

РОЛЬ АКТИВИРОВАННЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В СТРУКТУРИЗАЦИИ ПЛАСТИНКИ РОСТА

Методами морфогистохимического и иммуногистохимического анализов исследованы образцы пластинок роста тел позвонков плодов свиньи, а также поросят от рождения до 40 суток. Усиление генерации активированных кислородных метаболитов, в частности свободнорадикального NO, а также повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и экспрессии белка p53 опосредуют реализацию апоптоза хондробластов и свободнорадикальное повреждение компонентов хрящевого матрикса пластинки роста тела позвонка в период ее структуризации.

Ключевые слова: пластинка роста, структуризация, поросянок, активированные кислородные метаболиты, апоптоз хондробластов.

A.V. Sakharov, A.A. Makeev, A.E. Prosenko, E.I. Ryabchikova

ROLE OF ACTIVATED OXYGEN METABOLITES IN STRUCTURIZATION OF THE GROWTH PLATES

The article deals with the research of specimens of growth plates of pigs and 40 days piglets centrams which is conducted by means of the techniques of morphohistochemistry and immunohistochemistry analyses. Intensification of generation of activated oxygen metabolites particularly of freeradical NO and increase of endocellular concentration of Ca^{2+} and expression of protein p53 mediate realization of apoptosis of chondroblasts and freeradical damage of cartilaginous matrice components of the centrum growth plate in the period of its structurization.

Key words: growth plate, structurization, piglet, activated oxygen metabolites, chondroblasts apoptosis.

Хрящевая пластинка роста тела позвонка представляет собой провизорную структуру, которая обеспечивает рост костного органа и исчезает в постнатальном периоде онтогенеза [1]. В процессе формирования пластинки роста клетки и межклеточное вещество хрящевой ткани могут являться «мишенью» для высокореакционных активированных кислородных метаболитов [2]. Высокая чувствительность хрящевой ткани к повреждению свободными радикалами обусловлена эволюционно закрепившимся дефицитом ферментов антиоксидантной защиты в клетках хондрогенного дифферона [3]. Отсутствие сведений относительно возрастных особенностей процессов перекисидации в организме свиньи и роли свободнорадикальных механизмов в морфогенезе пластинки роста явились основанием для изучения активности свободнорадикального окисления и функционального состояния системы антиоксидантной защиты в хрящевой ткани пластинки роста тела позвонка поросят.

Цель исследования – изучить состояние процессов перекисидации и активности ферментов антиоксидантной защиты в хрящевой ткани пластинки роста поросят в постнатальном периоде онтогенеза.

Материал и методы исследования. Исследования проводили на свиньях породы СМ-1. Пластины роста (ПР) тел позвонков грудного отдела забирали у плодов свиньи 8–12-недельного возраста, новорожденных поросят, а также поросят 7-, 14-, 20-, 30- и 40-суточного возраста для проведения морфогистохимических и иммуногистохимических исследований. Каждая возрастная группа состояла из 10 животных, подобранных по принципу аналогов. Для изучения общей морфологической картины готовили обзорные препараты, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Локализацию кальция в клетках выявляли по Коссу. Экспрессию белков гена p53 и vcl-2 определяли методом иммуногистохимического анализа в реакции с вторичными антителами. Интенсивность реакции на активированные кислородные метаболиты (АКМ) в образцах нативной хрящевой ткани ПР тел позвонков новорожденных поросят, а также у поросят в возрасте 7–40 суток оценивали в реакции с нитротетразолиевым синим на криостатных срезах (Hill K.S., 1978). Дифференциальное определение свободнорадикального оксида азота в хрящевой ткани ПР оценивали по локализации его селективного маркера – фермента NO-синтазы на замороженных срезах (Mayer B., 1995).

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. В морфологическом отношении пластинка роста тел позвонков представлена типичным гиалиновым хрящом, в котором определяется ряд закономерно расположенных анатомических зон, характеризующихся особенностями их структурно-функциональной организации. В постнатальном периоде онтогенеза строение пластинки роста претерпевает существенные изменения, которые связаны с ее структуризацией. На обзорных препаратах в структуре пластинки роста плодов свиньи и новорожденных поросят четко определяются резервная зона, зона пролиферации, созревания, гипертрофии и зона остеогенеза. Данные морфометрического анализа (рис. 1, а) показывают, что в плодном периоде (8, 12 недель гестации) высокая интенсивность роста обеспечивается сопряжением хондрогенеза и остеогенеза, что находит свое отражение в изменении показателей ширины соответствующих зон.

