

ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ КРЕСТООБРАЗНОГО КОМПЛЕКСА КОЛЕННОГО СУСТАВА ЧЕЛОВЕКА: I. ЗАКЛАДКА И ПЕРВИЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

А.Н. Макаров¹, С.П. Миронов², М.П. Лисицын², В.Б. Никитин¹, В.И. Гулимова¹, С.В. Савельев¹

¹ Институт морфологии человека

² Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва

Исследованы ранняя закладка, морфологическая и иммуногистохимическая дифференцировка крестообразного комплекса у 26 эмбрионов и плодов человека от 6 до 13,5 нед пренатального развития. Показано, что связки крестообразного комплекса формируются у эмбрионов 6–6,5-недельного возраста из скелетогенной мезенхимы, расположенной между зачатками костей голени. Первые признаки дифференциации передней и задней крестообразных связок обнаруживаются у эмбрионов 7,5–8 нед развития. Задняя связка формируется из двух независимых закладок. Одна из них идет от большеберцовой кости к малоберцовой, а другая — от малоберцовой к большеберцовой. Первый компонент прикрепляется к передней части большеберцовой кости, второй — к задней. На середине пути от большеберцовой кости они сливаются и присоединяются к бедренной кости в одной точке. Передняя крестообразная связка также формируется из двух частей, однако оба компонента имеют одни и те же точки прикрепления. С 10-й недели начинается васкуляризация комплекса. Она сопровождается формированием продольных пучков волокон, которые образуются в результате «нарезания» целостной мезенхимной закладки сосудами. С 12-й недели развития между полосами мезенхимы происходит слияние моноцитов и формирование 4–8-ядерных остеокластов, которые фрагментарно резорбируют хрящевые элементы скелета в зонах крепления связок. Образующиеся каналы заполняются фибробластами, сращивающими связки со скелетом. Эти события происходят в отсутствие синтеза коллагена III типа, который не экспрессируется в исследованном периоде.

Twenty six human abortive embryos (6–13.5 weeks of prenatal development) were for the study of cruciate complex embryonal differentiation. Serial histological mounts (8–12 mkm) were prepared from leg fragments with knee joint. Mallory, hematoxylin-eosine and antibody for collagen III were used for staining. Human cruciate complex appears in embryos at 6–6.5 weeks of development. It differentiates from the mesenchyme lying between tibia and fibula. Starting from 8.5–9 weeks the anterior and double-component posterior ligaments, which begin to vascularize on the surface, can be distinguished. At the age of 13 weeks both components of posterior ligament fuse and the complex itself starts to vascularize throughout the whole mass.

Комплекс крестообразных связок коленного сустава человека является мультифункциональной структурой, выполняющей как механические, так и сенсорные функции. Крестообразная связка взрослого человека состоит из коллагеновых волокон различных типов, организованных в пучки и разделенных соединительнотканной оболочкой. Эта оболочка содержит большое количество сосудов и нервных волокон. Такая структурная организация нетипична для большинства связок человека. В то же время при хирургическом лечении крестообразного комплекса основные проблемы возникают с созданием трансплантата, его надежным закреплением и реальным восстановлением функциональной системы. На сегодняшний день доминирующим подходом к лечению стало модифицированное механическое замещение частей или всего крестообразного комплекса. При таком способе добиться полного восстанов-

ления морфофункциональной организации этой системы невозможно. Причинами этого являются несоответствие механических свойств крестообразного комплекса и трансплантата, утрата трансплантатом способности к выполнению рецепторных функций, относительно быстрое разрушение трансплантата.

При создании жизнеспособного искусственно-го трансплантата мы столкнулись с необходимостью детального анализа нормального развития крестообразного комплекса. В настоящее время отсутствуют подробные сведения как о морфогенезе самой связки, так и о механизмах ее эмбрионального прикрепления к бедру и голени. Нет четких данных о формировании разнонаправленных пучков волокон связки, последовательности васкуляризации и иннервации. Вместе с тем эффективное решение проблем реиннервации и реваскуляризации морфогенетически активных

протезов крестообразного комплекса возможно только при детальном изучении происхождения, эмбрионального развития, дифференцировки и пространственной организации крестообразного комплекса [3, 8, 9]. До сих пор подобные исследования носили отрывочный характер и не вскрывали механизмов эмбрионального морфогенеза крестообразного комплекса человека.

