-ту. 2003. Вип. 25, ч. 1. С. 116–123.
- Житников А. Я. Структурно—метаболические взаимодействия клеток и матрикса в зонах замещения растущих костей при избытке в организме гидрокортизона // Таврический медико-биол. вестник. 2004 а. 7, № 4. С. 163–167.
- Житников А. Я. Особенности ростовых процессов в закладках скелета в зависимости от скорости терминальной дифференцировки хондроцитов // Вісник Львівської держ. ветер. академії. — 2004 б. — **6**, № 1. — С. 39–46.
- Житников А. Я. Роль эпифизарных хрящей в формировании структуры первичной губчатой кости в зонах замещения растущих закладок скелета // Проблеми зооінженерії та ветер. мед. : Зб. наук. праць. 2006. Вип. 13 (38), ч. 2. С. 69–79.
- Житников А. Я. Морфологическая гетерохронность ростковых хрящей при развитии коротких и длинных костей свободных конечностей некоторых позвоночных // Укр. морфол. альманах. 2007 а. 5, № 2. С. 32–37.
- Житников А. Я. Зона пролиферации эпифизарного хряща костей конечностей животных с разными темпами и продолжительностью роста // Вісн. ортоп., травматол. та протезування. 2007 б. № 3. С. 69–72.
- Житников А. Я. Кинетика пролиферации хондроцитов в зонах роста коротких и длинных костей конечностей белых крыс и летучих мышей (рыжая вечерница) // Укр. морфол. альманах. — 2008. — **6**, № 2. — C. 97–102.
- Житников А. Я. Особенности размножения хондроцитов в зонах роста коротких и длинных костей амфибий и птиц // Укр. журн. экстрем. медицины. 2009. 10, № 2. С. 125–128.
- *Житников А. Я.* Кинетика пролиферации и обновления хондроцитов в росткових хрящах скелета конечностей крыс и летучих мишей (nyctalus noctula) // Вісн. проблем біол. та мед. — 2011. — 2, вип. 2. — С. 83–86.
- Житников А. Я. Продольный рост, поперечное моделирование и минерализация в ростковых хрящах длинных костей конечностей амфибий (Rana temporaria) // Укр. морфол. альманах. — 2012 а. — 10, № 1. — С. 24–28.

- Житников А. Я. Формирование ростковых хрящей и особенности их кальцификации в растущих длинных костях курицы (gallus domesticus) // Укр. морфол. альманах. — 2012 б. — 10, № 3. — С. 39–45.
- *Житников А. Я.* Функциональная роль и распределение эндохондральных трабекул в зонах замещения растущего скелета // XXVII Любищевские чтения. Ульяновск, 2013. С. 113–122.
- Житников А. Я., Родионова Н. В. Субституция хряща костью в растущем скелете // Вісн. проблем біол. та мед. — 2003, № 1. — С. 16–19.
- Киселёва А. Ф., Житников А. Я., Медвецкий Е. Б. и др. Морфофункциональные методы исследования в норме и при патологии. Киев : Здоровье, 1983. 168 с.
- Ковешников В. Г., Фролов С. А., Кащенко В. М. Рост, строение и формообразование костей скелета белых крыс после иммуностимуляции // Укр. морфол. альманах. 2005. **3**, № 1. С. 25–29.
- *Ковтун М.* Ф. Строение и эволюция органов локомоции рукокрылых. К. : Наук. думка, 1984. 304 с.
- Ковтун М. Ф., Житников А. Я. Кинетика пролиферации и метаболизм хондроцитов хрящевых закладок растущей грудной конечности рыжей вечерницы // Вестн. зоологии. 1995. № 2. С. 78–85.

Корочкин Л. И. Биология индивидуального развития. — М. : МГУ, 2002. — 264 с.

- *Лисков А. В.* Механизмы регуляции остеогенеза // Анналы травматологии и ортопедии. 2001. № 2. С. 70–76.
- Лузин В. И., Стклянина Л. В. Особенности прочности костей скелета неполовозрелых крыс в условиях действия повышенного содержания глюкокортикоидов и золендроновой кислоты // Укр. морфол. альманах. 2005. **3**, № 1. С. 89–91.
- Мажуга П. М., Хрисанфова Е. Н. Проблемы биологии человека. Киев : Наук. думка, 1980. 327 с.
- *Мажуга П. М., Житников А. Я., Ницевич Т. П.* Развитие скелета конечностей у наземных позвоночных. Киев : Наук. думка, 1993. 183 с.
- *Миташов В. И.* Генетические механизмы трансдифференцировки клеток // Онтогенез. 2005. **36**, № 4. С. 292–299.
- *Миташов В. И.* Экспрессия регуляторных и тканевоспецифических генов, контролирующих регенерационные потенции тканей глаза позвоночных // Онтогенез. — 2007. — **38**, № 4. — С. 244–253.
- Никитюк И. А., Попов И. В., Полянский В. А., Дудкин В. И. Структура хряща метаэпифизарных пластинок роста в условиях полной изоляции от клеточно—гуморальных воздействий при пересадке в мягкие ткани (экспер. исследование) // Морфология. — 2007. — **131**, № 3. — С. 45–49.

Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. — М. : Иностр. л-ра, 1962. — 962 с.

- Родионова Н. В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе. Киев : Наук. думка, 1989. 186 с.
- Рыбакова Е. Ю. Исследование влияния ряда регуляторных белков на репаративные процессы в коже и кости позвоночных // Онтогенез. 2007. **38**, № 4. С. 317–318.
- Садофьев Л. А., Подгорная О. И. Дифференцировка остеогенных клеток в культуре // Цитология. 1999. **41**, № 10. С. 876–885.
- Серов О. Л. Генный и хромосомный контроль развития // Онтогенез. 2004. 35, № 4. С. 245-253.
- Стойка Р. С., Панчук Р. Р., Стойка Б. Р. Полипептидные факторы роста в процессах эмбрионального развития и опухолевого роста // Онтогенез. 2004. **35**, № 4. С. 254–272.
- Фатхутдинов Т. Х. Стимуляция репаративного остеогенеза при ксенотрансплантации перинатальных мезенхимальных стволовых клеток и хондробластов человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. № 2. С. 75-83.
- *Юровицкий Ю. Г., Кривопижин И. П., Мильман Л. С.* Ферменты обмена гликогена в печени эмбриона цыпленка // Биохимия. 1978. **43**, № 9. С. 1602–1615.
- *Abad, V., Meyers, J., Weise, M. et al.* The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis // Endocrinology. — 2002. — **143**, N 4. — P. 1851–1857.
- *Adams, S. L., Cohen, A. J., Lassova, L.* Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation // J. Cell Physiol. 2007. **213**, N 3. P. 635–641.
- Adams, R. A. Morphogenesis in bat wings: linking development, evolution and ecology // Cell Tissues Organs. — 2008. — 187, N 1. — P. 13-23.
- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y. et al. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation // Genes & Development. — 2004. — 18, N 9. — P. 1072–1087.
- *Alberty, A., Peltonen, J., Ritsila, V.* Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits // Acta Orthop. Scand. — 1993. — **64**, N 4. — P. 449–455.
- *Ali, S. Y.* Calcification of cartilage // Cartilage. Structure, Function and Biochemistry / Ed. B. K. Hall. New York ; London : Academic Press, 1983. 1. P. 343–378.
- Andrade, A. C., Nilsson, O., Barnes, K. M., Baron, J. Wnt gene expression in the post-natal growth plate: Regulation with chondrocyte differentiation // Bone. 2007. 40, N 5. P. 1361–1369.
- *Anderson, H. C., Sipe, J. B., Hessle, L. et al.* Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice // Am. J. Pathol. 2004. **164**, N 3. P. 841–847.
- *Anderson, H. C., Garimella, R., Tague, S. E.* The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization // Frontiers in Bioscience. 2005. **10**. P. 822–837.

