

С.Л. Кабак¹
В.В. Заточная¹
Ю.М. Мельниченко¹
Т.М. Мохаммади²

¹ Учреждение образования
«Белорусский государственный
медицинский университет»,
² ГУ «РНПЦ травматологии и
ортопедии», Минск, Респу-
блика Беларусь

Надійшла: 18.05.2019

Прийнята: 12.06.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.2.27-36>

УДК: 611.018:611.013.3

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОССИФИКАЦИИ ПОЗВОНКОВ ЗАРОДЫШЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Kabak S.L. , Zatochnaya V.V. , Melnichenko Y.M. , Mohammadi T.M.  **Histological study of human fetuses vertebral column ossification.**

Belarusian state medical University, Minsk, Republic of Belarus, Republican Scientific and Practical Centre for Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus

ABSTRACT. Background. The study of normal embryonic development of the vertebral column is important for understanding the pathogenesis of congenital anomalies of the axial skeleton. **Objective.** To study the histodifferentiation of cartilage and bone tissue in the vertebral centra and neural arches of particular parts of the vertebral column in human embryos of the first half of fetal development. **Methods.** Whole-mount skeletal preparations, stained with alcian blue and alizarin red, as well as serial histological sections from the embryological collections of the Belarusian State Medical University and from the Carnegie collection (3D Atlas of Human Embryology project, <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/>) using hematoxylin and eosin and Masson's trichrome staining were studied. A total of 37 human embryos/fetuses from 5 to 20 weeks of age were used. **Results.** "Primary" centers of ossification were found in the neural arches of the upper cervical and centra of lower thoracic and upper lumbar vertebrae of 9-10-week human embryos. They consist of hypertrophic chondrocytes surrounded by a mineralized matrix. Complete ossification of the cartilaginous anlagen of the vertebral bodies begins at 12 week of embryogenesis. The appearance of the osteoid and structural elements of the bone marrow in their centers is preceded by the ingrowth of vascular canals. In the vertebral neural arches, the formation of bone tissue occurs due to endochondral and perichondral ossification. Three growth zones are formed near the ossification center – one is for the region of the pedicle of the neural arch; the other for the lamina/spinous process; the third – for the base of the transverse process. **Conclusion.** According to the histological structure, the ossification of the vertebral body is similar to the "secondary" ossification center of long bone, and the ossification center in the neural arch at the microscopic level resembles the diaphyseal ossification center of the long bone. Differences in the timing of appearance and osteogenic pathways of the vertebral centra and neural arches are determined by different sources of their origin.


Key words: vertebra, cartilage, ossification, embryo.

Citation:

Kabak SL, Zatochnaya VV, Melnichenko YM, Mohammadi TM. [Histological study of human fetuses vertebral column ossification]. *Morphologia*. 2019;13(2):27-36. Russian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.2.27-36>

 Kabak S.L. 0000-0002-7173-1818

 Zatochnaya V.V. 0000-0002-6765-2420

 Melnichenko Y.M. 0000-0002-5652-7296

 Mohammadi T.M. 0000-0002-1567-7319

✉ v.zatochnaya@rambler.ru

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Введение

В эмбриогенезе источником развития осевого скелета являются склеротомы сомитов [1, 2]. Каждый позвонок развивается из нескольких

склеротомных областей. Источником развития вентрального отдела нейральной дуги (в будущем ножка дуги и поперечный отросток), а также головки и шейки ребра служит центральная

часть склеротома. Дорсальный отдел нейральной дуги (в будущем пластинка дуги и остистый отросток) формируются за счет дорсальной части склеротома [3, 4]. Нейральные дуги развиваются рядом с нервной трубкой и чувствительными узлами спинномозговых нервов [5]. Центрум (англ. centrum) как центральная часть тела позвонков [6] и межпозвоночные диски развиваются из склеротомных клеток, расположенных аксиально (вентральный склеротом). Эти клетки мигрируют в направлении хорды и заполняют перихордальное пространство [4, 7, 8]. Причем, большая часть тела каждого позвонка развивается из краниальной части одного сомита и каудальной части соседнего сомита. Морфогенез позвонков начинается с конденсации мезенхимных клеток вокруг хорды. С 6-й по 7-8-ю недели эмбриогенеза вокруг хорды формируются хрящевые закладки тел и дуг позвонков [9,10]. С 10-11 недели гестации начинается процесс их окостенения [11]. Всего во внутриутробном периоде развития в большинстве позвонков имеется три обособленных друг от друга (первичных) центра оксификации, один в теле и два парных в дуге [12, 13]. В фундаментальных руководствах по эмбриологии указывается, что перихордальный тип остеогенеза характерен для дуг позвонков, тогда как их тела подвергаются эндохондральной оксификации [14].

В литературе существуют противоречивые данные о количестве центров хондрификации в области тела позвонка, а также детально не описаны гистологические изменения, происходящие в хряще при появлении центров оксификации хрящевых закладок позвонков из различных отделов позвоночного столба. В ряде случаев проводится аналогия с окостенением трубчатых костей. Окостенение тела позвонка сравнивается с эпифизом, а костеобразование в дугах позвонков – с образованием костной ткани в диафизах [15, 16].

Изучение нормального эмбрионального развития позвоночного столба имеет важное значение для понимания патогенеза врожденных аномалий осевого скелета [17]. В частности, нарушение формирования центров оксификации, включая их асимметричный рост, может служить причиной врожденного спондилолиза [18], а появление полупозвонков может быть обусловлено отсутствием одного из хрящевых центров в теле позвонка [17].

Цель исследования – установить особенности гистодифференцировки хрящевой и костной ткани в закладке тела и дуги позвонков различных отделов позвоночного столба у зародышей человека первой половины внутриутробного развития.

Материал и методы

Материалом служили 37 эмбрионов и плодов человека 5-20 недельного возраста. Материал использовался для получения просветленных

препаратов, тотально окрашивался ализариновым синим и красным ализарином, а также для изготовления гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Использованы серийные гистологические срезы целых зародышей из эмбриологических коллекций Белорусского государственного медицинского университета и цифровые изображения серийных гистологических срезов эмбрионов из коллекции Карнеги (проект 3D Atlas of Human Embryology <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/>).

На выполнение исследования получено согласие комитета по биоэтике УО «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол №3 от 22.10.2018).

Результаты и их обсуждение

У зародыша 4-й недели гестации (11 мм теленно-копчиковой длины, ТКД) клетки мезенхимы образуют концентрическую конденсацию вокруг хорды и нервной трубки на всем ее протяжении (рис. 1А).