У поросят от рождения до 30-суточного возраста снижение интенсивности роста сопровождается изменением соответствующих морфометрических параметров ширины ПР (рис. 1, б). Широкая зона пролиферации, а также узкие зоны созревания и гипертрофии позволяют заключить, что в данный возрастной период рост тела позвонка обусловлен главным образом за счет активности хондробластов зоны пролиферации.

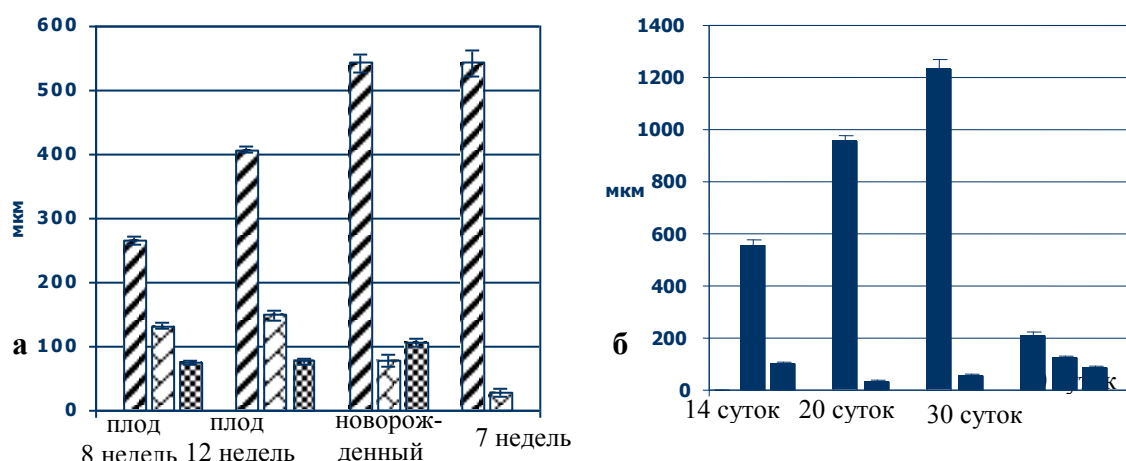


Рис. 1. Ширина пластинки роста тела позвонка свиньи:

▨ – зона пролиферации; ▤ – зона созревания; ▣ – зона гипертрофии

В исследуемых образцах ПР новорожденных поросят и поросят 7-суточного возраста отмечается начало формирования сосудистых каналов в матриксе, гибель хондробластов и деструкция хрящевого матрикса. Биологическая целесообразность разрушения хряща в толще ПР объясняется необходимостью формирования замыкающей пластинки (ЗП), которая с каудальной и краниальной сторон ограничивает тело позвонка.

У поросят в возрасте 14 суток в ПР отмечается расширение сосудистых каналов за счет активной деструкции матрикса хрящевой ткани. В цитоплазме клеток эндотелия кровеносных сосудов и хондробластов зоны пролиферации определяется умеренная реакция на АКМ и интенсивная реакция на NO-синтазу (рис. 2, а), что свидетельствует об интенсивном синтезе свободнорадикального NO, который является первичным продуктом свободнорадикального окисления. Вовлекаясь в общий окислительный процесс, его вторичные формы, такие, как пероксинитрит (ONOO-), представляют собой высокотоксичные соединения. Можно полагать, что локализация в матриксе хряща вокруг сосудистых каналов кластеров из четырех и более клеток в одной лакуне является реакцией хондробластов на повреждение АКМ, в частности свободнорадикальными NO и его производными. В цитоплазме данных клеток определяется высокое содержание Ca^{2+} (рис. 2, в), который, по данным В. Мауер (1995), повышает активность конститутивной формы NO-синтазы. Иммуногистохимическая реакция позволяет выявить в хондробластах зоны пролиферации высокий уровень экспрессии белков p53 (рис. 2, д), а маркер белка vcl-2 регистрируется лишь в единичных клетках. Можно полагать, что усиление генерации АКМ, в частности свободнорадикального NO, а также повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и экспрессии белка p53 опосредуют реализацию апоптоза хондробластов и свободнорадикальное повреждение компонентов хрящевого матрикса на периферии сосудистых каналов.