- Anderson, H. C., Shapiro, I. M. The epiphyseal growth plate // Bone and Development. Topic in Bone Biology / Eds Bronner et al. — London : Springer-Varlag, 2010. — **6**. — P. 39–64.
- *Apte S. S., Kenwright J.* Physeal distraction and cell proliferation in the growth plate // J. Bone Joint. Surg. Br. 1994. **76**, N 5. P. 837–843.
- Bachrach, N. M., Valhmu, W. B., Stazzone, E. et al. Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment // J. Biomech. — 1995. — 28, N 12. — P. 1561–1569.
- Ballock, R. T., O'Keefe, R. J. Physiology and pathophysiology of the growth plate // Birth Defects Research. Part 1: Clinic. Molec. Teratology. — 2003. — 69, N 2. — P. 123–143.
- Bex, M., Bouillon, R. Growth hormone and bone health // Horm. Res. 2003. 60, Suppl. 3. P. 80-86.
- Blunk, T., Sieminski, A. L., Gooch, K. J. Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage // Tissue Eng. — 2002. — 8. — P. 73–84.
- Bluteau, G., Julien, M., Magne, D. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes // Bone. – 2007. – **40**, N 3. – P. 568–576.
- *Bonnel, F., Peruchon, E., Baldet, P. et al.* Effects of compression on growth plates in the rabbit // Acta Orthop. Scand. 1983. 54, N 5. P. 730–733.
- *Buckwalter, J. A., Rosenberg, L. C., Ungar, R.* Change in proteoglycan aggregates during cartilage mineralization // Calcified Tissue Int. 1987. **41**, N 4. P. 228–236.
- *Byers*, *S., Moore, A.,* Quantitative histomorphometric analysis of the humen growth plate from birth to adolescence // Bone. — 2000. — **27**, N 4. — P. 495–501.
- *Bylski-Austrow, D. I., Wall, E. J., Rupert, M. P. et al.* Growth plate forces in the adolescent human knee: a radiographic and mechanical study of epiphyseal staples // J. Pediatr. Orthop. 2001. 21, N 6. P. 817–823.
- *Cancel, M., Grimard, G., Thuillard-Crisinel, D. et al.* Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix // Bone. 2009. 44, N 2. P. 306–315.
- *Carter, D. R., Wong, M.* Mechanical stresses and endochondral ossification in the chondroepiphysis // J. Orthop. Res. 1988. 6, N 1. P. 148–154.
- Chen, C. C., Boskey, A. L., Rosenberg, L. C. The inhibitory effect of cartilages proteoglycans on hydroxyapatite growth // Calcif. Tissue Int. 1984. **36**, N 3. P. 285–290.
- Chung, U., Schipani, E., McMahon, A. P. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development // J. Clin. Invest. — 2001. — 107. — P. 295–304.
- Cohen, B., Chorney, G. S., Phillips, D. P. et al. Compressive stress-relaxation behavior of bovine growth plate may be described by the nonlinear biphasic theory // J. Orthop. Res. — 1994. — 12, N 6. — P. 804–813.
- *Cooper, L. N., Cretekos, C. J., Searls, K. E.* The evolution and development of mammalian flight // Wiley Interdiscip Rev. Dev. Biol. — 2012. — **1**, N 5. — P. 773–779.
- *Cooper, K. L., Oh, S., Sung, Y. et al.* Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions // Nature. 2013. **21**, N 495 (7441). P. 375–378.
- Cubo, J. Process heterochronies in endochondral ossification // J. Theor. Biol. 2000. 205. P. 343–353.
- D'Angelo, M., Billing, P. C., Pacifici, M. et al. Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases (MMP). A role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta // J. Biol. Chem. — 2001 a. — 276, N 14. — P. 11 347–11 353.
- D'Angelo, M., Sarment, D. P., Billing, P. C., Pacifici, M. Activation of transforming growth factor beta in chondrocytes undergoing endochondral ossification // J. Bone Miner. Res. — 2001 6. — 16, N 12. — P. 2339– 2347.
- Dell'Orbo, C., Gioglio, L., Quacci, D. Morphology of epiphyseal apparatus of a ranid frog // Histol. Histopaphol. 1992. 7. P. 267–273.
- Dickson, R. G. Ultrastructure of growth cartilage in the proximal femur of the frog, Rana temporaria // J. Anat. 1982. 135. P. 549–564.
- Dziewiatkowski, D. D., Majznerski, L. L. Role of proteoglycans in endochondral ossification: inhibition of calcification // Calcif. Tissue Int. 1985. 37, N 5. P. 560–564.
- *Eastell, R.* Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche // J. Endocrinol. 2005. **185**, N 2. P. 223–234.
- *Eerden, van der B. C., Karperien, M., Wit, J. M.* Systemic and local regulation of the growth plate // Endocr. Rev. – 2003. – **24**, N 6. – P. 782–801.
- *Ehlen, H. W., Buelens, L. A., Vortkamp, A.* Hedgehog signaling in skeletal development // Birth Defects Res. C : Embryo Today. 2006. **78**, N 3. P. 267–279.
- *Ehrlich, M. G., Mankin, H. J., Treadwell, B. V.* Biochemical and physiological events during closure of the stapled distal femoral epiphyseal plate in rats // J. Bone Joint Surg. Am. 1972. 54, N 2. P. 309–322.
- *Engsig, M. T., Chen, Q. J., Vu, T. H. et al.* Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones // J. Cell Biol. 2000. **151**, N 4. P. 879–889.

