

РОЛЬ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В ОСТЕОГЕНЕЗЕ НА РАННИХ СТАДИЯХ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

Асадулаева М.Н.¹, Лазько А.Е.²

¹ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Республика Дагестан, Махачкала, e-mail: dgma@list.ru;

²ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Астрахань, e-mail: radmila56@mail.ru

Методами световой и электронной микроскопии, гистохимии в сравнительном аспекте исследовались локализация, содержание и спектр гликозаминогликанов в закладках бедренных костей 47 зародышей и предплодов человека женского пола при пери – и энхондральном остеогенезе в различных геохимических условиях г. Астрахани и г. Махачкалы. Установлено, что наиболее интенсивный синтез гликозаминогликанов происходит в хондроцитах зоны роста метаэпифизарного хряща закладок бедренной кости. Гистохимическими исследованиями выявлено, что на ранних стадиях остеогенеза в изучаемых геохимических регионах в хрящевых закладках бедренных костей гликозамингликаны представлены в основном малосульфатированными соединениями. На поздних стадиях пренатального остеогенеза наблюдается увеличение степени сульфатированности гликозаминогликанов закладок бедренных костей и быстрый рост содержания кератансульфата, что наиболее характерно для г. Махачкалы.

Ключевые слова: гликозаминогликаны, остеогенез, геохимические условия, хондроциты, гистогенез.

THE ROLE OF GLYCOSAMINOGLYCANS IN THE OSTEOGENEZE IN THE EARLY STAGES OF PRENATAL DEVELOPMENT OF HUMAN BEINGS

Asadulaeva M.N.¹, Lazko A.E.²

¹Dagestan state medical University, Makhachkala, Dagestan, e-mail: dgma@list.ru;

²Astrakhan state medical University, Astrakhan, e-mail: radmila56@mail.ru

By methods light and electron microscopy, histochemistry in comparative aspect studied the localization, content and range of glycosaminoglycans in bookmarks thighs 47 human female embryos in osteogenesis in different geochemical conditions, Astrakhan and Makhachkala. Found that the most intense synthesis of glycosaminoglycans occurs in the hondrocytes zone of cartilage growth meta-epiphyseal femoral bookmarks. Histochemical studies revealed that in the early stages of osteogenesis in studied geochemical regions in cartilaginous bookmarks femoral bones thighs glycosaminoglycanes are mainly, mini-sulfate compounds. In the later stages of prenatal osteogenesis there has been an increase in the degree of poly-sulfate compounds of glycosaminoglycans bookmarks thighs and the rapid growth of the content of keratinsulfate that most than for the city Makhachkala.

Keywords: glycosaminoglycans, osteogenesis, geochemical conditions, chondrocytes, histogenesis.

Рядом исследователей было установлено, что участие хондроцитов в продукции белковых и полисахаридных веществ осуществляется согласно принципу преимущественного приспособления клетки к синтезу определенного вещества, или белка, или полисахарида [5]. Эта функциональная адаптация находит свое отражение в морфологии хондроцитов. В частности, хондроциты I типа содержат умеренное количество митохондрий, небольшой комплекс Гольджи и значительное количество эргастоплазмы с многочисленными цистернами, заполненными электронноплотным веществом в виде гранул и волоконца, которые идентифицируются как тропоколлаген. Хондроциты II типа характеризуются отдельными узкими каналами эргастоплазмы без расширений, небольшим количеством митохондрий и хорошо развитой системой элементов комплекса Гольджи. В их

цитоплазме всегда обнаруживаются обширные области, содержащие хлопьевидные электроннопрозрачные вещества, которые отождествляются с полисахаридами.

Было также установлено, что взаимодействие между коллагеном и гликозамингликанами зависит от рН, ионного состава, ионной силы среды и по природе является электростатическим. Вследствие этого гликозамингликаны оказывают влияние как на фазы фибриллогенеза коллагена, так и на образование на фибриллах центров минерализации [6].

Однако следует отметить, что, несмотря на значительное количество фактов о биосинтезе протеогликанов и гликозамингликанов, подавляющее большинство из них получено на материале от низших млекопитающих и птиц. В доступной литературе отсутствует также комплексное исследование локализации, динамики накопления и изменения спектра протеогликанов и гликозамингликанов на стадиях пренатального морфогенеза трубчатых костей человека, к которым относятся бедренные кости, в регионах с резко различающимся набором микроэлементов в окружающей среде.