Целью настоящей работы было установление морфогенетических закономерностей закладки, эмбриональной дифференцировки и крепления связок к бедру и голени [1, 2]. Прояснение механизмов этих процессов необходимо для разработки морфогенетических способов сращивания жизнеспособных связок при хирургических операциях. При анализе развития крестообразного комплекса человека мы использовали моноклональные антитела к коллагену III типа для оценки степени дифференцировки эмбриональной связки. Этот тип коллагена является одним из структурных компонентов связок человека, испытывающих значительные механические нагрузки. Его наличие принято считать эмбриональным маркером дифференцировки фибробластов. Еще одним аспектом эмбриологических исследований было выяснение основных этапов васкуляризации и иннервации связок крестообразного комплекса, что могло бы послужить основой для стимуляции этих процессов при оперативном вмешательстве.

Материал и методы

Исследовано 26 эмбрионов и плодов человека от 6 до 13,5 нед пренатального развития, полученных при искусственных абортах, не связанных с генетическими нарушениями развития плода. Из целых эмбрионов или фрагментов нижней конечности с коленным суставом готовили серийные гистологические срезы толщиной 8–12 мкм, которые окрашивали по Маллори и гематоксилином. По сериям гистологических срезов производили графические и пластические реконструкции, которые использовали для анализа пространственных преобразований развивающегося крестообразного комплекса. Проводили оценку ориентации длинных осей ядер недифференцированных фибробластов по методике, предложенной А. Гурвичем [4].

Для иммуногистохимических исследований использовали парафиновые серийные срезы толщиной 10 мкм, полученные по традиционной технологии. После депарафинизации в ксилоле срезы обезвоживали в ряде спиртов и обрабатывали трипсином (0,25%), растворенным в трис-буфере с pH 7,6, в течение 30 мин при 37°C. После этого срезы инкубировали 30 мин при 37°C с первичными моноклональными антителами к коллагену III типа. Первичные антитела разводили в трис-

буфере с 0,1% Triton X-100. Использовали антитела к коллагену III типа при разведении 1:1000. При этом их концентрация составляла 10 нг/мл. Вторичные антитела кролика к Ig мыши, меченные флуоресцином FITC, при разбавлении 1:25 инкубировали с отмытыми от первичных антител срезами 80 мин. Для контроля применяли истощение антител с известным антигеном и последующими стандартными реакциями. Срезы после окончания иммуногистохимического исследования окрашивали гематоксилином. Материал исследовали в флуоресцентном микроскопе Leica DMLS с видеосистемой Sony SSC-DC50P, YS-W150 и цифровом видеоанализаторе.

Результаты

У эмбрионов в возрасте 5–5,5 нед между закладками бедра и голени находится недифференцированная скелетогенная мезенхима, которая является источником формирования как скелета, так и связок крестообразного комплекса (рис. 1 и 2, а). Первые признаки дифференцировки в зоне крестообразной связки человека обнаруживаются у эмбрионов 6–6,5-недельного возраста. Связка формируется из участка мезенхимы, расположенной между бедром и голенью. Морфологическое обособление связки выглядит как компактизация групп мезенхимных клеток. Этот процесс носит поляризационный характер и начинается от геометрической оси бедро—голень (рис. 2, б). Вблизи этой зоны, на поверхности бедра или голени, несколько клеток скелетогенной мезенхимы вытягиваются под небольшими углами к оси. Соседние клетки растягиваются (поляризуются) по отросткам первых поляризованных клеток. Процесс носит характер самоорганизации и останавливается при столкновении клеток мезенхимы с поверхностью бедра или голени (рис. 1, а). В зоне формирования крестообразного комплекса обнаружено по меньшей мере четыре таких очага поляризации, которые являются предшественниками компонентов связки. Необходимо отметить, что крестообразный комплекс формируется из скелетогенной мезенхимы, которая не мигрирует в зону между бедром и голенью, а сохраняется там с момента дифференцировки скелета.