- *Farnum, C. E., Wilsman, N. J.* Morphological stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage // Anat. Rec. 1987. **219**, N 3. P. 221–232.
- Farnum, C. E., Wilsman, N. J. Growth Plate Cellular Function // Skeletal Growth and Development / Eds J. A. Buckwalter, M. G. Ehrlich et al. — Rosemont, 1998. — P. 203–243.
- *Farnum, C. E., Nixon, A., Lee, A. O. et al.* Quantitative three-dimensional analysis of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate // Cells Tissues Organs. 2000. **167**, N 4. P. 247–258.
- Farnum, C. E., Tinsley, M., Hermanson, J. W. Forelimb versus Hindlimb Skeletal Development in the Big Brown Bat, Eptesicus fuscus: Functional Divergence Is Reflected in Chondrocytic Performance in Autopodial Growth Plates // Cells Tissues Organs. — 2008 a. — 187, N 1. — P. 35–47.
- Farnum, C. E., Tinsley, M., Hermanson, J. W. Postnatal bone elongation of the manus versus pes: analysis of the chondrocytic differentiation cascade in Mus musculus and Eptesicus fuscus // Cells Tissues Organs. — 2008 b. — 187, N 1. — P. 48–58.
- Farquharson, C., Jefferies, D., Seawright, E., et al. Regulation of chondrocyte terminal differentiation in the postembryonic growth plate: the role of the PTHrP–Indian hedgehog axis // Endocrinology. — 2001. — 142. — P. 4131–4140.
- *Felisbino, S., Carvalho, H. F.* Growth cartilage calcification and formation of bone trabeculae are late and dissociated events in the endochondral ossification of Rana catesbeiana // Cell Tissue Res. 2001. **306**. P. 319–323.
- *Fondon, J. W., Garner, H. R.* Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. **101**, N 52. P. 18 058–18 063.
- *Forriol, F., Shapiro, F.* Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces // Clin. Orthop. Relat. Res. 2005. **432**. P. 14–33.
- *Frost, H. M.* Changing concepts in skeletal physiology // Am. J. Hum. Biol. 1998. **10**, N 5. P. 599–605. *Fujii, T., Takai, S., Arai, Y. et al.* Microstructural properties of the distal growth plate of the rabbit radius and ulna:
- biomechanical, biochemical, and morphological studies // J. Orthop. Res. 2000. 18, N 1. P. 87–93.
- *Hall, B. K.* Bone and cartilage: development and evolutionary skeleton biology. London ; New-York : Academic Press, 2005. 792 p.
- *Hendy, G. N., Goltzman, D.* Does calcitriol have actions independent from the vitamin D receptor in maintaining skeletal and mineral homeostasis? // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 2005. **14**, N 4. P. 350–354.
- *Hill, D., Logan, A.* Peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis // Prog. Growth factors Res. 1992. N 4. P. 45–68.
- *Hinchliff, J. R., Johnson, D. R.* Growth of cartilage // Cartilage. Development, Differentiation and Growth / Ed. B. K. Hall. New York ; London : Academic Press, 1983. 2. P. 255–295.
- Hoon Park., Sun Young Kong, Hyun Woo Kim, Ick Hwan Yang. Altered Cellular Kinetics in Growth Plate according to Alterations in Weight Bearing // Yonsei Med. J. — 2012. — 53, N 3. — P. 618–624.
- Horner, A., Bishop, N. J., Bord, S. et al. Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage // J. Anat. 1999. **194**, N 4. P. 519–524.
- Howell, D. S. Review article. Current concepts of calcification // J. Bone Joint. Surg. Am. 1971. 53, N 2. P. 250–257.
- Hunter, G. K., Goldberg, H. A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. 90, N 18. P. 8562–8565.
- *Hunziker, E. B.* Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes // Microscopy Research and Technigue. — 1994. — **28**, N 6. — P. 505–519.
- Iannotti, J. P. Growth plate physiology and pathology // Orthop. Clin. North Am. 1990. 21, N 1. P. 1–17.
- Juul, A. The effects of oestrogens on linear bone growth // Hum. Reprod. Update. 2001. 7, N 3. P. 303–313.
- Kao, S. C., Smith, W. L. Skeletal injuries in the pediatric patient // Radiol. Clin. North Am. 1997. 35, N 3. — P. 727–746.
- Karsenty, G. Genetics of skeletogenesis // Develop. Genet. 1998. 22, N 4. P. 301-313.
- *Kember, N. F.* Cell kinetics of cartilage // Cartilage. Structure, Function and Biochemistry / Ed. B. K. Hall. New York, London : Academic Press, 1983. **1**. P. 149–180.
- Kember, N. F. Cell kinetics and the control of bone growth // Acta Paediatr. 1993. 391 (Suppl.). P. 61–65.
- *Kember, N. F., Sisson, H. A.* Quantitative histology of the human growth plate // J. Bone and Joint. Surg. Br. 1976. **58 B**, N 4. P. 426–435.
- *Kember, N. F., Kirkwood, J. K.* Cell kinetics and longitudinal bone growth in birds // Cell Tissue Kinet. 1987. **20**. P. 625–629.
- *Kember, N. F., Kirkwood, J. K., Duignan, P. J. et al.* Comparative cell kinetics of avian growth plates // Res. Veter. Sci. 1990. **49**, N 3. P. 283–288.
- Kirkwood, J. K., Duignan, P. J., Kember, N. F. et al. The growth rate of the tarsometatarsus bone in birds // J. Zool. 1989. 217, N 3. P. 403-416.

- *Kirkwood, J. K., Kember, N. F.* Comparative quatitative histology of mammalian growth plates // J. Zool. 1993. **231**, N 4. P. 543–562.
- *Kirsch, T., Wuthier, R. E.* Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type 11 and X collagens // J. Biol. Chem. 1994. **269**, N 15. P. 11 464–11 469.
- *Kirsch, T., Nah, H. D., Demuth, D. R. et al.* Annexin V— mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization // Biochemistry. 1997. **3**, N 11. P. 3359–3367.
- *Kodayahi, T., Chung, U. I., Schipani, E. et al.* PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps // Development. 2002. **129**. P. 2977–2986.
- Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate // Nature. 2003. 423. P. 332–336.
- Kronenberg, H. M. PTHrP and skeletal development // Ann. NY Acad. Sci. 2006. **1068**. P. 1–13.
- Kuhn, J. L., DeLacey, J. H., Leenellett, E. E. Relationship between bone growth rate and hypertrophic chondrocyte volume in New Zealand white rabbits of varying ages // J. Orthop. Res. — 1996. — 14, N 5. — P. 706–714.
- Lahiji, A., Sohrabi, A., Hungerford, D. S. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes // J. Biomed Mater. Res. — 2000. — 51, N 4. — P. 586–595.
- Lash, J. W., Vasan, N. S. Glycosaminoglycans of Cartilage // Cartilage. Structure, Function and Biochemistry / Ed. B. K. Hall. — New York ; London : Academic Press, 1983. — 1. — P. 215–251.
- Lefebvre, V., Smits, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation // Birth Defects Res. C. Embryo. Today. 2005. 75, N 3. P. 200–212.
- Lin, H., Aubin, C. E., Parent, S., Villemure, I. Mechanobiological bone growth: comparative analysis of two biomechanical modeling approaches // Med. Biol. Eng. Comput. — 2009. — 47, N 4. — P. 357–366.
- *Lui, J. C., Nilsson, O., Baron, J.* Growth plate senescence and catchup growth // Endocr. Dev. 2011. **21**. P. 23–29.
- *Mackie, E. F., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L. et al.* Edochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2008. **40**. P. 46–62.
- Mansfield, K., Raipurohit, R., Shapiro, I. M. Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes // J. Cell Physiol. — 1999. — 179, N 3. — P. 276–286.
- *Martha*, *P.*, *Reiter*, *E*. Pubertal growth and growth hormone secretion // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 1991. **20**, N 1. P. 165–182.
- *Matsuo, M., Nishida, K., Yoshida, A. et al.* Expression of caspase3 and 9 relevant to cartilage destruction and chondrocytes apoptosis in human osteoarthritic cartilage // Acta Med. Okayama. 2001. 55, N 6. P. 333–340.
- *Mikic, B., Ferreira, V. P., Battaglia, T. C., Hunziker, E. B.* Accelerated hypertrophic chondrocyte kinetics in GDF7 deficient murine tibial growth plates // J. Ortop. Res. 2008. 26, N 7. P. 986–990.
- *Missana, L. R., Aguilera, X. M., Hsu, H. H.* Bone morphogenetic proteins (BMPs) and noncollagenous proteins of bone identified in calcifying matrix vesicles of growth plate // J. Bone Miner. Res. 1998. 13. P. 241.
- MoreyHolton, E. R., Globus, R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // J. Appl. Physiol. 2002. 92. P. 1367–1377.
- *Nakashima, K., Xin Zhou, Kunkel, G. et al.* The novel zinc fingercontaining transcription factor osterix is required for osteoblast differensiation and bone formation // Cell. 2002. **108**, N 1. P. 17–29.
- *Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z. X. et al.* Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism // Mol. Cell. Biol. 2000. **20**, N 19. P. 7311–7318.
- *Niehoff, A, Kersting, U. G., Zaucke, F. et al.* Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dosedependent voluntary exercise // Bone. 2004. **35**, N 4. P. 899–908.
- *Nilsson, A., Carlsson, B., Mathews, L. et al.* Growth hormone regulation of growth gormone receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes // Mol. Cell. Endocrinol. 1990. **70**, N 3. P. 237–246.
- Nilsson, O., R. Marino, F. De Luca, et al. Endocrine regulation of the growth plate // Horm. Res. 2005. 64, N 4. P. 157–165.
- *Odgren, P. R., Philbrick, W. M., Gartland, A.* Perspective. Osteoclastogenesis and growth plate chondrocyte differentiation: emergence of convergence // Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr. 2003. **13**, N 3. **4**. P. 181–193.
- *Ohashi*, N., *Robling, A. G., Burr, D. B., Turner, C. H.* The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate // J. Bone Miner. Res. 2002. **17**, N 2. P. 284–292.
- Ortega, N., Bthonick, D., Stickens, D., Werb, Z. How proteases regulates bone morphogenesis // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003. 995. P. 109–116.
- Parfitt, A. M. Genetic effects on bone mass and turnoverrelevance to black/white differences // J. Am. Coll. Nutr. - 1997. - 16, N 4. - P. 325-333.
- Provot, S., Schipani, E. Molecular mechanisms of endochondral bone development // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2005. — 328, N 3. — P. 658–665.
- Putz, R. Development and growth of the epiphysis // Z. Orthop. Ihre. Grenzgeb. 1996. 134, N 5. P. 391–395.