О начале хондрогенеза у зародыша 5-й недели гестации (14,2 мм ТКД) свидетельствует появление одного центра хондрификации в мезенхимной закладке тела позвонка (рис. 1Б). При этом в нейральных дугах морфологические признаки начала хондрификации отсутствуют. Хорда сохраняет непрерывность на всем протяжении от головного до хвостового конца зародыша.

У 6-ти недельного зародыша (17 мм ТКД) в закладках позвонков хорошо идентифицируются центрум и нейральные дуги. В середине закладки тела вокруг хорды лежат более крупные клетки (хондроциты), чем по ее периферии. В нейральных дугах, представляющих собой конденсацию мезенхимных клеток, имеется два центра хондрификации. Они с двух сторон охватывают примерно 1/3 часть окружности закладки спинного мозга, но не образуют вокруг него замкнутое кольцо (рис. 1В).

На 8-й неделе эмбриогенеза (33 мм ТКД) закладка позвонка приобретает вид цельной хрящевой структуры в результате слияния отдельных центров хондрификации. Она состоит из тела, пластинки дуги, поперечных и суставных отростков. В шейных и поясничных позвонках поперечный и реберный отростки представляют собой единое целое. В закладках грудных позвонков проксимальная часть ребра идентифицируется как самостоятельная структура, прилегающая к поперечному отростку. Хрящевые пластинки дуг, ориентированные в дорсальном направлении, охватывают с двух сторон 3/4 окружности закладки спинного мозга. При этом позвоночное отверстие остается незамкнутым сзади. К тому же отсутствует остистый отросток. Две пластинки дуги позвонка имеют расширение на конце и соединяются между собой соединительнотканной мембраной. В закладках тел позвонков на всем протяжении позвоночного столба

вдоль его продольной оси находится хорда. В ее состав входит бесклеточное перихордальное влагалище на периферии и небольшое количество клеток неправильной формы в центре (рис. 1Г).

На 9-й неделе эмбриогенеза (38 мм ТКД) на просветленных препаратах выявляются центры кальцификации в дугах позвонков в интервале от С₄ до Th₃. В шейных позвонках они имеют округлую форму и находятся на уровне поперечных отростков, ближе к позвоночному отверстию (рис. 1Д). В грудных позвонках области выгнутой овальной формы, окрашенные ализарином, расположены напротив поперечных отростков также ближе к позвоночному отверстию. На гистологических срезах по периферии дуги

эксцентрично, со стороны спинномозгового канала, в составе надхрящницы выявляется полоска остеоида. К ней со стороны закладки спинного мозга прилежат небольшие по размеру клетки с базофильной цитоплазмой (остеобласты), а с противоположной стороны – гипертрофированные хондроциты с уплощенными ядрами, окруженные обызвествленным межклеточным матриксом. Эта область по периферии радиально к поперечнику дуги окружена хрящевыми клетками вытянутой формы, далее располагаются неизмененные хондроциты (рис. 1Е). В телах позвонков центры гипертрофии хрящевых клеток и кальцификации межклеточного вещества отсутствуют.

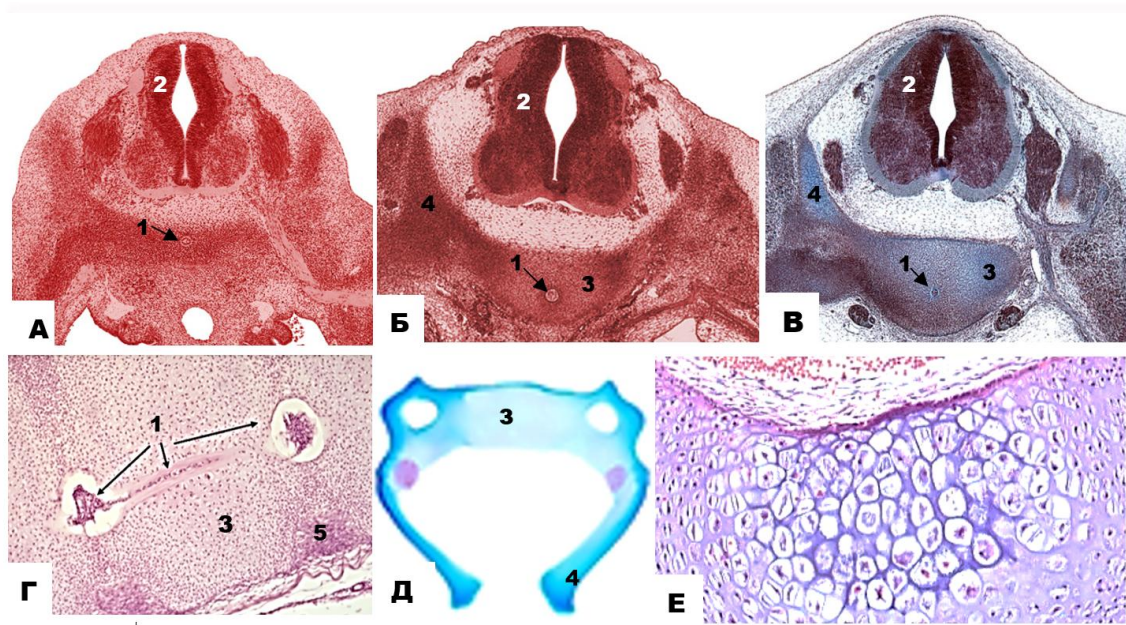


Рис. 1. Закладки позвонков зародышей человека 4-й (А), 5-й (Б), 6-й (В), 8-й (Г) и 9-й (Д, Е) недели эмбриогенеза. 1 – хорда; 2 – закладка спинного мозга; 3 – закладка тела позвонка; 4 – закладка нейральной дуги; 5 – закладка межпозвоночного диска. А – Конденсация мезенхимы вокруг хорды и нервной трубки зародыша; Окраска гематоксилином и эозином. ×200. Б – центр хондрификации в мезенхимной закладке тела позвонка; Окраска гематоксилином и эозином. ×200. В – центр хондрификации в закладке тела и нейральной дуге; Окраска гематоксилином и эозином. ×200. Г – остаток хорды в закладке тела позвонка и межпозвоночных дисках; Окраска гематоксилином и эозином. ×50. Д – центры кальцификации в нейральных дугах С₅; Окраска ализарином (просветленный препарат). ×25. Е – гипертрофированные хондроциты, обызвествленный межклеточный матрикс и перихордальный остеоид в закладке дуги С₅. Окраска гематоксилином и эозином. ×100.