В связи с этим **целью исследования** явилось сравнительное изучение изменений содержания и спектра гликозамингликанов в закладках бедренных костей человека при пери- и энхадральном остеогенезе в различных геохимических условиях.

Материал и методы исследования

Материалом исследования служили бедренные кости и их закладки 47 зародышей и предплодов женского пола, полученных в результате искусственного прерывания беременности у практически здоровых женщин, и преждевременных родов, обусловленных экзогенным воздействием, из прозектур, акушерских и гинекологических клиник г. Астрахани и г. Махачкалы в осенне-зимний период.

Для электронномикроскопического исследования локализации гликозамингликанов ультратонкие срезы контрастировали на сетках 0,5 % раствором нитрата висмута [7].

Содержание гликозамингликанов в закладках бедренных костей оценивали визуально под световым микроскопом в баллах [3].

С целью выявления сульфатированных гликозамингликанов парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм обрабатывались 0,5 % раствором коричневого основного [4].

Разделение исследуемых гликозамингликанов по степени кислотности, в значительной степени зависящей от количества сульфогрупп, достигалось применением окраски 0,5 % раствором толуидинового синего при различных кислых значениях рН медиал-ацетатного буфера, применяемого в качестве растворителя краски. При рН = 2,62 выявлялись кислые высокосульфатированные гликозамингликаны, а при рН = 6,12 – менее кислые, низко сульфатированные вещества этой группы [2].

Количественные данные, полученные в ходе выполнения исследования, проанализированы методами вариационной статистики и определения достоверности различий с использованием утилиты OpenOffice Calc из свободно распространяемого программного продукта OpenOffice.

Результаты исследования и их обсуждение

На всех рассматриваемых стадиях остеогенеза (6–12 недели внутриутробного развития) наиболее интенсивный синтез гликозамингликанов происходит в хондроцитах зоны роста метаэпифизарного хряща закладок бедренной кости; они хорошо локализируются в эндоплазматической сети и комплексе Гольджи (Рис.1). В зонах гипертрофии и дегенерации наблюдалось меньшее число хондроцитов с признаками синтеза полисахаридной части матрикса хряща, что характерно и для Астрахани, и для Махачкалы. Межклеточное пространство зон гипертрофии и дегенерации метаэпифизарного хряща содержат гликозамингликаны в виде составе электронноплотных везикул матрикса разной величины, в среднем $12,0 \pm 2,3$ нм, которые или связаны с волокнами коллагена, или располагаются в межклеточном пространстве свободно.

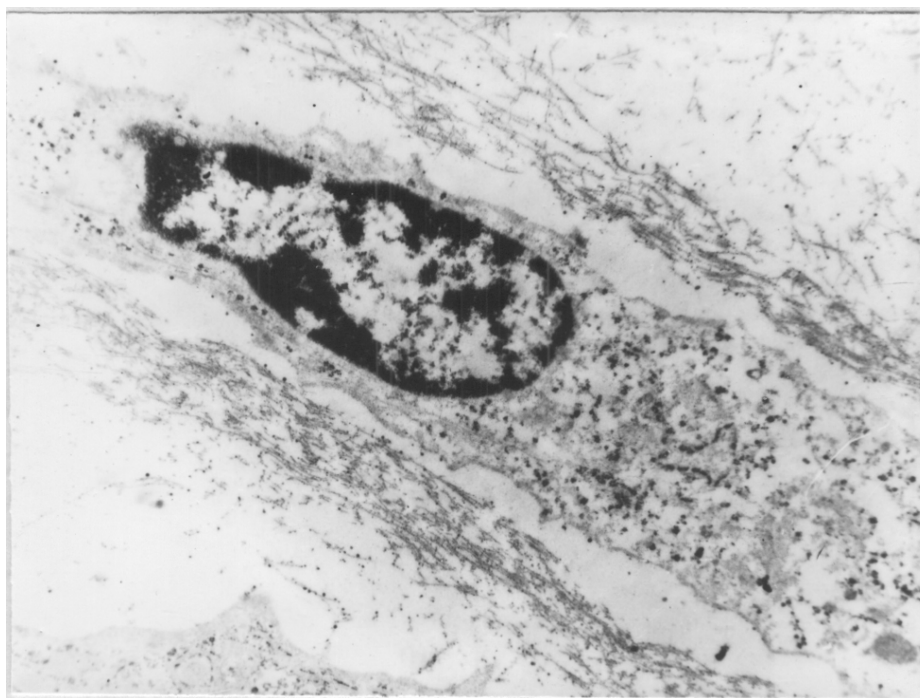


Рис. 1. Интенсивное контрастирование мембран эндоплазматической сети и комплекса Гольджи в хондроцитах зоны роста метаэпифизарного хряща закладки бедренной кости предплода человека 9 недель из г. Махачкалы. Обработка препарата по Смити-Серафини-Фракассини. Ув.х 10000