- Radhakrishnan, P., Lewis, N. T., Mao, J. J. Zonespecific micromechanical properties of the extracellular matrices of growth plate cartilage // Ann. Biomed. Eng. 2004. 32, N 2. P. 284–291.
- *Rauch, F.* Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability // J. Musculoskelet Neuronal Interact. 2005. 5, N 3. P. 194–201.
- *Reich, A., Jaffe, N., Tong, A. et al.* Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization // J. Appl. Physiol. 2005. **98**, N 6. P. 2381–2389.
- *Reich, A., Sharir, A. E., Zelzer, A. et al.* The effect of weight loading and subsequent release from loading on the postnatal skeleton // Bone. 2008. **43**, N 4. P. 766–774.
- *Reich, A., Maziel, S., Ashkenazi, Z., Ornal, E. M.* Involvement of metalloproteinases in the growth plate response to physiological mechanical load // J. Appl. Physiol. 2010. **108**, N 1. P. 172–180.
- Reiter, E. O., Rosenfeld, R. G. Normal and aberrant growth // Willams Textbook of Endocrinology / Eds. J. D. Wilson, D. W. Foster, H. V. Kronenberg, P. R. Larsen. — Philadelphia : WB Saunders, 2002. — P. 1427–1507.
- Reno, Ph. L., Horton, J. R. W. E., Elsey, R. M. et al. Growth plate formation and development in alligator and mouse metapodials: evolutionary and functional implications // J. Exper. Zool. (Mol. Dev. Evol.). — 2007. — 308 B. — P. 283–296.
- *Roach, H. I., Aigner, T., Kouri, J. B.* Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes // Apoptosis. 2004. **9**, N 3. P. 265–277.
- *Robison, R.* The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification // Biochem. J. 1923. 17. P. 286–293.
- *Robson, H., Siebler, T., Shalet, S. M., Williams, G. R.* Interaction between GH, IGF1, glucocorticoids and thyroid hormones during skeletal growth // Pediatr. Res. 2002. **52**, N 2. P. 137–147.
- Rodriguez, L., Cheng, Z., Chen, T. H. et al. Extracellular calcium and parathyroid hormonerelated peptide signaling modulate the pace of growth plate chondrocyte differentiation // Endocrinology. — 2005. — 146, N 11. — P. 4597–4608.
- *Rojas, E. N., Arispe, N., Haigler, H. T. et al.* Identification of annexin as calcium channels in biological membranes // Bone miner. 1992. 17, N 2. P. 214–218.
- Safran, M. R., Eckardt, J. J., Kabo, J. M., Oppenheim, W. L. Continued growth of the proximal part of the tibia after prosthetic reconstruction of the skeletally immature knee. Estimation of the minimum growth force in vivo in humans // J. Bone Joint. Surg. Am. — 1992. — 74, N 8. — P. 1172–1179.
- Savendahl, L. Hormonal regulation of growth plate cartilage // Horm. Res. 2005. 64, Suppl. 2. P. 94-97.
- Sears, K. E. Molecular determinants of bat wing development / Cells Tissues Organs. 2008. 187, N 1. P. 6–12.
- Sergerie, K., Lacoursiere, M. O., Levesque, M., Villemure, I. Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests // J. Biomech. 2009. 42, N 4. P. 510–516.
- *Serra, R., Kareplis, A., Sohn, P.* Parathyroid hormonerelated peptide (PTHrP) dependent and independent effects of transforming growth factor β (TGF) on endochondral bone formation // J. Cell. Biol. 1999. **145**, N 4. P. 783–794.
- Shao, Y. Y., Wang, L., Ballock, R. T. Thyroid hormone and the growth plate // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2006. 7, N 4. P. 265–271.
- Siebler, T., Robson, H., Shalet, S. M. et al. Glucocorticoids, thyroid hormone interaction: implications for the growth plate // Hor. Res. 2001. 56, Suppl. 1. P. 7–12.
- *Silvestrini, G., Ricordi, M. E., Bonucci, E.* Resorpthin of uncalcified cartilage in the diaphysis of chick embrio tibis // Cell Tissue Res. 1979. 196. P. 221–235.
- *Silvestrini, G., Macetti, P., Ballanti, P. et al.* Cytochemical demonstration of the glucocorticoid receptor in skeletal cells of the rat // Endocr. Res. — 1999. — **25**, N 1. — P. 117–128.
- Solomon, L. A., Berube, N. G., Beier, F. Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy // Birth Defects Res. C. Embryo. Today. — 2008. — 84, N 2. — P. 123–130.
- StJacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A. P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation // Genes & Development. 1999. 13, N 16. P. 2072–2086.
- Stokes, I. A., Mente, P. L., Iatridis, J. C. et al. Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading // J. Bone and Joint. Surg. — 2002. — 84 A, N 10. — P. 1842–1848.
- Stokes, I. A., Gwadera, J., Dimock, A. et al. Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus fulltime loading // J. Orthop. Res. — 2005. — 2, N 3. — P. 188–195.
- Stokes, I. A., Aronsson, D. D., Dimock, A. N. et al. Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension // J. Orthop. Res. — 2006. — 24, N 6. — P. 1327–1334.
- Stokes, I. A., Clark, K. C., Farnum, C. E., Aronsson, D. D. Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction // Bone. — 2007. — 41, N 2. — P. 197–205.
- *Tachibana, H., Kakuta, S., Yagami, K.* Effects of cytokines on the production of nitric oxide in a chondrogenic cell line established from human osteogenic sarcoma // Oral. Dis. 2000. **6**. P. 303–309.