На просветленных препаратах 10-ти недельных зародышей (47 мм ТКД) участки кальцификации появляются в центре закладок тел двух нижних грудных и верхнего поясничного позвонков (рис. 2А). В закладках тел и дуг позвонков, за пределами области кальцифицированного матрикса, присутствуют хрящевые каналы с кровеносными сосудами, врастающими внутрь хряща со стороны надхрящницы (рис. 2Б). Гистологически в центре тела позвонка находится группа гипертрофированных хрящевых клеток. Они содержат уплощенные ядра, расположены на значительном расстоянии друг от друга и окружены базофильно окрашенным обызвествленным меж-

клеточным веществом. В цитоплазме гипертрофированных хондроцитов визуализируются гранулы коричневого цвета – внутрилизосомный липопротеид липофусцин, который является биомаркером клеточного старения. В центре очага кальцификации заметен апоптоз хондроцитов. По периферии область кальцификации окружена полоской хрящевых клеток вытянутой формы, ориентированных радиально по отношению к центру кальцификации. Далее располагаются клетки округлой формы небольших размеров (рис. 2В, 2Г). Смыкание дуг происходит у Th₄-Th₆, одновременно в этих позвонках начинается формирование остистого отростка. Дуги всех

шейных, трех верхних, трех нижних грудных и всех поясничных позвонков остаются не замкнутыми. Поэтому при рассмотрении позвоночника сзади расщелина дуг позвонков по форме напоминает «песочные часы». Центры кальцификации закладок дуг выявлены в С₂ - Th₁₀ позвонках. При гистологическом исследовании установлено, что перихондрально образованный остеоид окружает дугу со всех сторон (костная манжетка), причем со стороны спинномозгового канала его толщина больше. В центре дуги в очаге кальцификации отмечается апоптоз хондроцитов. В эту область врастает остеобластическая почка, содержащая кровеносные сосуды. По периферии центра оссификации располагаются колонки уплощенных хрящевых клеток, ориентированных перпендикулярно длинной оси закладки дуги позвонка. (рис. 2Г).

На 12-й неделе внутриутробного развития (85 мм ТКД) на просветленных препаратах центры кальцификации выявляются в центре закладок тел грудных Th₂-Th₁₂ и в дорсальных (распо-

ложенных ближе к позвоночному каналу) отделах тел поясничных L₁-L₅ позвонков (рис. 2Е). Дуги срастаются в единое целое позади спинного мозга во всех отделах позвоночника, за счет чего завершается формирование позвоночного канала на всем его протяжении. Во всех грудных, нижних шейных и поясничных позвонках имеются сформированные остистые отростки. На просветленных препаратах в хряще дуг позвонков выявляются участки кальцификации, окрашенные ализарином. На гистологических срезах в этих областях выявляется частичная резорбция обызвествленного хряща за счет многоядерных клеток (остеокластов) и отложение остеоида на поверхности оставшихся островков межклеточного вещества (рис. 2Ж, 23). В закладках шейных позвонков перихондральная костная манжетка охватывает дугу со всех сторон. В других отделах позвоночного столба остеоид по-прежнему не формирует замкнутое кольцо вокруг закладки дуги позвонка.

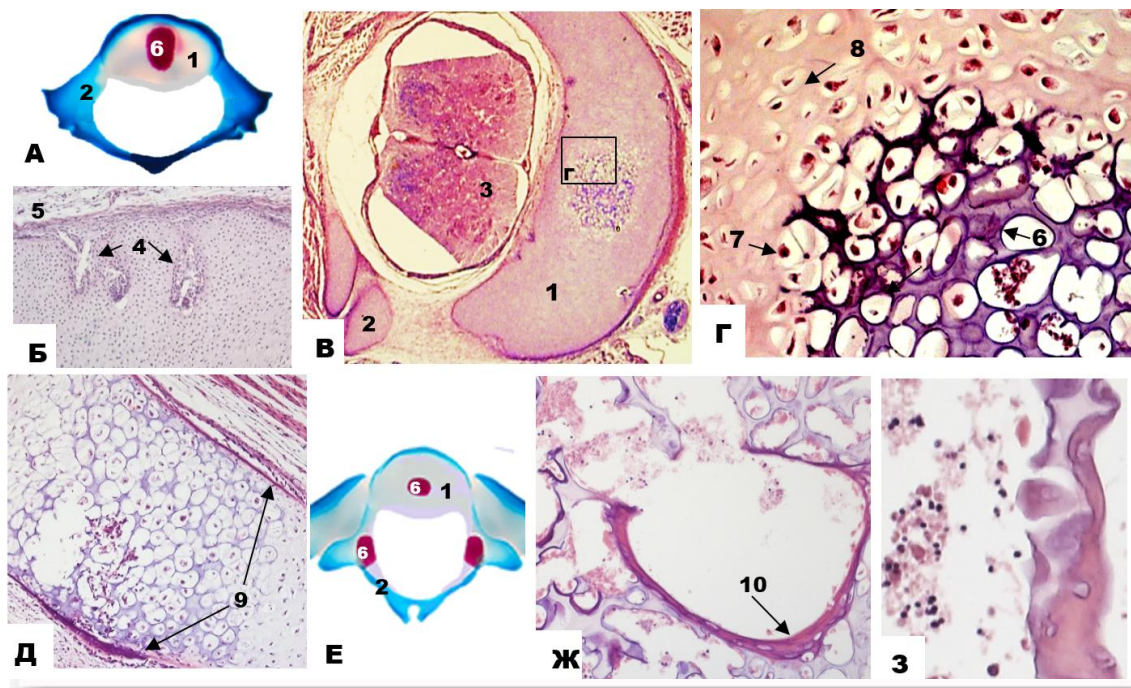


Рис. 2. Закладки позвонков зародышей человека 10-й (А-Д) и 12-й (Е-З) недели эмбриогенеза. 1 – закладка тела позвонка; 2 – закладка дуги позвонка; 3 – спинной мозг; 4 – сосудистый канал; 5 – надхрящница; 6 – кальцифицированный матрикс; 7 – гипертрофированные хондроциты; 8 – уплощенные хондроциты; 9 – перихондральный остеоид (костная манжетка); 10 – эндохондральный остеоид (костная балка). А – центр кальцификации межклеточного матрикса в теле L1; Окраска аляциановым синим и красным ализарином (просветленный препарат). ×25. Б - сосудистые каналы в теле L4; Окраска гематоксилином и эозином. ×100. В - центр кальцификации в теле Th8; Окраска гематоксилином и эозином. ×50. Г - центр кальцификации в теле Th8; Окраска гематоксилином и эозином. ×200. Д - костная манжетка, гипертрофия и апоптоз хондроцитов в дуге С5; Окраска гематоксилином и эозином. ×200. Е - центры кальцификации в теле и дуге Th7; Окраска аляциановым синим и красным ализарином (просветленный препарат). ×25. Ж - костная балка и резорбционные полости с элементами красного костного мозга в теле L2; Окраска гематоксилином и эозином. ×200. З - многоядерные клетки (остеокласты) на поверхности остатков минерализованного хрящевого матрикса в закладке дуги L2; Окраска гематоксилином и эозином. ×400.

