

УДК 599:591.83

П. М. Мажуга

СТРУКТУРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАМЕЩЕНИЯ ХРЯЩА В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ СКЕЛЕТЕ

Введение

Гиалиновый хрящ уступает место кости благодаря последовательной деятельности своеобразных капиллярных структур, клетки которых выполняют одновременно функцию разрушителей и созидателей. Этими действиями клеток начинается энхондральный процесс, они же продолжают его в течение всего периода роста кости, такими же действиями достигается вторичная перестройка остеонной структуры кости и адаптивное моделирование всей ее архитектоники. Созидательная деятельность привносимых в хрящ клеток включает однако еще один параллельный гистогенетический процесс — формирование костного мозга. И костный и миелоидный гистогенез совершаются поэтому на единой материальной основе, взаимосвязаны топографически, но по времени, по крайней мере у высших позвоночных, построение энхондральной кости несколько опережает появление очагов миелогенеза. Если исходить из результатов специальных опытов (Willis, 1936; Urist, McLean, 1952; Felts, 1955, 1959; Holtrop, 1967), то в подготовленной к замещению хрящевой закладке остеогенез разворачивается без внешних индуктивных влияний. Однако в других работах (McLean, Urist, 1961) замещение хряща костью описывается как «инвазия» и эрозия со стороны прилежащих к хрящу клеток мезенхимы. При этом, по данным Шенка, Вайнера и Спиро (Schenk, Weiner, Spigo, 1968), в эпифизарную пластинку проникают сосуды в виде почек, заполняющих собой лакуны рассасывающегося хряща. То есть, кровеносные сосуды, сохраняя свое обычное состояние, как бы пассивно следуют за уходящим по каким-то причинам хрящем. Поднятые здесь вопросы о порядке замещения хряща касаются также источников остеогенных клеток эндоста, выяснить которые без последовательной регистрации событий, происходящих в энхондральном процессе, довольно трудно. Дуарен и др. (Le Douarin, Houssaint, Jotereau, Belo, 1975) считают, например, что остеобласты, остециты и даже стромальные клетки костномозговой ткани происходят из перихондра. В действительности же клетки перихондра не имеют доступа вглубь хряща. Цель нашего исследования — выяснение последовательных структурных изменений, происходящих в энхондральном процессе, и механизмов замещения хряща.

Материал и метод

Исследовали плечевые и бедренные кости белых крыс и телят с момента появления первого локуса энхондральной резорбции в диафизе до раннего постнатального периода развития. Для получения гистологических срезов фиксированные в 6%-ном формалине объекты после декальцинации заливали в парафин. Срезы толщиной 6—8 мкм окрашивали по Делафильду и методом, специально модифицированным нами (Мажуга, Вечерская, 1974) для окрашивания срезов костно-хрящевой ткани. По-

следовательное распространение энхондрального процесса оценивали путем сопоставления серии гистологических срезов диафизарных и мета-эпифизарных зон хрящевой закладки. Архитектонику кровеносного русла и устройство терминальных его отделов в зонах замещения хряща определяли на препаратах, в которых предварительно производили инъекцию сосудов китайской тушью (Мажуга, 1966).