- *Tang, M., Mao, J. J.* Matrix and gene expression in the rat cranial base growth plate // Cell Tissue Res. 2006. **324**, N 3. P. 467–474.
- Thurston, M. N., Johnson, D. R., Kember, N. F., Moore, W. J. Cell kinetics of growth cartilage in stumpy // J. Anat. 1983. 136. P. 407–415.
- *Thurston, M. N., Johnson, D. R., Kember, N. F.* Cell kinetics of growth cartilage of achondroplastic (cn) mice // J. Anat. 1985. **140**. P. 425–434.
- *Tickle, C.* The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development // Mech. Dev. 2004. **121**. P. 1019–1029.
- *Tryfonidou, M. A., Hazewinkel, H. A. W., Riemers, F. M. et al.* Intraspecies disparity in growth rate is associated with differences in expression of local growth plate regulators // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2010. **299**. P. 1044–1052.
- *Tsumaki, N., Yoshikawa, H.* The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation // Cytokine Growth Factor Rev. — 2005. — **16.** — P. 279–285.
- *Ulici, V., Hoenselaar, K., Gillespie, J., Beier, F.* The PISK pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation // BMC Develop. Biol. 2008. **8**. P. 40.
- Villemure, I., Chung, M. A., Seck, C. S. et al. Static compressive loading reduces the mRNA expression of type II and X collagen in rat growthplate chondrocytes during postnatal growth // Connect. Tissue Res. — 2005. — 46, N 4–5. — P. 211–219.
- *Villemure, I., Cloutier, L., Matyas, J. R., Duncan, N. A.* Nonuniform strain distribution within rat cartilaginous growth plate under uniaxial compression // J. Biomech. 2007. **40**, N 1. P. 149–156.
- *Villemure, I., Stokes, I. A. F.* Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding // J. Biomech. 2009. **42**, N 12. P. 1793–1803.
- Weiguang Wang, Na Lin, Li L. et al. Atf4 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification by activating Ihh transcription // Development. — 2009. — 136, N 24. — P. 4143– 4153.
- *Wezeman, F. H.* Introduction to histology and histochemistry of cartilage // Micros. Res. Techn. 1998. 43, N 2. P. 89–90.
- *Williams, J. L., Do, P. D., Eick, J. D., Schmidt, T. L.* Tensile properties of the physis vary with anatomic location, thickness, strain rate and age // J. Orthop. Res. 2001. **19**, N 6. P. 1043–1048.
- *Wilsman, N. J., Bernardini, E. S., Leiferman, E. et al.* Age and pattern of the onset of differential growth among growth plates in rats // J. Orthop. Res. 2008. **26**. P. 1457–1465.
- Wong, M., Carter, D. R. A theoretical model of endochondral ossification and bone architectural constraction in long bone ontogeny // Anat. & Embryol. — 1990. — 181, N 6. — P. 523–532.
- Wu, L. N., Sauer, G. R., Genge, B. R., Wuthier, R. E. Induction of mineral deposition by primary cultures of chicken growth plate chondrocytes in acsorbatecontaining media. Evidence of an association between matrix vesicles and collagen // J. Biol. Chem. — 1989. — 234, N 65. — P. 21 346–21 355.
- Wu Qiuqian, Chen Qian Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation and hypertrophy: ionchannel dependent transduction of matrix deformation signals // Exp. Cell Res. — 2000. — 256, N 2. — P. 383–391.
- *Zhitnikov, A. Ya.* The activity of the metaepiphyseal chondrocytes in the humerus of growing mammals // Anat. Anz. 1978. **144**, N 9. P. 334–345.
- Zuscik M. J., Hilton M. J., Zhang X. et al. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress // J. Clin. Ivest. 2008. 118, N 2. P. 429–438.



# ИЛЛЮСТРАЦИИ



Fig. 1. Ratio (%) of epiphyseal cartilage zones of growth femoral in *Gallus domesticus* (*A*) and *Rana temporaria* (*B*).



Рис. 2. Длина структурных зон росткового хряща плечевой кости *Rattus norvegicus* (*A*) и количество хондроцитов в зонах пролиферации (от резервной до созревания) в ростковых хрящах костей передних конечностей *Nyctalus noctula* (*Б*). У словные обозначения: \* — длина плодов; \*\* — сутки развития после рождения; \*\*\* — эмбриогенез; 1, 2 — проксимальный и дистальный хрящ плечевой кости; 3, 4 — проксимальный и дистальный хрящ метакарпальной кости.

Fig. 2. The length of structural zones of humerus growth cartilage in *Rattus norvegicus* (*A*) and the number of chondrocytes in the proliferation zones (from reserve to full maturity) in cartilage growth plates of bones of the forelimbs of *Nyctalus noctula* (*B*). Conventional symbols: \* — the length of the foetuses; \*\* — a day of development after birth; \*\*\* — embryogenesis; 1, 2 — proximal and distal humerus cartilage; 3, 4 — proximal and distal cartilage of the radial bone; 5, 6 — proximal and distal cartilage of metacarpal bone.


Рис. 3. Хрящевые закладки бедренной кости *Rana temporaria* (*A*) и *Gallus domesticus* (*Б*). В зоне гипертрофированных хондроцитов отсутствуют минеральные субстраты (*A*), однако имеется активность щелочной фосфатазы (*Б*). Реакция Косса (*A*) и Гомори (*Б*). У словные обозначения: зг — зона гипертрофии; кп — кость периста; п — периост.

Б

Fig. 3. Cartilage anlage of the femur in *Rana temporaria* (*A*) and *Gallus domesticus* (*B*). In hypertrophic chondrocyte zone mineral substrates are absent (*A*), but alkaline phosphatase activity presents (*B*). The von Cossa (*A*) and Gomory (*B*) reaction. Conventional symbols:  $3\pi$  — zone of hypertrophy;  $\kappa\pi$  — bone of periost;  $\pi$  — periost.



Рис. 4. Проксимальный фрагмент бедренной кости *Rana temporaria*. Метка <sup>3</sup>Н-тимидина в зоне роста. Окраска гематоксилин + эозин. У словные обозначения: э — эпифиз; эб — эпифиз боковой; пк — периостальная кость; г — зона гипертрофии.

Fig. 4. Proximal fragment of the femur of *Rana temporaria*. Mark <sup>3</sup>H-thymidine was used in the growth zone. Stained with hematoxylin and eosin. C on v entional symbols:  $\vartheta$  — epiphysis;  $\vartheta$  — epiphysis;  $\vartheta$  — epiphysis;  $\vartheta$  — growth zone of the diaphysis;  $\pi$  — periosteal bone;  $\Gamma$  — zone hypertrophy.



Рис. 5. Трабекулярная конструкция диафиза бедренной кости 17-суточного эмбриона *Gallus domesticus*. Окраска гематоксилин + эозин. У словные обозначения: кд — кость диафиза; гх — гипертрофированный хрящ.

Fig. 5. Trabecular structure of the femoral diaphysis in 17-day old embryo *Gallus domesticus*. Stained with hematoxylin and eosin. Conventional symbols:  $\kappa \alpha$  — diaphysis bone;  $\kappa \alpha$  — hypertrophic cartilage.



A



Рис. 6. Активность щелочной фосфатазы в бедренной кости *Gallus domesticus* на 14-е (*A*) и 19-е (*Б*) сутки эмбрионального развития. Реакция Гомори. У словные обозначения: кп — кость периста; хк — хрящевые каналы; зг — зона гипертрофированных хондроцитов; зс — зона созревания.

Fig. 6. Alkaline phosphatase activity in the femur in *Gallus domesticus* on the 14th (*A*) and 19th (*B*) day of embryonic development. Gomory reaction. Conventional symbols:  $\kappa \pi$  — periosteal bone;  $\kappa \kappa$  — cartilage canals;  $\sigma$  — zone of hypertrophic chondrocytes;  $\sigma$  — zone of maturation.