На 13-й неделе эмбриогенеза (97 мм ТКД) на макроскопическом уровне центры кальцификации выявляются в закладках всех позвонков. На микроскопическом уровне в телах всех шейных, двух нижних поясничных и всех крестцовых позвонков они представляют собой области гипертрофированных хонд-

роцитов, окруженных обызвествленным матриксом, а в телах всех грудных и трех верхних поясничных позвонков уже сформированы центры эндохондрального окостенения. Остаток хорды присутствует только в области межпозвоночного диска. В теле позвонка, как правило, определяется одна область гипертрофии хондроцитов и обызвествления межклеточного вещества. В ряде случаев в ней обнаруживается присутствие двух очагов кальцификации межклеточного матрикса. (рис. 3А). В дугах всех позвонков выявляются два очага перихондрального и эндохондрального окостенения.

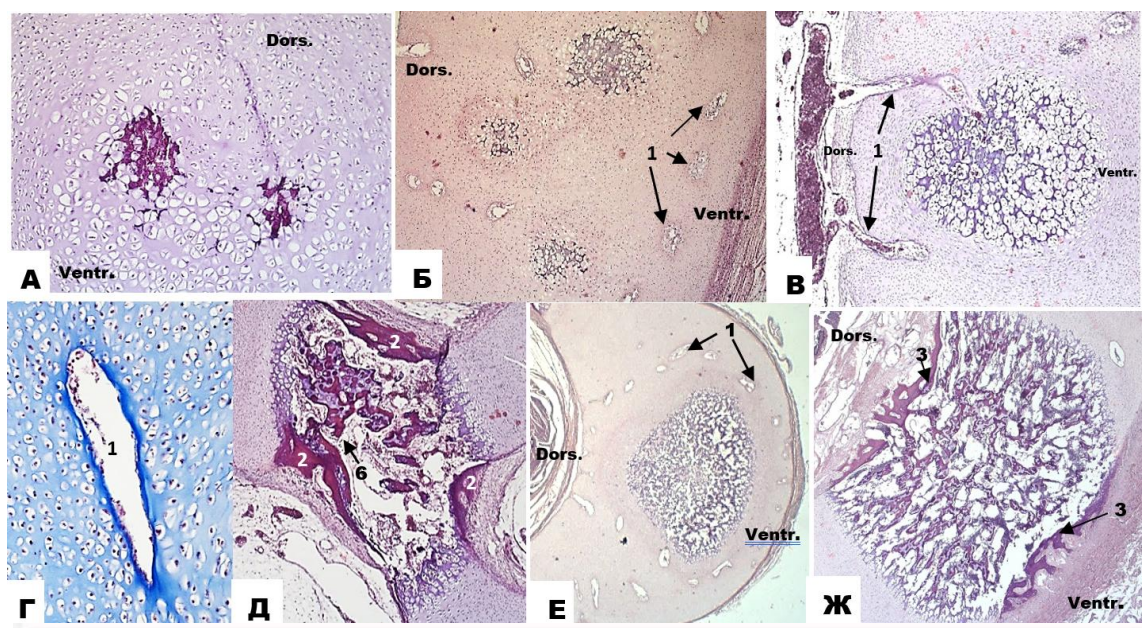


Рис. 3. Закладки позвонков зародышей человека 13-й (А), 16-й (Б-Д) и 20-й (Е,Ж) недели эмбриогенеза. 1 – сосудистые каналы; 2 – костная манжетка; 3 – костные балки. А – два очага кальцификации в области гипертрофии хондроцитов в теле Th₇; Б - три обособленных очага кальцификации в теле L₅; Окраска гематоксилином и эозином. ×50. В - сосудистые каналы в теле S₂; Окраска гематоксилином и эозином. ×50. Г - кальцификация межклеточного матрикса в стенке сосудистого канала, тело Th₇; Окраска по Массону. ×200. Д - центр оксификации в дуге С₄; Окраска гематоксилином и эозином. ×100. Е - большое количество сосудистых каналов в теле Th₁₀; Окраска гематоксилином и эозином. ×100. Ж - центр оксификации в теле L₁; Окраска гематоксилином и эозином. ×50.

У 16-ти недельного зародыша (135 мм ТКД) центры кальцификации присутствуют в дугах С₁-L₅ позвонков и в телах С₂-S₂ позвонков. В телах шейных и грудных позвонков они имеют округлую форму и расположены примерно посередине тела позвонка. Визуально центры кальцификации в закладках тел поясничных позвонков значительно крупнее по сравнению с закладками тел позвонков других отделов позвоночного столба. На гистологических срезах в закладке тел поясничных позвонков чаще всего присутствует один центр гипертрофии хондроцитов, окруженных кальцифицированным межклеточным веществом. Тем не менее, в составе отдельных закладок нами было выявлено три обособленных центра кальцификации межклеточного матрикса (рис. 3Б). По сравнению с зародышами более ранних сроков гестации в хряще, окружающем зону эндохондрального окостенения значительно возросло количество и длина хрящевых каналов. Содержащиеся в них кровеносные сосуды доходят почти до середины закладки тела позвонка и проникают в центр остеогенеза (рис. 3В). Вокруг стенки сосудистых каналов начинается образование остеоида (рис. 3Г).

По периферии дуг позвонков присутствует перихондральная грубоволокнистая костная ткань в виде костной манжетки, связанная с костными балками, формирующимися на поверхности остатков резорбированного матрикса. Между ними видна граница – спайная линия. Рядом с центром окостенения в закладке дуги позвонков формируются три зоны роста. Одна из них лежит в области ножки дуги позвонка (будущий нейроцентральный синхондроз), другая находится между пластинкой дуги позвонка и остистым отростком, третья – у основания поперечного отростка. Каждая зона роста на микроскопическом уровне включает зону гипертрофированных хрящевых клеток, полосу уплощенных хондроцитов и зону клеток округлой формы (рис. 3Д).