Результаты и обсуждение

Инвазия кровеносных сосудов в хрящевую закладку начинается проникновением единичных капилляров, состоящих из эндотелиальных и периваскулярных клеток с ограниченным содержимым внутри капиллярной трубки (Мажуга, 1961, 1966; Trueta, Little, 1960; Schenk et al., 1968). В подготовленном к замещению хрящевом диафизе хондроциты достигают предельного набухания (Мажуга, 1967). Внедрением в такой хондроцит капилляра со стороны периоста и образуется первый локус энхондрального процесса. Точнее говоря, при возникновении первых локусов замещения и в дальнейшем по всему фронту резорбции хряща происходит не вращение, а прорыв капиллярных сосудов в набухшие хондроциты. Этому способствует, с одной стороны, прогрессирующее гидростатическое напряжение внутри гипертрофированных хондроцитов и, с другой — резорбция ограничивающего хондроцит матрикса хряща прилежащими к нему периваскулярными клетками капилляра. Синхронное сочетание взаимонаправленных процессов определяет конкретные места инвазии в хрящ сосудов и скорость их последовательного (от клетки к клетке) распространения, т. е. темпы резорбции. На препаратах с инъецированными кровеносными сосудами в свое время мы определили, что сосудистые терминалы фронта замещения и подлежащей зоны дифференцирующегося суставного хряща устроены в виде капиллярных клубочков, на поверхности которых обычно имеются почковидные выросты. Взаимодействия между хрящом и проникающими в него сосудами обеспечивается благодаря непосредственному контакту с хрящевым матриксом как самих капиллярных клубочков, так и отпочковывающихся от них выростов. Эффект резорбции хряща достигается не формой капиллярного сосуда, а присутствующими на нем периваскулярными клетками. При наблюдении под электронным микроскопом Шенк, Вайнер и Спиро (1968) выявили у периваскулярных и эндотелиальных клеток отростки типа псевдоподий и связывают их наличие со способностью этих клеток к амебоидным движениям. Можно полагать, что количественное перераспределение периваскулярных клеток по капиллярным терминалам и повышенная концентрация в зоне замещения достигается активными перемещениями. Похоже, что стимулы активации периваскулярных клеток к передвижениям исходят от каких-то продуктов, выделяемых гипертрофированными хондроцитами. Во всяком случае, инвазия кровеносных сосудов в хрящ начинается там, где хондроциты достигают определенной степени зрелости по метаболическому показателю. В других условиях хрящ и соседствующие с ним кровеносные сосуды могут оставаться взаимотерпимыми неопределенно долгое время. Вполне вероятно, что время, темпы и масштабы энхондрального процесса определяются качественной стороной биосинтеза в клетках хрящевых закладок. В настоящее время можно лишь констатировать, что механизм последовательного продвижения сосудов вглубь хряща формирует архитектуру вновь строящегося кровеносного русла не только в зоне субституции, но и в костном мозге в целом. Схематически это выглядит следующим образом.

В известный период времени вокруг центральной зоны диафиза хрящевой закладки деятельностью остеобластов периоста образуется костная манжетка. Как сам дифференцирующийся периост, так и создаваемая им костная манжетка содержат в большом количестве кровеносные капилляры, достигающие своими терминалями поверхности хряща (области диафиза хрящевой закладки). Кровеносные терминали в формирующемся периосте несут периваскулярные клетки, которые в местах контакта с хрящом выступают как хондрокласты; они разрушают гиалиновую матрицу. Резорбция хрящевого матрикса способствует раскрытию (прорыву) гипертрофированных хондроцитов, внутри которых набуханием уже создано повышенное гидростатическое напряжение. Таким образом каждая подошедшая от периоста к хрящу капиллярная терминаль разрушает хрящ действием периваскулярных клеток при встречном участии уже подготовленных к этому хондроцитов. Сам процесс заполнения территории хондроцита совершается на чисто физической основе. Для его рассмотрения необходимо, однако, упомянуть о некоторых деталях взаимоотношений хрящевой клетки и подошедшей к ней капиллярной терминали.

Объем гипертрофированного хондроцита в диафизарной зоне хрящевой закладки перед началом энхондрального процесса равен в среднем около 6000 мкм^3 . Размер кровеносной терминали, достигающей такой клетки со стороны периоста, находится в обычных пределах калибра кровеносного капилляра и составляет около 10 мкм по диаметру. Даже если учесть, что с хондроцитом контактирует петля капилляра, все же просвет капиллярного канала остается обычным и по отношению к емкости, занимаемой набухшим хондроцитом, он составляет весьма малую величину.

Необходимо учесть и второе существенное обстоятельство. Внутри гипертрофированного хондроцита силой гидратации белкомукополисахаридных субстратов цитоплазмы создается большое напряжение. При разрушении перемычки матрикса, ограничивающей такой хондроцит, происходит освобождение его содержимого силой гидростатического напряжения и на месте хондроцита остается довольно обширная полость с пониженным давлением. Стенка кровеносного капилляра, оказавшаяся у кратера емкости с отрицательным давлением, разрывается и в полость (камеру бывшего хондроцита) устремляется поток крови с клетками капилляра (рис. 1). Целостность капилляра у раскрытой полости нарушается таким образом двусторонне действующими силами: положительным давлением крови в капилляре при одновременном всасывающем эффекте полости в момент освобождения из нее содержимого хондроцита.