Первые признаки дифференциации передней и задней крестообразных связок обнаруживаются у эмбрионов 7,5–8 нед развития. В этот период связки выглядят как гетерогенное скопление клеток, соединяющее бедро и голень. В этом скоплении четко выделяются закладки передней и задней крестообразных связок, хотя они не имеют специализированных оболочек или цитологических различий. Их морфологическая обособленность заключается в различной ориентации поляризованных фибробластов, входящих в состав каждой из

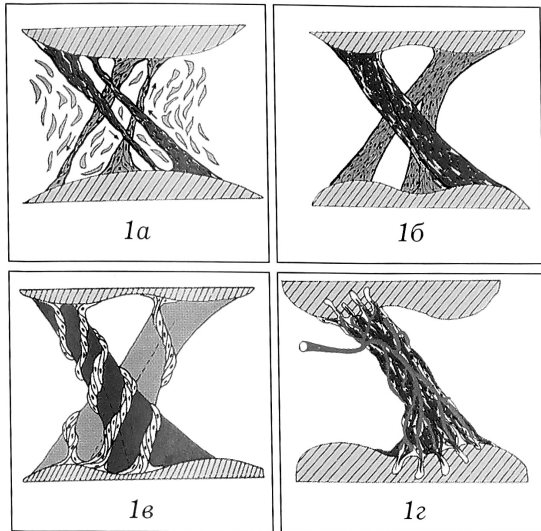


Рис. 1. Схемы закладки и первичной дифференцировки крестообразного комплекса человека.

a — формирование четырех очагов поляризации фибробластов в скелетогенной мезенхиме (стрелками показаны направления поляризации);
б — дифференцировка порций передней и задней крестообразных связок;
в — спиралевидная поляризация фибробластов на поверхности пучков;
г — срастание связок и скелета при резорбции хряща остеокластами.

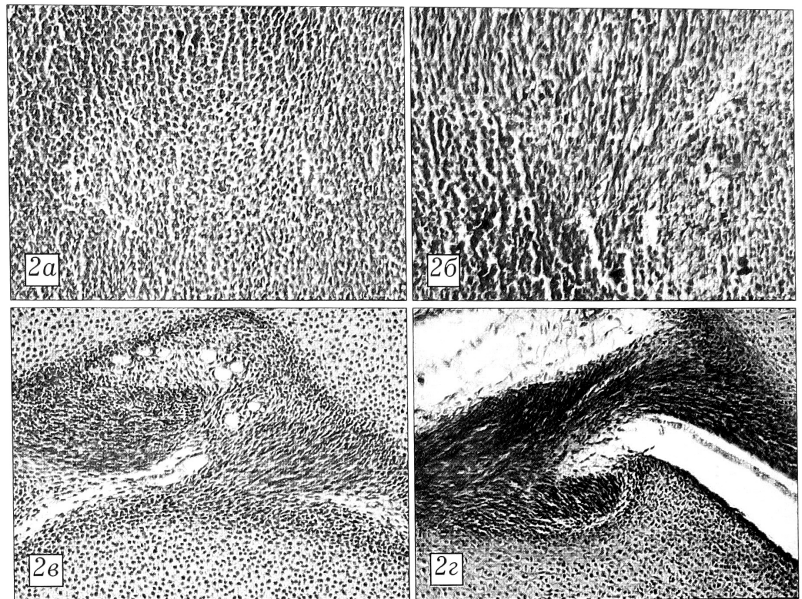


Рис. 2. Гистология развития крестообразного комплекса коленного сустава человека.

a — неполяризованные фибробласты в зоне будущей закладки крестообразного комплекса у эмбриона 5,5 нед. Вверху — край формирующейся голени (окраска гематоксилином, об. 40);
б — поляризация фибробластов в скелетогенной мезенхиме у эмбриона 6–6,5 нед. (окраска гематоксилином и эозином, об. 40);
в — передняя и задняя крестообразные связки у эмбриона 8 нед (окраска по Маллори, об. 20);
г — слияние двух компонентов задней связки крестообразного комплекса у эмбриона 9–9,5 нед (окраска по Маллори, об. 40).