Центры оксификации у 20-ти недельных плодов (185 мм ТКД) определяются в закладках тел и дуг позвонков во всех отделах позвоночного столба. В дуге позвонков каждый из двух центров костеобразования занимает весь поперечник и распространяется на протяжении от ножки дуги до места начала остистого отростка. В закладках тел шейных позвонков центры оксификации

овальной формы, слегка вытянутые в передне-заднем направлении, находятся посередине закладки, в грудных позвонках они имеют форму пирамиды, основание которой обращено к вентральной поверхности закладки, а верхушка – к спинному мозгу (рис. 3Е). В закладках поясничных позвонков область костеобразования занимает все пространство от вентральной до дор-

В эмбриогенезе окостенение позвонков осуществляется непрямым остеогенезом. Сначала клетки в центре мезенхимных конденсаций, окружающие хорду и нервную трубку, дифференцируются в хондробласты, которые имеют высокую митотическую активность и секретируют межклеточный матрикс, содержащий специфический для хряща коллаген II типа (*Col2a1*), коллагены IX и XI типа, а также протеогликановый хондроитинсульфат агрекан [2, 19, 20, 21, 22, 23]. Клетки, расположенные по периферии, уплощаются и формируют надхрящницу, отделяющую закладку от окружающей мезенхимы. Эти клетки продолжают секретировать коллаген I и III типа, экспрессия которого в центрально расположенных хондроцитах прекращается. В мезенхимной закладке тела позвонков нами обнаружено присутствие только одного центра хондрификации, а не двух. Это соответствует данным, полученным Tanaka & Uthoff [24], которые утверждают, что тело развивается из одной хрящевой закладки. Представления о том, что оно образуется из двух половин, лежащих по обе стороны от хорды, впервые сформировались еще в 30-е – 50-е года прошлого века, и до настоящего времени упоминается во многих руководствах, в том числе по эмбриологии [25, 26].

Дуга позвонка формируется из двух центров хондрификации, которые определенное время на протяжении внутриутробного развития остаются разделенными сзади по средней линии. Замыкание позвоночного канала начинается у зародышей человека 9-ти недельного возраста в грудном отделе позвоночного столба и завершается на 12-й неделе внутриутробного развития.

Появление костной ткани в закладке тела позвонка происходит за счет эндохондрального остеогенеза. При этом гистологическая картина формирования грубоволокнистой костной ткани во многом схожа с морфогенезом «вторичных» центров окостенения в эпифизах закладок длинных трубчатых костей [16]. Процесс начинается с перехода хондроцитов от фазы активной пролиферации к терминальной дифференцировке, которая ведет к их гипертрофии и секреции кальцифицированного межклеточного матрикса рядом с остатками хорды, а завершается апоптозом или аутофагической гибелью хрящевых клеток [27, 28, 29].

Гипертрофированные хондроциты обеспечивают минерализацию межклеточного вещества. Фосфат кальция в виде кристаллов гидро-

сальной поверхности тела. На гистологических срезах по краю закладки выявляются костные трабекулы, ориентированные параллельно надкостнице (рис. 3Ж). Они образуются в результате эндохондрального окостенения. Образования остеоида со стороны надхрящницы отмечено не было.

ксиапатита первоначально накапливается в матриксных пузырьках (везикулах) внутри хрящевых клеток [30]. Затем эти пузырьки выходят за пределы хондроцитов и превращаются в калькосфериты – кристаллоидные структуры, состоящие из аморфного фосфата кальция [31]. В дальнейшем калькосфериты служат центрами эпитаксиального роста кристаллов гидроксиапатита. На тотальных просветленных препаратах минерализованное межклеточное вещество хряща окрашивается ализиринном в красный цвет и воспринимается как первичный центр оссификации. Однако в этом месте еще не началось образование костной ткани. В составе тела позвонка замещающей хрящ остеоид появляется у 13-ти недельных зародышей человека.

В абсолютном большинстве случаев в теле позвонка присутствует одна область гипертрофии хондроцитов и обызвествления межклеточного вещества. Однако в закладке тела отдельных позвонков (всего 3 случая) нами обнаружено одновременно две и три обособленных области кальцификации. Две из них располагаются по обе стороны от срединной плоскости. Присутствие двух центров оссификации, лежащих в закладке тела позвонка спереди и сзади относительно друг друга описано в литературе другими авторами [32]. Чаще всего они выявляются рентгенологически во втором триместре гестации у плодов человека с аутомсомной энеуплоидией [33]. Однако, Tanaka & Uthoff [24] считают, что наличие на рентгенограммах новорожденных фронтальной щели в телах позвонком (свидетельство присутствие двух центров оссификации) не следует интерпретировать как аномалию развития. В постнатальном онтогенезе два центра сливаются друг с другом.

Гипертрофии хондроцитов и минерализации межклеточного матрикса в эпифизах закладок длинных трубчатых костей предшествует вращение со стороны надхрящницы кровеносных сосудов, которые лежат в так называемых хрящевых сосудистых каналах, формирующих сеть трубочек [28, 34]. Формирование сосудистых каналов в хрящевой закладке тела позвонков начинается у зародышей человека с 9-й недели эмбриогенеза.

В эпифизах длинных трубчатых костей существует два типа каналов [34]. Короткие хрящевые сосудистые каналы никогда не заходят в зону пролиферации. Длинные каналы обычно распространяются за пределы зоны пролифера-

ции и внедряются в «первичный» центр окостенения в диафизе. Короткие каналы содержат недифференцированные мезенхимные клетки и центральную артериолу, ветвящуюся на многочисленные капилляры на конце [35]. Каналы, которые простираются до первичного и вторичного центра окостенения, кроме того, содержат остеобласты и остеокласты.

Считается, что хрящевые сосудистые каналы, в первую очередь, обеспечивают трофику хряща. Кроме того, ряд авторов полагают, что по ним происходит распространение в зону гипертрофированных хондроцитов остеогенных клеток, которые участвуют в процессах эндохондрального и перихондрального окостенения, превращаясь в остеобласты, а также дифференцируются в хондрокласты. [5, 36, 37, 38, 39]. Хондрокласты разрушают избыток обызвествленных глобул в межклеточном веществе хряща. Продукция остеобластами остеоида и его последующее обызвествление ведет к формированию костных балок [40]. Присутствие остеоида на поверхности фрагментов (остатков) минерализованного межклеточного хряща в закладках тел поясничных позвонков и в стенке хрящевых сосудистых каналов нами обнаружено у зародышей человека 13-ти и 16-ти недельного возраста соответственно.