Рис. 7. Отсутствие минеральных субстратов в матриксе хряща на 14-е сутки эмбрионального развития *Gallus domesticus* (*A*) и включение <sup>45</sup>Са в бедренную кость на 16-е сутки эмбрионального развития (*Б*). Реакция Косса + сафранин (*A*), гематоксилин + эозин + сафранин (*Б*). У словные обозначения: гх — гипертрофированный хрящ; кд — кость диафиза.

Fig. 7. The absence of mineral substrates in cartilage matrix on the 14th day of embryonic development of *Gallus domesticus* (A) and inclusion of  $^{45}$ Ca in femur on the 16th day of embryonic development (B). The von Cossa reaction and safranin (A), stained with hematoxylin and eosin (B). Conventional symbols: rx — hypertrophic cartilage;  $\kappa \mu$  — bone diaphysis.



Рис. 8. Фрагмент проксимальной части бедренной кости сеголетки *Rana temporaria*. Отсутствуют эндохондральные трабекулы в зоне замещения (зз). Окраска гематоксилин + эозин + азур. Зоны: э — эпифиз; р — резервная; пр, г — зоны пролиферации и гипертрофии; зз — замещения; к — кость диафиза; бэ — боковой эпифиз; км — костный мозг.

Fig. 8. A fragment of the proximal part of the femur in underyearling *Rana temporaria*. Endochondral trabeculae is absent in the zone of substitution (33). Stained with hematoxylin, eosin and azure. Zones: 9 - epiphysis; p - reserve zone;  $\pi p$ , r - zones of proliferation and hypertrophy; 33 - substitution;  $\kappa -$  bone diaphysis; 69 - lateral epiphysis;  $\kappa -$  bone marrow.



Рис. 9. Соотношение длины костей конечности в онтогенезе Rattus norvegicus.

Fig. 9. The ratio of the length of the limb bones in ontogenesis of *Rattus norvegicus*.



Рис. 10. Структура зон роста длинных костей (*A*) и фаланг (*Б*) 19-суточных эмбрионов *Rattus norvegicus*. Окраска гематоксилин + сафранин + эозин. 3 о н ы: э — эпифиз; пр — пролиферации; с — созревания; г — гипертрофии.

Fig. 10. Structure of the long bones (*A*) and phalanges (*B*) growth zones of *Rattus norvegicus* 19-day old embryos. Stained with hematoxylin, eosin and safranin. Z o n e s:  $\mathfrak{I}$  — epiphysis;  $\mathfrak{n}$  — proliferation; c — maturation; r — hypertrophy.

Α



Рис. 11. Изменение средней интенсивности метки <sup>3</sup>Н-тимидина над ядрами хондроцитов ростковых хрящей костей 2-недельных *Rattus norvegicus*.

Fig. 11. Change in the average intensity of the <sup>3</sup>H-thymidine over the nuclei of chondrocytes of growth cartilages of bones in 2 weeks old *Rattus norvegicus*.



Рис. 12. Гистограммы распределения ядер хондроцитов по интенсивности метки <sup>3</sup>Н-тимидина в фалангах конечностей 19-суточных плодов *Rattus norvegicus*.

Fig. 12. Histograms of the distribution of the chondrocytes nuclei over label <sup>3</sup>H-thymidine intensity in the limbs phalanges of *Rattus norvegicus* 19 day foetuses.



Рис. 13. Изменение средней интенсивности метки <sup>3</sup>Н-тимидина над ядрами хондроцитов ростковых хрящей костей передних конечностей эмбрионов *Nyctalus noctula*.

Fig. 13. Change in the average intensity of the <sup>3</sup>H-thymidine over the nuclei of chondrocytes of growth cartilages of the forelimbs bones in *Nyctalus noctula* embryos.



Рис. 14. Гистограммы распределения ядер хондроцитов по интенсивности метки <sup>3</sup>Н-тимидина в костях конечностей плодов *Nyctalus noctula*.

Fig. 14. Histograms of the distribution of the nuclei of chondrocytes in intensity label <sup>3</sup>H-thymidine in bones of the limbs of embryos *Nyctalus noctula*.



- Рис. 15. Соотношение длины костей передних конечностей в онтогенезе *Nyctalus noctula*. \* Длина эмбрионов.
- Fig. 15. The ratio of the length of the forelimbs bones in *Nyctalus noctula* ontogenesis. \* Lengh of embryos.



Рис. 16. Изменение количества хондроцитов в «изогенных» группах после завершения трёх одинаковых по продолжительности митотических циклов (Мц 1, Мц 2, Мц 3) и переходе в гетеросинтетическую интерфазу разного количества клеток.

Fig. 16. A change in the number of chondrocytes in the "isogenic" groups after the completion of three identical duration of the mitotic cycle (MII) and transition of different number of cells into geterosintetick interphase.



Рис. 17. Изменение количества меченых хондроцитов в зонах пролиферации эпифизарных хрящей *Rana temporaria* на 54-й стадии развития после многократных инъекций <sup>3</sup>Н-тимидина.

Fig. 17. A change in the quantity of labeled chondrocytes in proliferation zones of epiphyseal cartilage of bones *Rana temporaria* on 54th stage of development after repeated injections of <sup>3</sup>H-thymidine.



Рис. 18. Интенсивность накопления радионуклидов в созревающих хондроцитах эпифизарных хрящей некоторых позвоночных: А — *Rattus norvegicus* (2 нед); Б — *Nyctalus noctula* (1 нед); С — *Gallus domesticus* (1 нед); Д — *Rana temporaria* (посля метаморфоза).

Fig. 18. The intensity of the radionuclides accumulation in maturing chondrocytes of the epiphyseal cartilage of some vertebrates: A — *Rattus norvegicus* (2 weeks); B — *Nyctalus noctula* (1 week); C — *Gallus domesticus* (1 week);  $\Pi$  — *Rana temporaria* (after metamorphosis).



Рис. 19. Включение <sup>3</sup>Н-глюкозы (*A*) и распределение гликогена (*Б*) в хондроцитах зоны созревания эпифизарного хряща. Окраска гематоксилин + эозин (*A*) и ШИК-реакция (*Б*).

Fig. 19. The inclusion of  ${}^{3}$ H-glucose (*A*) and the distribution of glycogen (*B*) in the chondrocytes of maturation zone of epiphyseal cartilage. Stained with hematoxylin and eosin (*A*) and PAS-reaction (*B*).



Б

Рис. 20. Секреторные вакуоли (СВ) в зоне комплекса Гольджи (А) и на границе с плазматической мембраной (Б) функционально активного хондроциты. ЭР — эндоплазматический ретикулум. Электронограммы. x12000 (А) и x20000 (Б).

Fig. 20. Secretory vacuoles (CB) in the zone of the Golgi complex (*A*) and on the boundary with the plasma membrane (*B*) of the functionally active chondrocyte.  $\Im P$  — endoplasmic reticulum. Electronograms. x12000 (*A*) and x20000 (*B*).



Рис. 21. Фрагмент цитоплазмы гипертрофированного хондроцита. Дезорганизация цитоплазматических органоидов. Электронограмма. x10 000.

Fig. 21. The detail of the cytoplasm of the hypertrophic chondrocyte. Disorganization of cytoplasmic organelles. Electronogram. x10,000.



Б

Рис. 22. Фрагмент эпифиза бедренной кости сеголетки *Rana temporaria*. Реакция Косса + сафранин (*A*), гематоксилин + азур (*Б*). У словные обозначения: пр, г — зоны пролиферации и гипертрофии; с — зона созревания; бэ — боковой эпифиз; к — кость диафиза.