В возникшем потоке в новом пространстве клетки крови и клетки самого капилляра занимают упорядоченное положение. В результате камера бывшего хондроцита оказывается предельно заполненной клетками: в середине — эритроцитами, у стенок — эндотелием и перницидами (рис. 2). Закономерной последовательностью разветвления событий при замещении хондроцитов выдерживается в каждом случае настолько определенный порядок распределения клеток, что в терминальных лакунах линии энхондрального процесса можно легко подсчитать клеточный состав. Следует заметить, что среди массы эритроцитов, заполняющих полости хондроцитов, весьма редко встречаются другие клетки крови. Нет поэтому оснований рассматривать их как значимый источник клеточного материала в зоне замещения.

Чтобы яснее представить себе примерное количественное соотношение клеток в терминальных лакунах линии замещения, мы выборочно

произвели подсчет в одной из них. На гистологическом срезе в содержимом лакуны (по плоскости среза) выявлено: более 150 эритроцитов, 6 эндотелиальных и 14 периваскулярных клеток. У раскрытого входа в лакуну по краю ограничивающих тяжей гиалинового матрикса уже

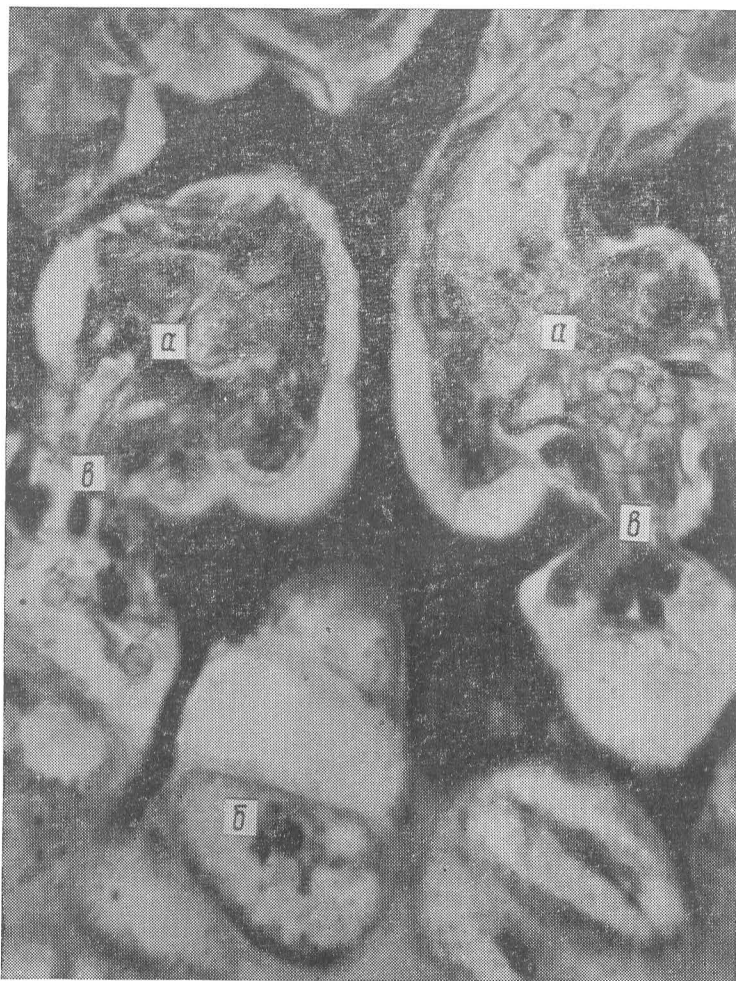


Рис. 1. Прорыв кровеносных терминалей в набухшие хондроциты с заполнением их полости клетками и содержимым капилляра: а — сосудистая терминаль; б — набухшие хондроциты; в — момент прорыва кровеносного капилляра в хондроцит (срез метаэпифизарной зоны лучевой кости теленка, 5-месячный плод; гем.-эозин по Деллафильду; об. 40, ок. 15).