Гистохимическое исследование качественного состава и динамики накопления гликозамингликанов с использованием специфических топооптических реакций показало, что на ранних стадиях остеогенеза у человека (6–8 недель внутриутробного развития) в изучаемых геохимических регионах в хрящевых закладках бедренных костей

гликозамингликаны представлены в основном несulfатированными соединениями. Подтверждением тому является красно-фиолетовое (В-метахроматическое) окрашивание на 2 балла толуидиновым синим с рН 6,12 гистологических препаратов хрящевых закладок и светло-желтое их окрашивание на 1 балл основным коричневым.

Относительно невелико содержание хондроитинсульфата, о чем свидетельствует слабо положительная реакция на 2 балла в территориальном матриксе эмбрионального хряща закладок при обработке срезов 0,4 М раствором хлористого магния с альциановым синим, тогда как применение красящего раствора с 0,9 М хлористым магнием приводило к бледно-голубому окрашиванию (0, 1 балл).

Таким образом, представляется весьма вероятным, что хондроитинсульфат в многоклеточном веществе хрящевых закладок бедренных костей человека 6–8 недель внутриутробного развития и в г. Астрахани, и в г. Махачкале представлен слабо sulfатированными формами и локализуется в основном в территориальном матриксе.

Количество креатинсульфата минимально и в территориальном и в межтерриториальном матриксе. В зонах роста и гипертрофии метаэпифизарного хряща закладок бедренных костей на 9,10 неделях пренатального развития отмечается яркое красно-фиолетовое окрашивание межклеточного вещества хряща (3 балла) толуидиновым синим при рН буферного раствора 6,12; диффузное бледное красно-фиолетовое при рН 2,62 (2 балла) (Рис.2).

Реакция с коричневым основным приводит к развитию в этих зонах насыщенного желтого окрашивания на 2 балла матрикса хряща.

Суммарная гистохимическая реакция на хондритинсульфат и кератансульфат дает ярко-голубое окрашивание (3 балла) особенно в межтерриториальном матриксе хряща зоны гипертрофии.

Следовательно, локализация и выраженность гистохимических реакций позволяют заключить, что в зоне роста и гипертрофии костных закладок 9, 10 недель нарастает количество кислых гликозамингликанов, представленных в основном хондритинсульфатами со средней степенью sulfатированности. На данных стадиях онтогенеза количество кератансульфата увеличивается в межтерриториальном матриксе зоны гипертрофии хрящевых закладок, особенно в г. Махачкале.

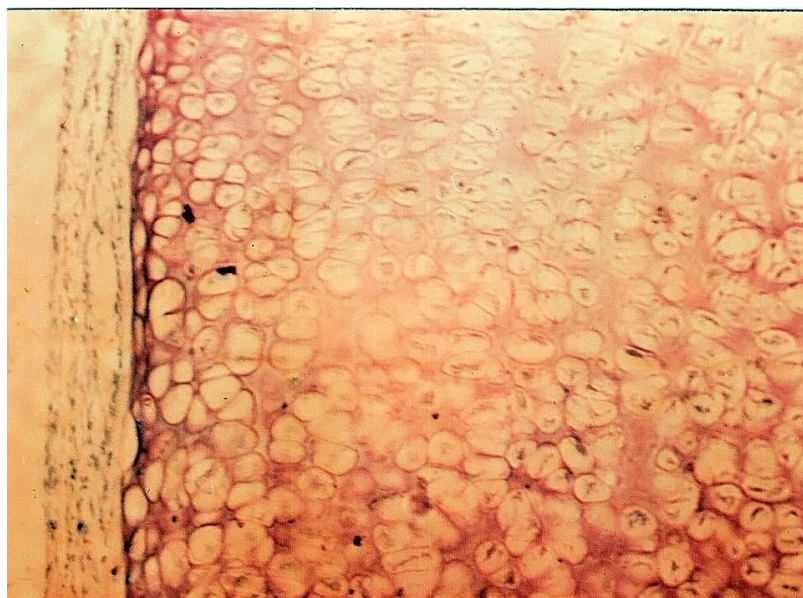


Рис.2. Метахроматическое окрашивание тулуидиновым синим (рН 2,62) межклеточного вещества зоны гипертрофии метаэпифизарного хряща закладки бедренной кости предплода человека 9 недель пренатального развития из г. Астрахани. Окраска по Пирсу. Об. 10, ок. 10