Fig. 22. The detail of the femur epiphysis in the undery earling *Rana temporaria*. Von Cossa reaction and safranin (*A*), Stained with hematoxylin and azure (*B*). Conventional symbols:  $\pi p, r$  — zones of proliferation and hypertrophy; c — zone maturation; 69 — lateral epiphysis;  $\kappa$  — bone diaphysis.



Рис. 23. Минерализованный хрящ эпифиза бедренной кости 1-годичной *Rana temporaria*. Реакция Косса + гематоксилин. У словные обозначения: э — эпифиз; пр — зона пролиферации; р — резервная зона; зрд — зона роста диафиза.

Fig. 23. Mineralized cartilage of the femur epiphysis in 1-year old *Rana temporaria*. Von Cossa reaction and hematoxylin. Conventional symbols:  $\mathfrak{I}$  — epiphysis;  $\pi p$  — proliferation; p — reserve;  $\mathfrak{I} p \mathfrak{I}$  — growth zone of the diaphysis.



Рис. 24. Зона резорбции хряща с гипертрофированными хондроцитами в бедренной кости 15-суточного эмбриона курицы. Окраска гематоксилин + эозин + азур. Условные обозначения: гх — гипертрофированный хрящ; км — костный мозг; зз — зона замещения.

Fig. 24. Resorption zone of cartilage with hypertrophic chondrocytes in the femur of 15-day old chicken embryo. Stained with hematoxylin, eosin and azure. Conventional symbols: rx — hypertrophic cartilage;  $\kappa M$  — bone marrow; 33 — substitution zone.



Рис. 25. Хрящевые каналы (хк) в эпифизарном хряще бедренной кости 19-суточного плода курицы. Окраска гематоксилин + эозин. Зоны: э — эпифиз; зпр — пролиферации; зс — созревания; зг — ги-пертрофии.

Fig. 25. Cartilage canals (xk) in the epiphyseal cartilage of the femur of 19-day old chicken foetuses. Stained with hematoxylin and eosin. Z o n e s:  $\vartheta$  — epiphysis;  $\vartheta$ mp — proliferation; c — maturation;  $\vartheta$ r — hypertrophy.



A







Рис. 26. Щелочная фосфатаза (*A*), минерализованный матрикс (*Б*, *Г*), синтез коллагена (*B*) и хондрокласты (*Г*) в эпифизарном хряще и в зоне замещения бедренной кости 19-суточных плодов курицы. Реакция Гомори (*A*), Косса (*Б*, *Г*) и включение <sup>3</sup>Н-глицина в формирующуюся кость (*B*). У словные обозначения: мх — минерализованный хрящ; гх — гипертрофированный хрящ; эх — эндохондральная кость; хк — хондрокласты; э — эпифиз; зг — зона гипертрофии.

Fig. 26. Alkaline phosphatase (*A*), mineralized matrix (*B*,  $\Gamma$ ), collagen synthesis (*B*) and chondroklasts ( $\Gamma$ ) in the epiphyseal cartilage and in the zone of the substitution of the femur of 19-day old chicken foetuses. Gomory (*A*), von Cossa (*B*,  $\Gamma$ ) reactions and the inclusion of <sup>3</sup>H-glycine into the forming bone (*B*). C on v entional symbols: Mx — mineralized cartilage; rx — hypertrophic cartilage; эх — endochondral bone; x $\kappa$  — chondroklasts;  $\Im$  — epiphysis;  $\Im$  — zone hypertrophy.



Рис. 27. Зона замещения в бедренной кости 1-месячной курицы. Окраска гематоксилин + эозин + азур. Остатки матрикса хряща (гх) являются основой для формирования эндохондральной кости (эк).

Fig. 27. Substitution zone in the femur of 1 month old chicken. Stained with hematoxylin, eosin and azure. Remains of the cartilage matrix (rx) are the basis for formation of endochondral bone ( $\Im\kappa$ ).



Рис. 28. Щелочная фосфатаза (*A*) и минеральные субстраты (*Б*) содержатся в перихондре и матриксе хрящевой закладки эмбрионов *Nyctalus noctula*. Реакция Гомори (*A*), Косса (*Б*) + сафранин.

Fig. 28. Alkaline phosphatase (*A*) and mineral substrates (*B*) are in perichondrium and cartilage matrix of *Nyctalus noctula* embryos. Gomory (*A*), von Cossa (*B*) reactions with safranin.



Рис. 29. Хрящевая стадия развития бедренной кости *Nyctalus noctula*. Начало резорбции хряща и формирование костномозговой полости. Реакция с альциановым синим. Зоны: пр — пролиферации; с — созревания; г — гипертрофии; кмп — костномозговая полость.

Fig. 29. Cartilaginous stage of development of the *Nyctalus noctula* femur. Starting of cartilage resorption and formation of the medullary cavity. Reaction with alcian blue. Z o n e s:  $\pi p$  — proliferation; c — maturation; r — hypertrophy;  $\kappa m \pi$  — bone marrow cavity.



Рис. 30. Ростковый хрящ. Минерализация продольных перегородок хрящевого матрикса. Реакция Косса + сафранин. Зоны: пр — пролиферации; с — созревания; г — гипертрофии; мх — минерализованный хрящ.

Fig. 30. Growth plate of the cartilage. Mineralization of the longitudinal partitions of the cartilage matrix. Von Cossa reaction and safranin. Z o n e s:  $\pi p$  — proliferation; c — maturation; r — hypertrophy; Mx — mineralized cartilage.



Рис. 31. Включение <sup>3</sup>Н-пролина при синтезе костной ткани на фрагментах матрикса хряща в зоне замещения. Окраска гематоксилин + эозин + азур. 3 о н ы: р — резервная; пр — пролиферации; с — созревания; г — гипертрофии; кхт — костно-хрящевые трабекулы.

Fig. 31. Inclusion of <sup>3</sup>H-proline during the bone tissue synthesis on the fragments of cartilage matrix in the zone of substitution. Stained with hematoxylin, eosin and azure. Z o n e s: p — reserve;  $\pi p$  — proliferation; c — maturation; r — hypertrophy;  $\kappa x \tau$  — osteochondral trabeculae.



Рис. 32. Формирование костной ткани (кт) в зоне замещения на основе продольных фрагментов хрящевого матрикса (хм). Зоны эпифизарного хряща: p — резервная; пр — пролиферации; с — созревания; г — гипертрофии. Окраска гематоксилин + сафранин.

Fig. 32. Formation of bone tissue ( $\kappa T$ ) in the zone of substitution based on longitudinal pieces of cartilage matrix ( $\kappa M$ ). Z o n e s: p — reserve;  $\pi p$  — proliferation; c — maturation;  $\Gamma$  — hypertrophy. Stained with hematoxylin and safranin.







Рис. 33. Метка <sup>3</sup>Н-пролина в зоне замещения плечевой кости через 1 ч (A) и в центре костного диафиза через 144 ч (B) после введения радионуклида крысам на 18-е сутки беременности. Окраска гематоксилин + эозин + сафранин (A) и азур (B).

Fig. 33. <sup>3</sup>H-proline mark in the humerus substitution zone after 1 h (A) and in the center of the bone diaphysis after 144 hours (B) after injection of the radionuclide in rats on the 18th day of pregnancy. Stained with hematoxylin, eosin and safranin (A) and azure (B).



Рис. 34. Структура ростковых хрящей и «изогенных» групп хондроцитов в костях передних конечностей *Nyctalus noctula*. Окраска гематоксилин + сафранин. Зоны: пр — пролиферации; с — созревания; г — гипертрофии; зз — замещения.