В возрасте 20 суток в центре зоны пролиферации ПР свиньи отмечается расширение фронта деструкции хрящевого матрикса. Лакуны клеток разрушены. Ядра – с признаками пикноза, а цитоплазма – в состоянии плазмореписа. В межтерриториальном матриксе отчетливо видны оксифильные демаскированные фибриллы.

В образцах ПР поросят 30-суточного возраста в клетках эндотелия сосудов отмечается резко положительная реакция на NO-синтазу (рис. 2, б). В хондробластах, локализованных на периферии сосудистых ка-

налов, определяется повышение внутриклеточного содержания Ca^{2+} (рис. 2, г) и регистрируется повышение экспрессии белков p53 (рис. 2, д). Данные клетки характеризуются отсутствием экспрессии белка bcl-2, что возможно является особенностью хондробластов провизорного хряща, поскольку деление клеток в зоне пролиферации происходит достаточно быстро и обеспечение длительного «выживания» клеток в данном компартменте ПР не является обязательным. Дистрофия клеток и матрикса вокруг сосудистых каналов приводит к оксификации и остеогенезу.

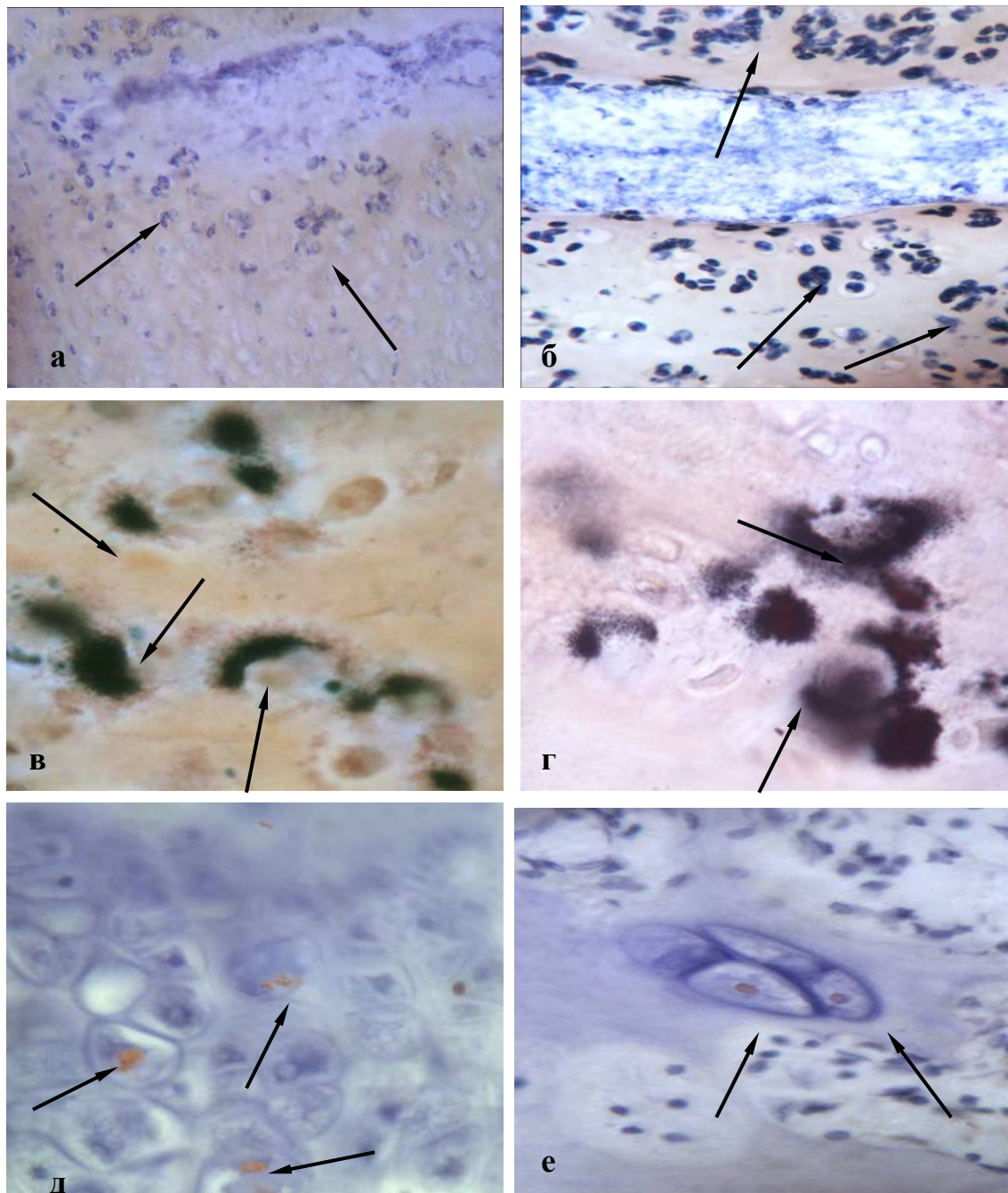


Рис. 2. Пластинка роста тела позвонка свиньи: а – поросенок 14-суточного возраста; б – поросенок 30-суточного возраста. Стрелкой обозначена локализация NO-синтазы. Крисосрезы. Реакция по В. Мауер. Ув. 200х: в – поросенок 14-суточного возраста; г – поросенок 30-суточного возраста. Стрелкой обозначена локализация кальция. Реакция по Коссу. Ув. 400 х: д – поросенок 14-суточного возраста; е – поросенок 30-суточного возраста. Стрелкой обозначена положительная реакция на белок p53. Иммунохимическая реакция на белок p53. Ув. 400 х

В возрасте 40 суток завершается структуризация ПР. Соотношение ширины всех ее зон имеет схожие характеристики с соответствующими показателями ПР тела позвонка плода свиньи 8–12-недельного возраста и является морфологическим отражением динамичного роста тела позвонка. При этом в исследуемых образцах хрящевой ткани ПР снижается уровень экспрессии хондробластами белка p53. Положительная реакция на АКМ регистрируется лишь в единичных клетках.