Кроме того, остеогенные клетки внутри хрящевых сосудистых каналов, трансформируясь в хондроциты, способствуют увеличению абсолютных размеров всей хрящевой закладки тела позвонка в вертикальном и переднезаднем направлении [15]. Наибольшее количество каналов обнаруживается в переднебоковом сегменте хрящевой закладки тела позвонка, по сравнению с его задним сегментом.

Нами не обнаружено морфологических признаков участия хорды и окружающей ее соединительной ткани в окостенении тела позвонка, хотя перихордальный остеогенез имеет место у некоторых позвоночных животных [41].

Развитие костной ткани в закладке дуги позвонка осуществляется одновременно путем перихондрального и эндохондрального остеогенеза, во многом напоминая процесс формирования «первичных» центров окостенения в диафизе закладок длинных трубчатых костей [16].

В свое время Vagnall et al. [27] высказали предположение, что начало окостенения дуг позвонков стимулируется рефлекторным сокращением мышц в местах их прикрепления на осевом скелете, в частности мышц, осуществляющих примитивное «гаспинг-дыхание» (судорожное дыхание). Авторы обнаружили, что центры костеобразования сначала появляются в дугах нижних шейных верхних грудных позвонков, а затем процесс распространяется в каудальном и краниальном направлении. Аналогичная последовательность появления областей накопления солей

кальция в дугах позвонков обнаружена нами на просветленных и окрашенных ализарином препаратах. К моменту появления центров окостенения позвоночное отверстие не замкнуто.

Формирование центров костеобразования происходит одновременно в двух половинах дуги позвонка. При этом хондроциты прекращают деление, подвергаются гипертрофии (их размер увеличивается почти в 10 раз) и начинают продуцировать в межклеточное вещество коллаген X-го типа [42,43]. Параллельно гипертрофированные хондроциты через Indian hedgehog (Ihh) сигнальный путь напрямую стимулируют трансформацию прогениторных клеток в остеобласты, в результате чего надхрящница превращается в надкостницу [44, 45, 46, 47]. Остеобласты начинают секретировать остеоид, который располагается по поверхности хрящевой закладки – перихондральное (по своей сути эндесмальное) окостенение [32, 48, 49]. В отличие от диафиза закладок трубчатых костей в дуге позвонка первоначально наблюдается образование циркулярной костной манжетки. Остеоид в ее составе появляется со стороны, обращенной в сторону спинномозгового канала. После распространения перихондрального центра окостенения на всю ширину дуги позвонка в каждой ее половине формируются три обособленные зоны роста.

Морфологическими и иммуногистохимическими исследованиями доказано, что в процессе эндохондрального окостенения часть гипертрофированных хондроцитов может дифференцироваться в остеобласты, продуцирующие костный матрикс, и остеоциты [50, 51], или трансформироваться в так называемые терминальные хондроциты – мелкие клетки, расположенные в центре окостенения вблизи надкостницы [23].

В результате продукции гипертрофированными хондроцитами VEGF – ключевого фактора ангиогенеза [52], апоптоз этих клеток сопровождается инвазией в хрящевую закладку дуги позвонка со стороны надхрящницы сосудов и клеток – предшественников остеобластов и хондрокластов. За счет хондрокластов нарушается целостность минерализованного межклеточного вещества хряща, на оставшихся фрагментах которого остеобласты продуцируют остеоид (эндохондральное окостенение).

Заключение

По гистологическому строению центр окостенения тела позвонка сходен с «вторичным» центром окостенения в эпифизах длинных трубчатых костей, а центр окостенения в дуге позвонка на микроскопическом уровне напоминает центр оссификации в диафизе длинной трубчатой кости. Различия в сроках появления и способах окостенения тела и дуг позвонка детерминировано разными источниками их происхождения.

Перспективы дальнейших исследований связаны с установлением особенностей гисто-

дифференцировки хрящевой и костной ткани в закладке тела и дуги позвонков различных отделов позвоночника человека на различных этапах внутриутробного развития.

Информация о конфликте интересов

Потенциальных или явных конфликтов интересов, связанных с этой рукописью, на момент публикации не существует и не предвидится.