Fig. 34. The structure of the cartilage growth plates and "isogenic" groups of chondrocytes in the bones of the *Nyctalus noctula* forelimbs. Stained with hematoxylin and safranin. Zones:  $\pi p$  — proliferation; c — maturation;  $\Gamma$  — hypertrophy; 33 — substitution.



Α



Б

Рис. 35. Метка <sup>3</sup>Н-тимидина над хондроцитами зоны пролиферации (*A*) и гипертрофии (*Б*) эпифизарного хряща бедренной кости 20-дневного плода курицы через 1 и 96 ч после введения радионуклида. Окраска гематоксилин + эозин.

Fig. 35. <sup>3</sup>H-thymidine mark in chondrocytes of proliferation (A) and hypertrophy (B) zones of the femur epiphyseal cartilage in 20-day old fetus of chicken after 1 and 96 hours after injection of the radionuclide. Stained with hematoxylin and eosin.



Рис. 36. Структурные особенности эпифизарных хрящей плечевой кости 30-суточных *Rattus norvegicus*. Окраска гематоксилин + сафранин. 3 о н ы: p — резервная; пр — пролиферации; с — созревания; г — гипертрофии; кхт — костно-хрящевые трабекулы; зз — замещения.

Fig. 36. Structural features of the epiphyseal cartilage of the humerus in 30-day old *Rattus norvegicus*. Stained with hematoxylin and safranin. Z o n e s: p — reserve;  $\pi$ p — proliferation; c — maturation; r — hypertrophy;  $\kappa$ xx — osteochondral trabeculae; 33 — substitution.



Рис. 37. Структурные особенности проксимального (*A*) и дистального (*Б*) эпифизарного хряща пястной кости 5-суточной *Nyctalus noctula*. Окраска гематоксилин + сафранин. Зоны: э — эпифиз; р — резервная; пр — пролиферации; с — созревания; г — гипертрофии; зз — зона замещения.

Fig. 37. Structural features of the proximal (*A*) and distal (*B*) epiphyseal cartilage of the metacarpal 5-day old *Nyctalus noctula*. Stained with hematoxylin and safranin. Zones:  $\vartheta$  — epiphysis; p — reserve;  $\pi$ p — proliferation; c — maturation; r — hypertrophy;  $\vartheta$  — substitution zone.



Рис. 38. Количество костно-хрящевых трабекул в зонах замещения костей передних и задних конечностей *Nyctalus noctula* на 1-е и 10-е сутки после рождения. У словные обозначения: 1, 2 — проксимальный и дистальный метафиз плечевой кости; 3, 4 — лучевой; 5, 6 — пястных; 7, 8 — бедренной.

Fig. 38. Quantity of osteochondral trabeculae in replacement zones of bones of the *Nyctalus noctula* front and hind limbs on the 1st and 10th day after birth. Conventional symbols: 1, 2 — proximal and distal femoral metaphysis; 3, 4 — radial metaphysis; 5, 6 — metacarpal metaphysis; 7, 8 — femoral metaphysis.



Рис. 39. Количество костно-хрящевых трабекул в проксимальной и дистальной зоне замещения плечевой кости в постнатальном онтогенезе *Rattus norvegicus*.

Fig. 39. Quantity of osteochondral trabeculae in the proximal and distal humerus replacement zone in the postnatal ontogenesis of *Rattus norvegicus*.



A



Б

Рис. 40. Гипертрофированные хондроциты (rx) в центре эпифиза 10-суточных *Rattus norvegicus* (*A*) и минерализованный матрикс (мм) *Nyctalus noctula* (*Б*). Окраска гематоксилин + сафранин (*A*), реакция Косса + азур (*Б*).

Fig. 40. Hypertrophic chondrocytes (rx) in the center of the epiphysis of 10-day old *Rattus norvegicus* (*A*) and mineralized matrix (MM) *Nyctalus noctula* (*B*). Stained with haematoxylin and safranin (*A*), reaction Cossa and azure (*B*).



Рис. 41. Вторичный центр окостенения (вцо) в эпифизе плечевой кости *Rattus norvegicus (A)* и *Nyctalus noctula (Б)* на 30-е и 14-е сутки после рождения. Окраска гематоксилин + сафранин. У словные обозначения: кхт — костно-хрящевые трабекулы; сп — суставная поверхность; сх — суставной хрящ; гх — гипертрофированный хрящ; зоны эпифизарного хряща (эх): р — резервная; с — созревания; пр — пролиферации; г — гипертрофии.

Fig. 41. Secondary ossification center (BIQ) in the epiphysis of the *Rattus norvegicus* (A) and *Nyctalus noctula* (B) humerus on the 30th and 14th day after birth. Stained with haematoxylin and safranin. Conventional symbols:  $\kappa xr$  — osteochondral trabeculae;  $c\pi$  — articular surface; cx — articular cartilage; rx — hypertrophic cartilage; zones of epiphyseal cartilage ( $\exists x$ ): p — reserve; c — maturation;  $\pi p$  — proliferation; r — hypertrophy.



Рис. 42. Интенсивность включения <sup>35</sup>S-сульфата натрия (*A*) и <sup>3</sup>H-глицина (*Б*) в хондроциты структурных зон эпифизарного хряща плечевой кости *Nyctalus noctula*.

Fig. 42. The intensity of <sup>35</sup>S-sulfate sodium (*A*) and <sup>3</sup>H-glycine (*B*) incorporation into chondrocytes structural zones of epiphyseal cartilage of the *Nyctalus noctula* humerus.

## УДК 591.471.36/.37:591.3:576.344

Житніков А. Я. Структурно-метаболічні особливості та динаміка заміщення хрящового скелета кістковим у наземних хребетних з різними локомоторними навантаженнями. — Представлено ембріологічні, гістологічні, гістохімічні та авторадіографічні дані по динаміці формування, структурі, особливостям мінералізації росткових хрящів та моделювання довгих і коротких кісток кінцівок тварин (Rana temporaria, Gallus domesticus, Rattus norvegicus, Nyctalus noctula) з різними умовами розвитку (личинкові, яйцеві, плацентарні) і опорно-силовими навантаженнями на скелет. Обговорюються клітинні механізми гетерохронного росту адаптації скелета кінцівок наземних хребетних до різних локомоторним і механічних навантажень. Отриманий фактичний матеріал та залучені наукові дані дозволили встановити взаємозв'язок інтенсивності біосинтезу хондроцитами епіфізарних хрящів коротких і довгих кісток скелета кінцівок сульфатованих глікозаміногліканів з темпами їхнього термінального диференціювання і швидкістю росту. Встановлено, що регулювання обсягу хрящової і кісткової тканини у зонах заміщення і остеогенезу довгих і коротких кісток здійснюється шляхом зміни темпів і масштабності структурної трансформації хондроцитів і матриксу епіфізарних хрящів. Міцністні властивості та функціональні можливості кісток кінцівок різних груп хребетних тварин досягаються в онтогенезі за рахунок посилення кальцифікації матриксу епіфізарних хрящів, що містять гіпертрофовані хондроцити, і збільшення відносної кількості компонентів ендохондральної кістки у зонах метафізів. У процесі постнатального розвитку скелета тварин, коли виконання локомоторних функцій значною мірою відбувається при різній масі тіла і пов'язане з подоланням гравітації, активуються локальні регуляторні системи у зонах росту та моделювання скелета, що забезпечують інтенсивну мінералізацію хряща і сприяють посиленню конструкції кісток.

Ключові слова: хребетні, розвиток, епіфізарні хрящі, кістки кінцівок, мінералізація, ремоделювання.