отмечаются единичные остеобласты и преостеобластические стадии их дифференцировки (рис. 3). Возможно, некоторые остеобласты сдвигаются сюда действием потока при заполнении камеры хондроцитов, так как они в большом количестве имеются уже у строящихся костных балок, расположенных позади лакун. Но вероятнее всего, остеобласты дифференцируются непосредственно в терминальных лакунах из периваскулярных клеток всегда занимающих краевое положение. Второе предположение более достоверно по ряду показателей. Прежде всего, прямое взаимодействие между капиллярными терминалями и лакунами хондро-

цитов имеет место только по линии замещения. Влияние потока крови раскрывающихся капилляров и должно ограничиваться пределами самих лакун. Между тем основная масса остеобластов наблюдается у строящихся костных балок позади линии замещения, где действие открытого

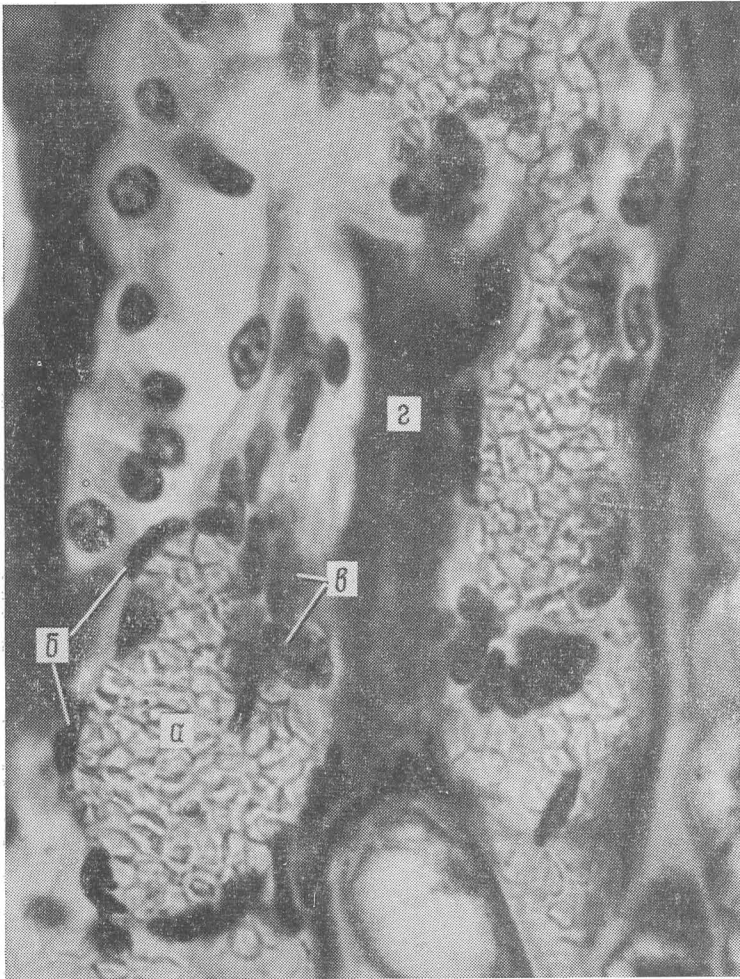


Рис. 2. Упорядоченное размещение клеток кровеносной терминали в камере освобожденного хондроцита:

a — эритроциты; *б* — эндотелиальные клетки; *в* — периваскулярные клетки; *г* — продольный (межлакунарный) тяж хрящевой матрикса (срез метаэпифизарной зоны плечевой кости телят, 5,5-месячный плод; гем.-эозин по Деллафильду; об. 40, ок. 15).

потока на них не распространяется. Другим веским аргументом в пользу развития остеобластов непосредственно в освобождающихся хрящевых лакунах из клеток, поступающих в зону резорбции с кровеносными капиллярами, является тот факт, что именно в лакунах прослеживаются стадии постепенного перехода от периваскулярных клеток до остеобластов и что количество остеобластов в каждой лакуне возрастает не сразу после проникновения в нее содержимого кровеносного капилляра, а спустя некоторое время, когда другие клетки сюда уже не поступают.