На стадиях 9,10 недель внутриутробного развития обработка срезов раствором коричневого основного по Шубичу приводит к окрашиванию в закладке кости межклеточного вещества зоны дегенерации в желто-коричневый цвет (3 балла). Окраска альциановым синим суммарна на хондроитинсульфат и кератансульфат вызывает яр-голубое окрашивание (3 балла) межклеточного матрикса как территориального, так и межтерриториального, зоны дегенерации метаэпифизарного хряща закладок бедренных костей человека на стадиях 9,10 недель внутриутробного развития человека (Рис. 3).

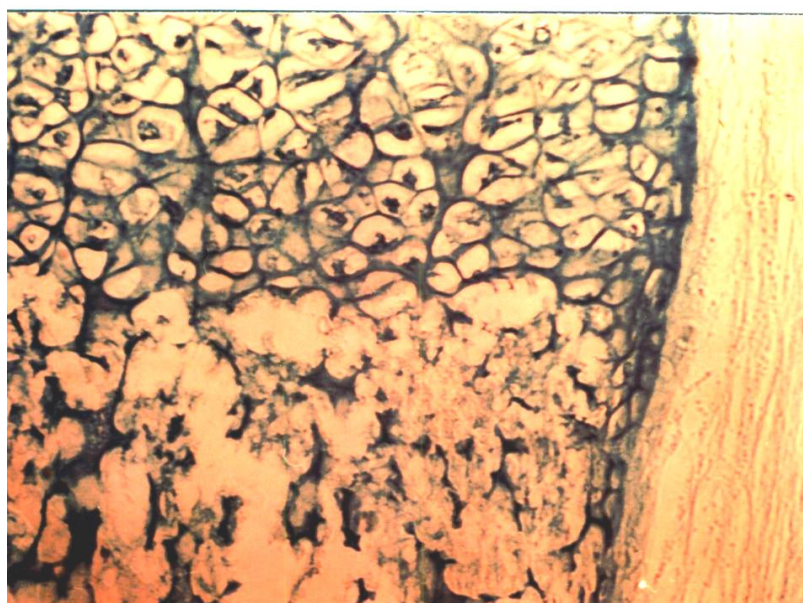


Рис. 3. Суммарная реакция с альциановым синим на хондроитинсульфат и кератансульфат в зонах гипертрофии и дегенерации метаэпифизарного хряща закладки бедренной кости предплода человека 9 недель пренатального развития из г. Астрахани. Окраска по Шубичу – Лопуновой. Об. 10, ок. 10

Обсуждение полученных результатов

Проведенное исследование показало, что процессы оссификации и минерализации в закладках бедренных костей человека на ранних стадиях пренатального онтогенеза (6 – 12 недель внутриутробного развития) связаны со значительными изменениями в синтезе, качественном составе и динамике накопления гликозаминогликанов.

Наиболее активный внутриклеточный синтез гликозаминогликанов наблюдается в хондроцитах зоны роста метаэпифизарного хряща. Секреторные вакуоли от комплекса Гольджи мигрируют к цитолемме, нагруженные молекулами протеогликанов, для экзоцитоза.

Если мы будем двигаться к зоне гипертрофии, то увидим, как синтез протеогликанов в хондроцитах постепенно затухает, но зато возрастает количество этих веществ, аккумулированное хрящевыми клетками на наружной поверхности своей цитолеммы и локализующееся в межклеточном пространстве.

Гликозаминогликаны, зафиксированные на поверхности цитолеммы хондроцитов, возможно, предназначены для формирования полноценных везикул матрикса, так как нами четко определено наличие этих полисахаридов в составе данных образований.

Принимая во внимание высокую аффинность ионов кальция к молекулам гликозаминогликанов, заслуживает внимания предположение, что эти вещества в мембране везикул матрикса играют роль первичных аккумуляторов кальция, необходимых для образования ядер кристаллизации. Не подлежит сомнению, что эту функцию гликозаминогликаны могут полноценно выполнять только в содружестве с другими факторами минерализации, в частности, с липидами и фосфолипидами.