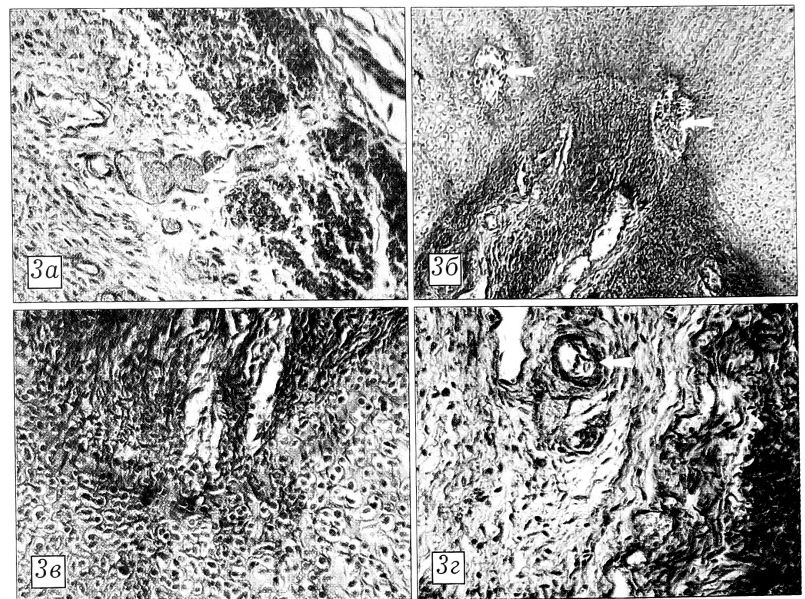


Рис. 3. Гистология дифференцировки крестообразного комплекса коленного сустава человека.

a — дифференцировка сосудов в крестообразном комплексе у эмбриона 10 нед. Стрелка указывает на «рассечение» сосудами фибробластного тела связки (окраска по Маллори, об. 40);
б — формирование каналов в хряще бедра активными остеокластами у эмбриона 11,5 нед. Стрелки указывают на каналы в краевой части голени (окраска по Маллори, об. 40);
в — врастание васкуляризированной передней крестообразной связки в края хрящевого канала бедра у эмбриона 12,5 нед (окраска по Маллори, об. 40);
г — проникновение нервных волокон в крестообразный комплекс у эмбриона 13,5 нед. Стрелка указывает на единичное волокно в задней связке крестообразного комплекса (окраска по Маллори, об. 40).

связок (рис. 2, *в*). В зоне скрещивания связок фибробласты расположены компактно, тогда как в местах прикрепления к бедру и голени они формируют веерные структуры. В этот период различить морфогенетические компоненты связок, найденные при их закладке, не удастся.

У эмбрионов 9–9,5 нед развития организация связок приобретает более упорядоченный характер. Начиная с этого периода морфогенез передней и задней крестообразных связок существен-

но различается. В задней связке могут быть выделены две порции, которые соответствуют двум очагам поляризации при закладке связки. Одна из них идет от большеберцовой кости к малоберцовой, а другая — от малоберцовой к большеберцовой. Первый компонент прикрепляется к передней части большеберцовой кости, а второй — к задней. Фибробласты, расположенные в виде веера, смещаются к ближайшему из компонентов связки и сливаются с ним. Передняя крестооб-

разная связка, так же как и задняя, формируется из двух частей. Однако оба компонента имеют одни и те же точки прикрепления. По сути происходит встречное образование двух прилежащих друг к другу связок: от бедра к голени и от голени к бедру (рис. 1, б и 2, г).

Сосуды в крестообразном комплексе впервые обнаруживаются у 10-недельных эмбрионов. Первоначально сосуды появляются только в мезенхиме и не проникают между фибробластами в тело связки (рис. 3, а). В этот период задняя связка сохраняет оба своих компонента и позиции их крепления к большеберцовой кости. Обе порции разделены сосудом и имеют независимое прикрепление. Примерно на середине пути от большеберцовой кости они сливаются и присоединяются к бедренной кости в одной точке. Оба компонента передней связки хорошо различимы, фибробласты на их поверхности начинают поляризоваться по спирали, что приводит к формированию видимой «скрученности» компонентов связки (рис. 1, в). На 10-й неделе появляются первые признаки резорбции бедра и голени остеокластами. Затем начинают формировать каналы, в которые проникают сосуды и фибробласты (рис. 3, б).