а образовавшаяся синусоидальная полость приобретает вид замкнутой структуры. Периваскулярные клетки в таких синусоидальных образованиях всегда присутствуют в большом количестве и занимают позицию между эндотелиальным пластом и стенкой хрящевой лакуны, где в по-

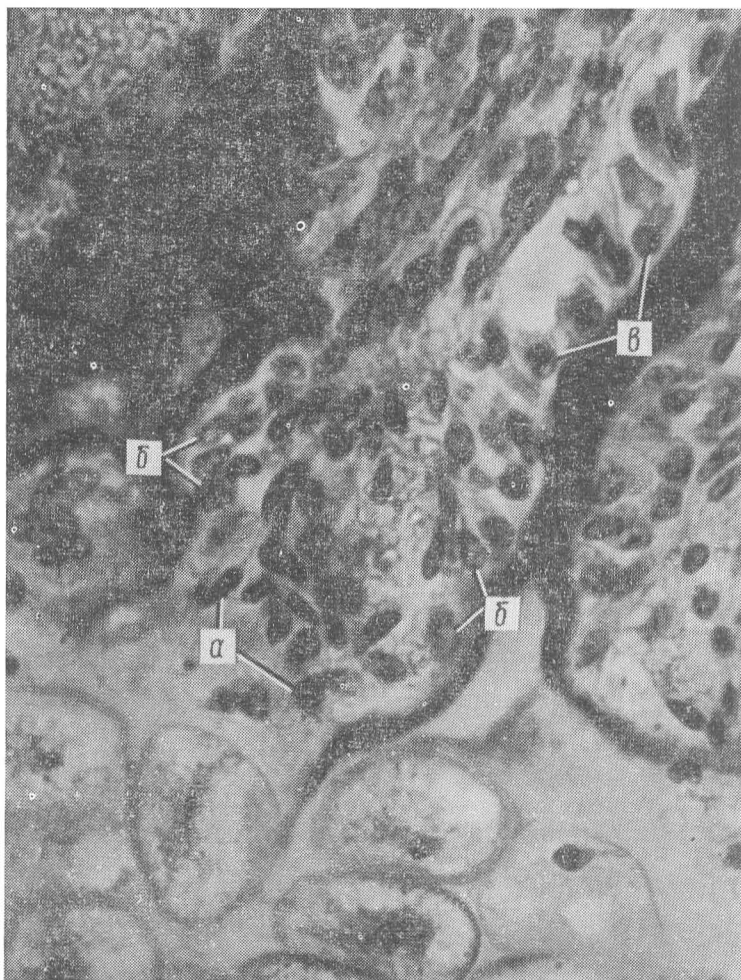


Рис. 3. Последовательные переходы между периваскулярными клетками и остеобластами в терминальной лакуне зоны замещения:

а — периваскулярные клетки; *б* — преостеобласты; *в* — остеобласты (срез метаэпифиза лучевой кости теленка, 5,5-месячный плод; гем.-эозин по Делавильду; об. 20, ок. 15).

следующем постепенно сосредоточиваются остеобласты (рис. 3). Наконец, развитие остеобластов из периваскулярных клеток в зоне энхондральной резорбции подтверждается также опытами с H^3 -тимидином. Через один час после интраперитонеального введения молодым крысам изотопа в индикаторной дозе в метаэпифизарной зоне бедренной кости оказываются помеченными (до 20%) периваскулярные клетки терминальных лакун. Судя по этому, периваскулярные клетки по фронту

замещения интенсивно пролиферируют. Между тем, здесь возрастает количественный показатель не периваскулярных клеток, а преостеобластов и остеобластов, среди которых через 6—12—24 часа после начала опыта прогрессивно увеличивается число меченных H^3 -тимидином. Это обстоятельство почти однозначно указывает на происхождение преостеобластов и остеобластов из периваскулярных клеток, особенно если учесть слабую способность остеобластов к саморепродукции.

С началом резорбции хряща прорыв капиллярных кровеносных терминалей в камеры хондроцитов приводит к образованию синусоидальных полостей, заполненных кровью, без непрерывной эндотелиальной выстилки. Эндотелиальный покров и разграничивающие перемычки в синусах образуются в лакуне в условиях возникающего здесь стаза до очередного продвижения энхондрального процесса на новые территории хрящевой закладки. Такие перестройки в ходе замещения приводят к тому, что исходная сеть капиллярных сосудов приобретает постепенно в очаге резорбции новую архитектуру, в которой преобладают расширения в виде синусов и лакун. Типичные капилляры в создающейся системе сосудов остаются в межсинусных пространствах, а также образуются вновь как дополнительные пути микроциркуляции в разветвляющихся в энхондральном очаге гистогенезах (костном и мислоидном).