Литературные источники References

1. O'Rahilly R, Müller F. Somites, spinal ganglia, and centra. *Cells Tiss Org*. 2003;174:75–92. doi: 10,1159/000068948
2. Staines KA, Pollard AS, McGonnell IM, Farquharson C, Pitsillides AA. Cartilage to bone transitions in health and disease. *Journal of Endocrinology*. doi: 10,1530/JOE-13-0276
3. Christ B, Chuang R, Scaal M. Formation and differentiation of the avian sclerotome. *Anat Embryol. (Berl.)*. 2004;208:333–50. doi: 10,1007/s00429-004-0408-7
4. Scaal M. Early development of the vertebral column. *Semin Cell Dev Biol*. 2016. Jan;49:83–91. doi: 10,1016/j.semcd.2015.11.003
5. Hall BK. *Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology*. 2nd ed. Academic Press; 2015. 920 p.
6. Chen PJ, Wozniak W. Early development of the costovertebral joints. *Stud Health Technol Inform*. 2012;176:213–216. PMID: 22744493
7. Fleming A, Kishida MG, Kimmel CB, Keynes RJ. Building the backbone: the development and evolution of vertebral patterning. *Development*. 2015;142(10):1733–1744. doi: 10,1242/dev.118950
8. Christ B, Wilting J. From somites to vertebral column. *Ann Anat.*, 1992 Feb;174(1):23–32
9. Varras M, Akrivis C. Prenatal diagnosis of fetal hemivertebra at 20 weeks' gestation with literature review. *International Journal of General Medicine*. 2010;3:197–201. PMID: 20689693
10. Szpinda M, Baumgart M, Szpinda A, Woźniak A, Mila-Kierzenkowska C. New patterns of the growing L3 vertebra and its 3 ossification centers in human fetuses – a CT, digital, and statistical study. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2013;19:169–180. doi: 10,12659/MSMBR.883956
11. Skórzewska A, Grzymisławska M, Bruska M, Lupicka J, Woźniak W. Ossification of the vertebral column in human foetuses: histological and computed tomography studies. *Folia Morphol (Warsz)*. 2013. Aug;72(3):230–8. PMID: 24068685
12. Bagnall KM, Harris PF, Jones PR. A radiographic study of the human fetal spine. 3. Longitudinal growth. *Journal of Anatomy*. 1979;128(Pt 4):777–787. PMID: 489466
13. Baumgart M, Wiśniewski M, Grzonkowska M, Małkowski B, Badura M, Szpinda M. Morphometric study of the neural ossification centers of the atlas and axis in the human fetus. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 2016;38(10):1205–1215. doi: 10,1007/s00276-016-1681-2
14. Scheuer L, Black S. *The juvenile skeleton*. 1st ed. Academic Press; 2004. 400 p.
15. Chandraraj S, Briggs CA. Role of cartilage canals in osteogenesis and growth of the vertebral centra. *Journal of Anatomy*. 1988;158:121–136. PMID: 3225216
16. Chandraraj S, Briggs CA. Multiple growth cartilages in the neural arch. *Anat Rec*. 1991 May;230(1):114–20. doi: 10,1002/ar.1092300111
17. Paoletti D, Robertson M, Sia SB. A sonographic approach to prenatal classification of congenital spine anomalies. *Australasian Journal of Ultrasound in Medicine*. 2014;17(1):20–37. doi: 10,1002/j.2205-0140.2014.tb00081.x
18. Kim HK, Laor T. Bilateral congenital cervical spondylolysis. *Pediatric radiology*. 2010;40(1):132–132. doi: 10,1007/s00247-009-1349-8
19. Glenister TW. An embryological view of cartilage. *Journal of anatomy*. 1976;122(Pt 2):323. PMID: 1002606
20. Colnot C, Lu C, Hu D, Helms JA. Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol*. 2004 May;269(1):55–69. doi: 10,1016/j.ydbio.2004.01.011
21. Olsen AK, Sondergaard BC, Byrjalsen I, Tanko LB, Christiansen C, Müller A, Hein GE, Karsdal MA, Qvist P. Anabolic and catabolic function of chondrocyte ex vivo is reflected by the metabolic processing of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Mar;15(3):335–42. doi: 10,1016/j.joca.2006.08.015
22. Wu Q, Wang M, Zuscik MJ, Chen D, O'Keefe RJ, Rosier RN. Regulation of Embryonic Endochondral Ossification by Smurf2. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*. 2008;26(5):704–712. doi: 10,1002/jor.20563
23. Wang T, Zhang X, Bikle DD. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol*. 2017 May;232(5):913–921. doi: 10,1002/jcp.25641
24. Tanaka T, Uthoff HK. Coronal cleft of vertebrae, a variant of normal enchondral ossification. *Acta Orthop Scand*. 1983 Jun;54(3):389–95. PMID: 6683062
25. Prakash NT, Ramamurthi R. *Textbook of Neurosurgery, 3-Volume Set, 3rd ed*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2012. 164 p.
26. Moore KL, Persaud VN, Torchia MG. *Before We are Born: Essentials of Embryology and*

Birth Defects. 8th ed. Saunders; 2011. 368 p.

27. Bagnall KM, Harris PF, Jones PRM. A radiographic study of the human fetal spine. *J Anat.* 1977;124:791–802. pmid: 885790

28. Walzer SM, Cetin E, Grübl-Barabas R, Sulzbacher I, Rueger B, Girsch W, Fischer MB. Vascularization of primary and secondary ossification centres in the human growth plate. *BMC Developmental Biology.* 2014;14:36. doi: 10.1186/s12861-014-0036-7

29. Calixto LF, Penagos R, Jaramillo L, Gutiérrez ML, Garzón-Alvarado D. A histological study of postnatal development of clavicle articular ends. *Universitas Scientiarum.* 2015;20(3):361-368. doi: 10.11144/Javeriana.SC20-3.ahso

30. Amizuka N, Hasegawa T, Oda K, Luiz de Freitas PH, Hoshi K, Li M, Ozawa H. Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012 Jan;4:2085-100. pmid: 22202021

31. Asadulaeva MN, Lazko AE. [Mineralizatsiya zakladok trubchatyih kostey cheloveka v razlichnyih geohimicheskikh usloviyah]. *Fundamentalnyie issledovaniya.* 2014;3(9):567-570. Russian

32. Cunningham C, Black S, Scheuer L. *Developmental juvenile osteology.* 2th ed. Academic Press; 2016. 630 p.

33. Castori M, Servadei F, Laino L, Pascolini G, Fabbri R, Cifani AE, Sforzolini GS, Silvestri E, Grammatico P. Axial skeletogenesis in human autosomal aneuploidies: A radiographic study of 145 second trimester fetuses. *Am J Med Genet A.* 2016 Mar;170(3):676-87. doi: 10.1002/ajmg.a.37510.

34. Ahmed YA, Abdelrahim EA, Khalil F. Histological Sequences of Long Bone Development in the New Zealand White Rabbits. *Journal of Biological Sciences.* 2015;4:177-186. doi: 10.3923/jbs.2015.177.186

35. Wilsman NJ, Van Sickle DC. Cartilage canals, their morphology and distribution. *The Anatomical Record.* 1972;173(1):79-93. doi: 10.1002/ar.1091730107

36. Fritsch H, Brenner E, Debbage P. Ossification in the human calcaneus: a model for spatial bone development and ossification. *J Anat.* 2001 Nov;199(Pt5):609-16. doi: 10.1046/j.1469-7580.2001.19950609.x

37. Rivas R, Shapiro F. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2002;84-A1:85–100. doi: 10.2106/00004623-200201000-00013

38. Blumer MJ, Longato S, Richter E, Pérez MT, Konakci KZ, Fritsch H. The role of cartilage canals in endochondral and perichondral bone formation: are there similarities between these two processes? *Journal of Anatomy.* 2005;206(4):359–372. doi: 10.1111/j.1469-7580.2005.00404.x

39. Blumer MJ, Longato S, Fritsch H. Struc-

ture, formation and role of cartilage canals in the developing bone. *Ann Anat.* 2008;190(4):305-15. doi: 10.1016/j.aanat.2008.02.004.