На 11-й неделе развития происходит массовое формирование сосудов на поверхности связок и проникновение эндотелиальных клеток между фибробластами. Эмбриональные компоненты обеих связок сливаются и в дальнейшем уже не различимы. В структуре связок происходит первичная дифференцировка фибробластов. Однако, учитывая отрицательную иммуногистохимическую реакцию моноклональных антител к коллагену III типа, можно допустить, что механическая дифференцировка в эмбриональных связках еще не началась.

На 12-13-й неделе развития начинается васкуляризация внутренних зон связок крестообразного комплекса. Сосуды проникают в толщу связки между фибробластами. Они ориентированы вдоль фибробластов и коллагеновых волокон (рис. 3, в). Образующиеся сосуды разделяют группы волокон связок на продольные фрагменты — относительно независимые пучки. Каждый такой пучок волокон начинает обрастать собственной оболочкой, а среди дифференцированных сосудов уже можно различить как артериолы, так и вены. К концу 13-й недели развития эмбриона в пространстве между пучками волокон происходит массовое слияние моноцитов и формирование 4-8-ядерных остеокластов. Сформированные остеокласты смещаются к зонам крепления связок на поверхности бедра и голени. Достигнув хрящевого матрикса скелетных элементов, остеокласты начинают фрагментарно резорбировать его. В результате образуются каналы, которые начи-

нают заполняться фибробластами, вступающими в дифференцировку. Одновременно с образованием сети сосудов происходит проникновение в эмбриональный крестообразный комплекс нервных волокон (рис. 3, г). Первоначально это исключительно свободные нервные окончания, которые входят в связки ниже уровня их прикрепления к бедру. Нервные стволы распределяются по поверхности крупных пучков волокон вместе с сосудами. Отдельные нервные волокна формируют окончания, распределенные на поверхности связок. В тело связок нервные волокна на этой стадии развития не проникают.

Обсуждение

Крестообразный комплекс коленного сустава человека появляется у эмбрионов 6-6,5 нед развития из скелетогенной мезенхимы. Эти данные отличаются от представлений о миграции мезенхимы в пространство между бедром и голенью после их морфологической дифференцировки. Наиболее интересным представляется обнаруженный механизм закладки крестообразного комплекса из четырех очагов поляризации фибробластов. По-видимому, эмбриональный морфогенез крестообразных связок является саморегулирующейся системой, которая детерминирована на уровне межклеточных биомеханических взаимодействий [9]. Четыре тяжа фибробластов формируют две связки. При этом передняя крестообразная связка образуется из двух фибробластных тяжей, сливающихся друг с другом, а задняя — из двух относительно автономных закладок. Двойственность происхождения связок позволяет предположить, что историческими предшественниками крестообразного комплекса человека могли быть три или даже четыре связки с относительно независимым креплением к бедру и голени. Начало дифференцировки, проявляющееся синтезом коллагенов, происходит под влиянием биомеханических взаимодействий между поляризованными фибробластами. Этот механизм запуска синтеза структурных и эмбриональных белков известен как для механически напряженных систем, так и для гепатоцитов [6].

Интересным представляется описанный механизм крепления связок к бедру и голени. На первом этапе развития фибробласты механически прикрепляются к надхрящнице. Это временное и непрочное прикрепление замещается постоянным после начала формирования сосудистой сети связки. Вместе с сосудами появляются остеокласты, которые «прорезают» каналы в хрящевой строме скелета. В подготовленные каналы проникают фибробласты, закрепляющие связку в бедре и голени. По-видимому, этот механизм является наиболее эффективным способом закрепле-

ния связок. Не исключено, что локальная активизация остеокластов при трансплантации жизнеспособных связок поможет решить проблему их сращения со скелетом.

Надо отметить, что морфологическое становление крестообразных связок происходит в соответствии с эволюцией крестообразного комплекса у тетрапод. У эмбрионов возрастом 7,5–8 нед связки не имеют внутренней структуры и сходны по строению со связками амфибий. К 10-й неделе они напоминают невазуляризованные связки рептилий, а к концу 13-й недели начинают приобретать строение связок низших млекопитающих [5, 7, 8].