Сущность и последовательность событий, происходящих в первичных и вторичных очагах замещения, не имеют принципиальных отличий, если не считать некоторых чисто морфологических особенностей, обусловленных зональной citoархитектоникой замещаемого хряща. В диафизарной области и в эпифизах хрящевой закладки хондроциты располагаются без упорядоченной ориентировки и разграничены между собой перемычками матрикса примерно равной толщины. Условия для распространения резорбции поэтому более или менее одинаковы во всех направлениях и очаг энхондрального процесса приобретает вид сферы (шара). Несколько другая обстановка складывается в зоне пролиферирующих клеток метафиза и в отдифференцировавшейся позже метаэпифизарной пластинке роста. Хондроциты в пределах изогенных групп здесь упорядоченно упакованы в продольные колонки соответственно направлению роста кости в длину. Продольные колонки хондроцитов (так называемые монетные столбики) разделены между собой сравнительно толстыми тяжами матрикса, тогда как внутри каждой колонки поперечные межклеточные перегородки имеют вид тонких пластинок (рис. 4), которые из-за ничтожной своей массы резорбируются значительно быстрее, чем продольные. По этой причине в столбиках хондроцитов резорбция во фронтальном направлении опережает резорбцию латеральных частей, которые остаются позади линии замещения в виде длинных тяжей хрящевого матрикса и используются как своего рода опорный каркас для строящихся балочек энхондральной кости, после чего они интенсивно разрушаются хондрокластами (рис. 5).

По мере распространения энхондрального процесса в складывающейся капиллярно-синусоидальной системе кровеносных сосудов постепенно дифференцируются приносящие и уносящие стволы (артерии, вены). Подобная последовательность формирования кровеносного русла в ходе остео- и миелогенеза не является исключением. И в других зачатках органов и тканей исходная система сосудов обычно представлена индифферентной капиллярной сетью, с возрастанием общей емкости которой дифференцируются артерии и вены. Развитие дополнительных структур в стенках сосудов при такой дифференцировке обеспечивается активным участием их же клеток.

Если рассматривать кровеносную систему трубчатой кости в тотальном плане (в просветленном препарате или на контрастированной рентгенограмме), то нельзя не отметить строго упорядоченного расположения сосудов всех калибров в форме пучка, конусовидно расходящегося