Как показало гистохимическое исследование с применением характерных топооптических реакций на протеогликаны, в процессе развития закладок бедренных костей человека на стадиях от 6 до 12 недель пренатального развития в гиалиновой зоне, зонах пролиферации, роста и гипертрофии метаэпифизарного хряща наблюдается отчетливое уменьшение более нейтральных низкосульфатированных гликозаминогликанов с одновременным увеличением содержания веществ этой группы, проявляющих кислотный характер – хондроитинсульфатов и кератансульфата.

Данный процесс более активен в закладках из зоны с повышенной минерализацией окружающей среды.

Отмечается также тенденция к увеличению степени сульфатированности гликозаминогликанов закладок бедренных костей по мере развития зародыша и предлода человека. Интересен более быстрый рост содержания кератансульфата, что также в большей степени характерно для г. Махачкалы, – наиболее сульфатированного представителя данной

группы полисахаридов, который, по мнению В.О. Песчанского [1], играет значительную роль в созревании оссифицирующегося хряща и подготовке его к минерализации.

С началом замещения хряща костной тканью, количество гликозаминогликанов, особенно кислых, в зонах минерализации и резорбции хрящевых закладок, по данным гистохимического исследования, значительно уменьшается, что, возможно, объясняется вступлением их в химические связи, необходимые для дальнейшего хода процессов остеогенеза и минерализации.

Относительно биологической роли той динамики накопления и изменения качественного и количественного состава гликозаминогликанов в хрящевых закладках бедренных костей человека, которую мы выявили, можно сделать предположение, что гелеобразные структуры из макромолекул протеогликанов, где преобладающим углеводным компонентом являются гиалуроновая кислота, как представитель несulfатированных гликозаминогликанов, или хондроитинсульфат и кератансульфат, относящихся к sulfатированным, значительно отличаются одна от другой по плотности и гидратированности. Наименее плотен и наиболее гидратирован гель, имеющий в своем составе преимущественно гиалуроновую кислоту, а наиболее плотен и наименее гидратирован, соответственно, гель с преобладанием кератансульфата.

Таким образом, накопление в хрящевом матриксе хондроитинсульфатов и, особенно, кератансульфата не может не отразиться на функции матрикса, так как делает его все более плотным и, следовательно, затрудняет транспорт в нем. Это приводит с течением времени к ухудшению условий существования хондроцитов, обуславливает дегенерацию и разрушение их. Изменение качественного состава матрикса хряща закладок – замещение в нем гидрофильных гликозаминогликанов гидрофобными высокосulfатированными приводит к вытеснению из матрикса воды, гипергидратируя хондроциты.

Всё это приводит, в конце концов, к полной дегенерации хондроцитов и их разрыву. Освобождающиеся при этом силой гидростатического давления полость гипертрофированного хондроцита заполняется периваскулярными, эндотелиальными и клетками крови, что является жизненно важным для процесса остеогенеза.

Резюмируя вышеизложенное с точки зрения влияния повышенного содержания микроэлементов, в частности, меди и селена, в окружающей среде на оссификацию и минерализацию закладок бедренных костей, необходимо признать активизирующее влияние этого внешнего фактора на данные процессы. Максимум этого влияния приходится на период от 9 до 10 недели пренатального развития человека. На более поздних стадиях онтогенеза воздействие повышенной минерализации на остеогенез прогрессивно уменьшается.

Список литературы

1. Песчанский В.С. О ШИК-позитивном веществе в матриксе оссифицирующихся хрящей, эмбрионов и плодов человека // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1973. – Т.65, № 12. – С.46-49.
2. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная [Текст] / Э.Пирс. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
3. Шаповалов Ю.Н. Полисахариды в тканях зародыша человека второго месяца развития // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1962. – Т.42, № 1. – С.46-53.
4. Шубич М.Г. Метод элективной окраски кислых (сульфатированных) мукополисахаридов основным коричневым // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1961. – № 2. – С.116-119.
5. Mazhuga P.M., Cherkasov V.V. Adaptive distribution of specific biosynthesis in a homogeneous population of the articular cartilage chondrocytes // Z.mikrosk. -anat. Forsch. – 1974. – Bd. 88, № 2. – S.364–374.
6. Öbrink B. A study of the interactions between monomeric tropocollagen and glycosaminoglycans // Eur.J.Biochem. – 1973. – Vol. 33. – P.387-400.
7. Serafini-Fracassini A., Smith F.W. Observations on the morphology of the proteinpolysaccharide complex of bovine nasal cartilage and its relationship to collagen // Proc. Roy. Soc. Ser. B. – 1966. – Vol. 165. – P.440-449.