Объяснение механизма структуризации ПР может быть следующим. У свиньи в период 7–30 суток в ПР отмечается разобщение процессов пролиферации и синтеза компонентов матрикса хрящевой ткани. Низкая интенсивность роста тела позвонка в данный возрастной период объясняется преобладанием пролиферации хондробластов над синтезом специфических биополимеров. Морфологически это проявляется увеличением ширины зоны пролиферации ПР и уменьшением ширины ее остальных зон. Расположенные в толще гиалинового хряща хондробласты пролиферирующей зоны оказываются удаленными от источников трофики – сосудов зоны энхондрального остеогенеза с одной стороны, а с другой – межпозвонкового диска. Вследствие этого клетки подвергаются дистрофии и гибнут. Именно в этой плоскости происходит инвазия хрящевого матрикса сосудами. Наличие крупных кровеносных сосудов в зоне пролиферации приводит к увеличению напряжения кислорода, повышенной генерации эндотелиальными клетками и хондробластами АКМ, которые вызывают повреждение клеток и матрикса хрящевой ткани. Полученные результаты исследования позволяют признать свободнорадикальный NO и его свободнорадикальные производные в качестве ведущих морфогенетических факторов структуризации ПР.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что в ранний постнатальный период онтогенеза 30 суток жизни свиньи являются критическим периодом развития пластинки роста с риском ее свободнорадикального повреждения АКМ. Полученные данные расширяют имеющиеся представления о значении свободнорадикальных соединений в морфогенетических процессах и позволяют приблизиться к решению проблемы научно обоснованного управления ростом животных.

Литература

1. Орел, А.М. Развитие и изменение позвоночника / А.М. Орел // Бюл. Моск. профес. объединение мануальных терапевтов. – 2003. – № 5. – С. 99–101.
2. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 553 с.
3. Павлова, В.Н. Хрящ / В.Н. Павлова. – М.: Медицина, 1988. – 320 с.
4. Hill, K.S. Nitroblue tetrazolium (NBT) activity in human leucocytes after freezing / K.S. Hill, M. Kennedy, C. Achinders // Pathology. – 1978. – Vol.10. – № 1. – P. 69–75.
5. Mayer, B. Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases / B. Mayer // Ed. Vincent S. – London: Acad. Press, 1995. – P. 21–42.