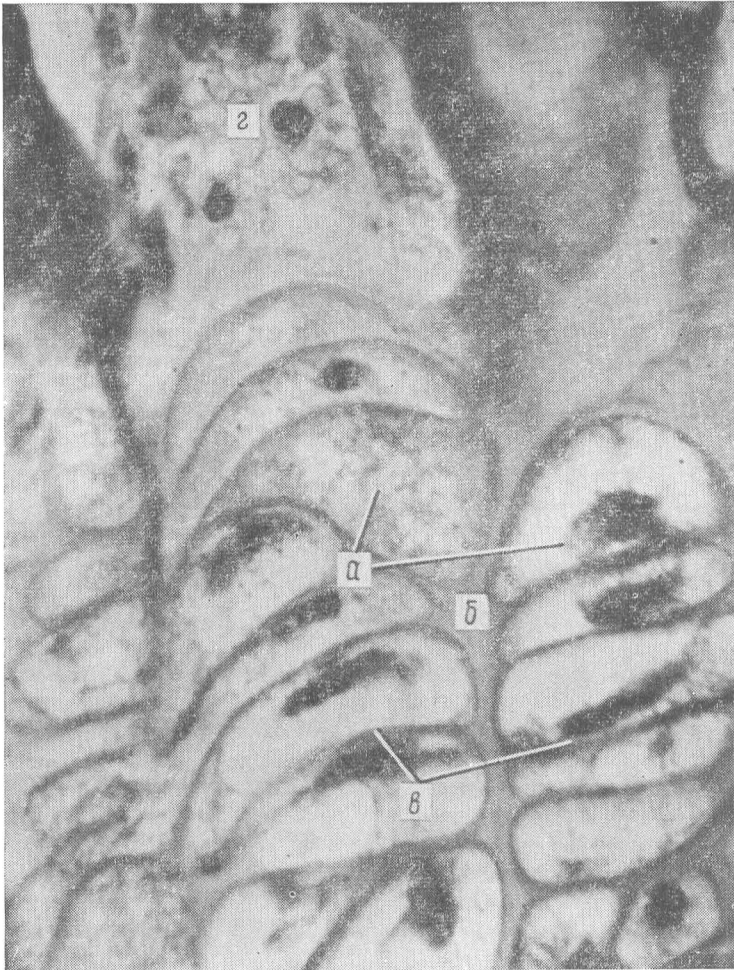


Рис. 4. Расположение в зоне замещения набухших хондроцитов в виде продольно ориентированных колонок:

a — набухшие хондроциты; *b* — продольные межколоночные перегородки хрящевой матрикса; *z* — прилегающая сосудистая терминаль (срез метаэпифиза лубочной кости теленка, 5,5-месячный плод; гем.-эозин по Деллафильду; об. 40, ок. 15).

к метафизам и ориентированного по длине кости. Не трудно понять, что такая конформация внутрикостного кровеносного русла определена самой последовательностью процесса замещения хрящевой закладки костью и аппозиционным механизмом роста кости, при котором энхондральный процесс начинается в одной точке диафиза, а прибавки кости со стороны метафизов совершаются последовательно в продольном направлении и по окружности.

В итоге можно констатировать, что формирование кровеносного русла костно-мозговой полости происходит по принципу последовательного распространения сосудов в ходе резорбции хряща. Рост внедряющихся в хрящ сосудов и образование их новых емкостей осуществляются

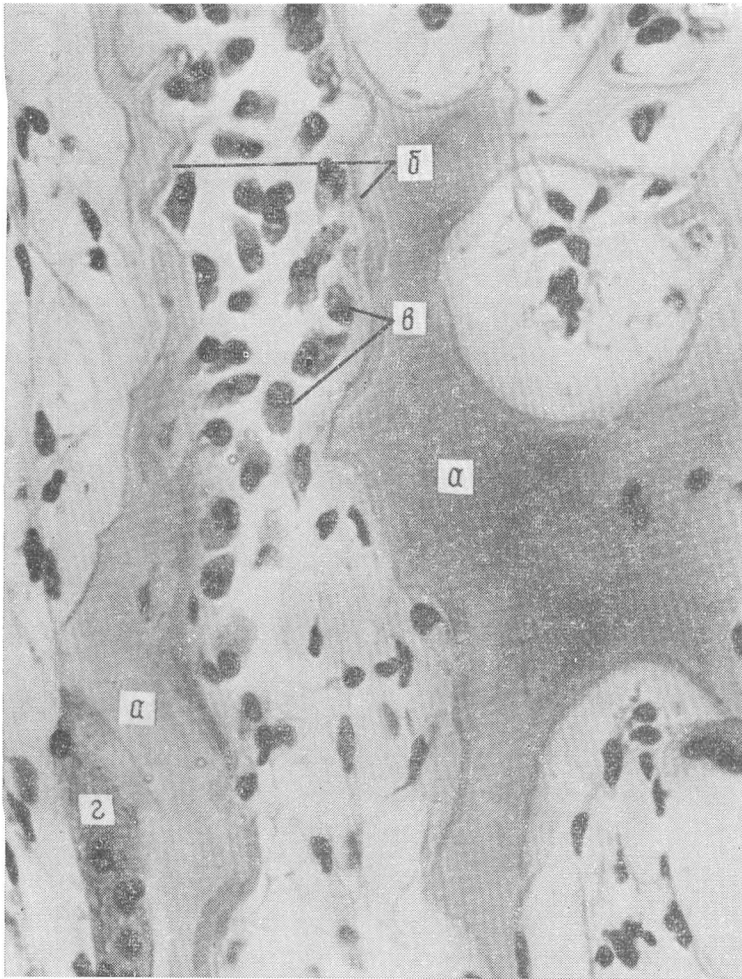


Рис. 5. Архитектоника строящейся кости в зоне замещения:
 а — тяжи хрящевого матрикса; б — пластинки новоформирующейся костной ткани; в — остеобласты; 2 — хондрокласт (срез плечевой кости теленка, 5,5-месячный плод; гем.-эозин по Майеру с докраской трипсином; об. 20, ок. 15).