40. Brookes M., Revell W. J. *Blood Supply of Bone: Scientific Aspects.* London: Springer; 2012. 148 p.

41. Slijepčević MD, Ukropina M, Filipović B, Ivanović A. Ossification and development of vertebrae in the Balkan crested newt *Triturus ivanbureschi* (Salamandridae, Caudata). *Zoology.* 2018;126:164-171. doi: 10.1016/j.zool.2017.10.001

42. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2013;5(1):a008334. doi: 10.1101/cshperspect.a008334

43. Berendsen AD, Olsen BR. How Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF) Regulates Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 2014;62(2): 103–108. doi: 10.1369/0022155413516347

44. Petersen W, Tsokos M, Pufe T. Expression of VEGF121 and VEGF165 in hypertrophic chondrocytes of the human growth plate and epiphyseal cartilage. *Journal of Anatomy.* 2002;201(2):153–157. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00085.x

45. Pacifici M, Golden EB, Oshima O, et al. Hypertrophic chondrocytes. The terminal stage of differentiation in the chondrogenic cell lineage? *Ann N Y Acad Sci.* 1990;599:45-57. pmid: 2221676

46. Gibson G, Lin DL, Roque M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture. *Exp Cell Res.* 1997;233:372-82. doi: 10.1006/excr.1997.3576

47. Dwek JR. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal radiology.* 2010;39(4):319-323. doi: 10.1007/s00256-009-0849-9

48. Cheung JO, Grant ME, Jones CJ, et al. Apoptosis of terminal hypertrophic chondrocytes in an in vitro model of endochondral ossification. *J Pathol.* 2003;201:496-503. doi: 10.1002/path.1462

49. Ohba S. Hedgehog signaling in endochondral ossification. *Journal of Developmental Biology.* 2016;4(2):20. doi: 10.3390/jdb4020020

50. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone. 2014;111(33):12097-102. doi: 10.1073/pnas.1302703111

51. Hinton RJ, Jing Y, Jing J, Feng JQ. Roles of Chondrocytes in Endochondral Bone Formation and Fracture Repair. *Journal of Dental Research.* 2017;96(1):23–30. doi: 10.1177/0022034516668321

52. Zelzer E, Olsen BR. Multiple Roles of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Skeletal Development, Growth, and Repair. *Curr Top Dev Biol.* 2005;65:169-87. doi: 10.1016/S0070-2153 (04) 65006-X

Кабак С.Л., Заточна В.В., Мельниченко Ю.М., Мохаммаді Т.М. Гістологічне дослідження осифікації хребців зародків людини.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Вивчення нормального ембріонального розвитку хребетного стовпа має важливе значення для розуміння патогенезу вроджених аномалій осевого скелета. **Мета.** Встановити особливості гістодиференціювання хрящової і кісткової тканини в закладці тіла і дуги хребців різних відділів хребта у зародків людини першої половини внутрішньоутробного розвитку. **Методи.** Матеріалом служили 37 ембріонів і плодів людини 5-20 тижневого віку. Матеріал використовувався для отримання просвітлених препаратів, тотально офарблювався альціановим синім і червоним алізарином, а також для виготовлення гістологічних зрізів, забарвлених гематоксилином і еозином. Використано серійні гістологічні зрізи цілих зародків з ембріологічних колекцій Білоруського державного медичного університету і цифрові зображення серійних гістологічних зрізів ембріонів з колекції Карнегі (проект 3D Atlas of Human Embryology <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/>). **Результати.** «Первинні» центри осифікації виявлені в закладках дуг верхніх шийних, тілах нижніх грудних і верхніх поперекових хребців 9-10-тижневих плодів людини. Вони складаються їх гіпертрофованих хондроцитів, оточених мінералізованим матриксом. Повноцінна осифікація хрящових закладок тіл хребців починається на 12 тижні ембріогенезу. Поява в їх центрі остеїда і структурних елементів паренхіми кісткового мозку передре встановленню судинних каналів. У дугах хребців утворення кісткової тканини відбувається за рахунок ендохондрального і перихондрального остеогенеза. Поруч з центром осифікації формуються три зони росту. Одна з них знаходиться в області ніжки дуги хребця; інша – між пластинкою дуги і остистих відростків; третя – біля основи поперечного відростка. **Підсумок.** За гістологічною структурою центр окостеніння тіла хребця схожий з «вторинним» центром окостеніння в епіфізі довгої трубчастої кістки, а центр окостеніння в дузі хребця на мікроскопічному рівні нагадує центр осифікації в діафізі довгої трубчастої кістки. Відмінності в терміні появи і способи окостеніння тіла і дуг хребця детерміновано різними джерелами їх походження.

Ключові слова: хребець, хрящова тканина, окостеніння, зародок.

Кабак С.Л., Заточная В.В., Мельниченко Ю.М., Мохаммади Т.М. Гистологическое исследование осификации позвонков зародышей человека.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Изучение нормального эмбрионального развития позвоночного столба имеет важное значение для понимания патогенеза врожденных аномалий осевого скелета. **Цель.** Установить особенности гистодифференцировки хрящевой и костной ткани в закладке тела и дуги позвонков различных отделов позвоночника у зародышей человека первой половины внутриутробного развития. **Методы.** Материалом служили 37 эмбрионов и плодов человека 5-20 недельного возраста. Материал использовался для получения просветленных препаратов, тотально окрашивался альциановым синим и красным ализарином, а также для изготовления гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и еозином. Используются серийные гистологические срезы целых зародышей из эмбриологических коллекций Белорусского государственного медицинского университета и цифровые изображения серийных гистологических срезов эмбрионов из коллекции Карнеги (проект 3D Atlas of Human Embryology <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/>). **Результаты.** «Первичные» центры осификации обнаружены в закладках дуг верхних шейных, тел нижних грудных и верхних поясничных позвонков 9-10-недельных плодов человека. Они состоят их гипертрофированных хондроцитов, окруженных минерализованным матриксом. Полноценная осификация хрящевых закладок тел позвонков начинается на 12 неделе эмбриогенеза. Появление в их центре остеоида и структурных элементов паренхимы костного мозга предваряется вращанием сосудистых каналов. В дугах позвонков образование костной ткани происходит за счет ендохондрального и перихондрального остеогенеза. Рядом с центром осификации формируются три зоны роста. Одна из них находится в области ножки дуги позвонка; другая – между пластинкой дуги и остистым отростком; третья – у основания поперечного отростка. **Заключение.** По гистологическому строению центр окостенения тела позвонка сходен с «вторичным» центром окостенения в эпифизе длинной трубчатой кости, а центр окостенения в дуге позвонка на микроскопическом уровне напоминает центр осификации в диафизе длинной трубчатой кости. Различия в сроках появления и способах окостенения тела и дуг позвонка детерминировано разными источниками их происхождения.

Ключевые слова: позвонок, хрящевая ткань, окостенение, зародыш.