Заключение

Проведенные исследования показали, что связки крестообразного комплекса формируются у эмбрионов 6–6,5-недельного возраста из скелетогенной мезенхимы, расположенной между зачатками костей голени. Первые признаки дифференциации передней и задней крестообразных связок обнаруживаются у эмбрионов 7,5–8 нед развития. Выявлен механизм закладки крестообразного комплекса из четырех очагов поляризации фибробластов. Четыре тяжа фибробластов формируют две связки. При этом передняя крестообразная связка образуется из двух фибробластных тяжей, сливающихся друг с другом, а задняя формируется из двух относительно автономных закладок. С 10-й недели начинается васку-

ляризация комплекса. Она сопровождается резорбцией хрящевых элементов скелета и заполнением образовавшихся каналов фибробластами, сращивающимися связки со скелетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макаров А.Н., Миронов С.П., Лисицын М.П., Никитин В.Б., Савельев С.В. //Материалы III Съезда Российской ассоциации специалистов перинатальной медицины. — М., 2000. — С. 321–323.
2. Макаров А.Н., Никитин В.Б., Савельев С.В., Миронов С.П., Лисицын М.П. //Морфология. — 2000. — Т. 117, N 3. — С. 72.
3. Миронов С.П., Лисицын М.П., Гулимова В.И., Никитин В.Б., Савельев С.В. //Материалы III Конгресса Российского артроскопического общества. — М., 1999. — С. 4–5.
4. Савельев С.В. Эмбриональное формирование мозга позвоночных. — М., 1993. — С. 143.
5. Girgis F.G., Marshall J.L., Monajem Al. //Clin. Orthop. — 1975. — N 106. — P. 216–231.
6. Gleiberman A.S., Rudrjavitseva E.I., Sharovskaja Y.Y., Abelev G.I. // Mol. Biol. Med. — 1989. — N 6. — P. 95–107.
7. Haines W. //J. Anat. — 1942. — Vol. 76. — P. 270–301.
8. Nikitin V.B., Saveliev S.V., Mironov S.P., Lisicin M.P. //Int. Society of arthroscopy, knee surgery and orthopaedic sports medicine (ISAKOS) Congress. — Washington, 1999. — P. 89.
9. Ryan T.J. //J. Am. Acad. Dermatol. — 1989. — Vol. 21. — P. 115–130.
10. Widenfalk B., Wiberg M. //Anat. Embryol. — 1989. — Vol. 180. — P. 317–323.

НАУЧНЫЕ ФОРУМЫ ЗА РУБЕЖОМ

8-й Международный конгресс по хирургии руки (8th IFSSH Hand Congress)

9–13 июня 2001 г.

Стамбул, Турция

Информация:

Prof. Ridvan Ege

Chairman

P.K. 29 Emek

Ankara, Turkey

Fax: +90-312-287-2390

E-mail: trafvak@pallas.dialup.ankara.edu.tr

XVIII Конгресс Международного общества по биомеханике (XVIIIth Congress of the International Society of Biomechanics)

Цюрих, Швейцария

8–13 июля 2001 г.

Информация:

E-mail: isb2001@biomech.mat.ethz.ch.

Интернет: <http://www.isb2001.ethz.ch>

Первая SICOT/SIROT ежегодная международная конференция (First SICOT/SIROT Annual International Conference)

Париж, Франция

30 августа—1 сентября 2001 г.

Информация:

SICOT HQ

Rue Washington 40

1050 Brussels

Belgium

Tel: +32-2-648-6823

Fax: +32-2-649-8601

E-mail: ccongr@sicot.org

EuroSpine 2001. 3-я Ежегодная конференция Европейского общества вертебрологов (EuroSpine 2001. The 3rd Annual Meeting of the Spine Society of Europe)

Готенбург, Швеция

4–8 сентября 2001 г.

Информация:

Judith Reichert Schild

Administrative Secretariat of SSE

Seefeldstrasse 16

8610 Uster, Switzerland

Tel: +41 1 994 1404

Fax: +41 1 994 1403

E-mail: schild@active.ch

Интернет: www.eurospine.org