за счет клеток самих же сосудов. В генезисе капилляров и синусов кости и костного мозга принимают непосредственное участие и эндотелиальные, и периваскулярные клетки. Взаимоотношения между ними и порядок ориентировки в пределах синуса или капиллярной трубки в значительной мере определяются локальными условиями, создающимися в момент освобождения содержимого разрушающихся хондроцитов и заполнения их камеры кровью. Можно предполагать, что и на последующих этапах онтогенеза в усложнениях, перестройках и физиологической

регенерации микроциркуляторной системы костного мозга также принимают непосредственное участие эндотелиальные и периваскулярные клетки самих сосудов.

ЛИТЕРАТУРА

- Мажуга П. М. Funktionelle Strukturen des Blutgefäßsystems und ihre Bedeutung in der Entwicklung des Knorpel- und Knochengewebes.—*Z. Anat. u. Entw.—Gesch.*, 1961, Bd 122, S. 539—555.
- Мажуга П. М. Функциональная морфология кровеносных сосудов конечностей человека и животных. К., «Наук. думка», 1966, 258 стр.
- Мажуга П. М. Некоторые биофизические и гистохимические особенности роста метаэпифизарного хряща. В кн.: Морфологические адаптации в онтогенезе. К., «Наук. думка», с. 18—30.
- Мажуга П. М., Вечерская Т. П. Способ комбинированного окрашивания клеточных и тканевых структур на гистологических срезах костно-хрящевой ткани.—*Цитология и генетика*, 1974, 8, № 2, с. 160—161.
- Fells W. J. L. The growth behaviour of rat whole bones as subcutaneous implants.—*Transplant. Bull.*, 1955, 2, p. 89—94.
- Fells W. J. L. Transplantation studies of factors in skeletal organogenesis. 1. The subcutaneously implanted immature long bone of the rat and mouse.—*Am. J. Phys. Anthropol.*, 1959, 71, p. 201—206.
- Holtrop M. E. The potencies of the epiphyseal cartilage in endochondral ossification.—*Proc. Koninkl. nederl. akad. van Wetenschappen*, 1967, 70, 1, p. 21—28.
- Le Douarin N. M., Haussaint E., Jolereau F. V., Belo M. Origin of haemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, N 7, p. 2701—2705.
- McLean F. C., Urist M. R. Bone. An introduction to the physiology of skeletal tissue.—*The Univ. of Chicago Press, Chicago*, 1961.
- Schenk R. K., Weiner J., Spiro D. Fine structural aspects of vascular invasion of the tibial epiphyseal plate of growing rats.—*Acta anat.*, 1968, 69, N 1, p. 1—17.
- Trueta J., Little K. The vascular contribution to osteogenesis. 2. Studies with the electron microscope.—*J. Bone a. Joint Surg.* 1960, 42, B., p. 1—11.
- Urist M. R. a. McLean F. C. Osteogenetic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye.—*J. Bone a. Joint Surg.*, 1952, 34 A, p. 443—448.
- Willis R. A. The growth of embryo bones transplanted whole in the rat's brain.—*Proc. Roy. Soc.*, 1936, 120, p. 496—501.

Институт зоологии
АН УССР

Поступила в редакцию
26.III 1976 г.

P. M. Mazhuga

STRUCTURAL MECHANISMS OF CARTILAGE REPLACEMENT
IN THE DEVELOPING SKELETON

Summary

Development of the humerus and femur as well as mechanisms of the enchondral process were studied in albino rats and calves. Invasion of blood vessels into cartilage occurs by means of the capillary terminals break into swollen chondrocytes, which is favoured by hydrostatic pressure inside the swollen chondrocytes and resorption of the cartilage matrix by perivascular cells. In the vacant cavity of chondrocytes the cells of the invading vascular terminal arrange in a strict order; osteoblasts differentiate from perivascular cells adjoining the walls of the cartilagenous lacuna. A simulacunar system of the bone marrow vessels is formed in the enchondrial process by means of the subsequent invasion of capillary terminals into the swollen chondrocytes.

Institute of Zoology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR