

Рис.3. Оптимальная морфо-математическая модель правой венечной артерии и её ветвей при правовенечном варианте ветвления венечных артерий у людей старческого возраста: I – начальная треть огибающей части правой венечной артерии; II – средняя треть огибающей части правой венечной артерии; III – конечная треть огибающей части правой венечной артерии;

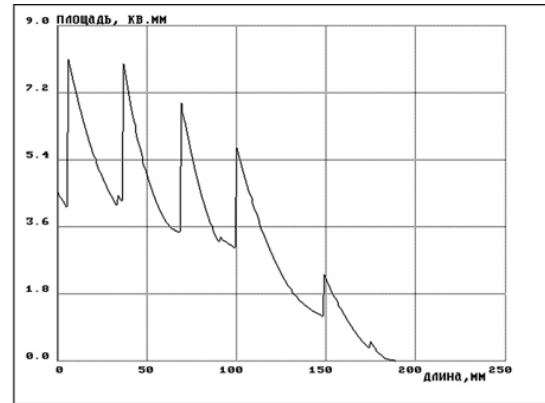


Рис.4. Изменения суммарного просвета правой венечной артерии и её ветвей при правовенечном варианте ветвления венечных артерий у людей старческого возраста

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Глотов, В.А. Структурный анализ микрососудистых бифуркаций / В.А. Глотов. – Смоленск, 1995. – 178 с.
2. Коробкеев, А.А. Возрастная характеристика вариантной анатомии кровеносных сосудов сердца / А.А. Коробкеев, В.В. Соколов. – Ставрополь, 2004. – 156 с.
3. Кульчицкий, К.И. Сравнительная анатомия и эволюция кровеносных сосудов сердца / К.И. Кульчицкий, О.Ю. Роменский. – Киев, 1985. – 176 с.
4. Михайлов, С.С. Клиническая анатомия сердца / С.С. Михайлов. – М., Медицина, 1987. – 288 с.
5. Савилова, В.В. Острый инфаркт миокарда у пожилых: факторы риска и причина летального исхода / В.В. Савилова // Клиническая геронтология. – 2008. – №3. – С. 40-43.

6. Соколов, В.В. Сосуды сердца / В.В. Соколов. – Ростов-н/Д., 1997. – 90 с.
7. Шошенко, К.А. Архитектоника кровеносного русла / К.А. Шошенко, А.С. Голубь, В.И. Брод. – Новосибирск, 1982. – 182 с.
8. Nicus, K.C. Mortality of patients with acute coronary syndromes still remains high: A follow-up study of 1188 consecutive patients admitted to a university hospital / K.C. Nicus, M.J. Escola, V.K. Virtanen et al. // Ann Med. – 2007. – Vol. 39 (1). – P. 63-71.
9. Segev, A. Prognostic significance of admission heart in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes (from the Canadian Acute Coronary Syndrome Registries) / A. Segev, B.H. Strauss, M. Tan et al. // Amer. J. Cardiol. – 2006. – Vol. 98 (4). – P. 470-473.

УДК: 611.018.3-07

### АКТИВНОСТЬ КАНОНИЧЕСКОЙ WNT СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В АРТИКУЛЯРНЫХ ХОНДРОЦИТАХ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЦА В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ СИНОВИАЛЬНОГО СУСТАВА

**С.Л. Кузнецов** – ГОУ ВПО Московская Медицинская Академия им. И.М. Сеченова, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии, чл.-кор. РАМН, доктор медицинских наук, профессор; **А.О. Молотков** – ГОУ ВПО Московская Медицинская Академия им. И.М. Сеченова, докторант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, кандидат медицинских наук. E-mail: andreimolotkov@yahoo.com

### ACTIVITY OF CANONICAL WNT SIGNAL SYSTEM IN HYALINE CARTILAGE ARTICULAR CHONDROCYTES IN PROCESS OF SYNOVIAL JOINT DEVELOPMENT

**S.L. Kuznetsov** – Moscow Medical Academy n.a. I.M. Sechenov, Head of Department of Histology, Cytology and Embryology, Professor, Doctor of Medical Science; **A.O. Molotkov** – Moscow Medical Academy n.a. I.M. Sechenov, Department of Histology, Cytology and Embryology, Candidate of Medical Science. E-mail: andreimolotkov@yahoo.com

**С.Л. Кузнецов, А.О. Молотков, Саратовский научно-медицинский журнал, 2009, том 5, №1, с. 26-31**

Каноническая Wnt сигнальная система (кWntCC) играет важную роль в регуляции остеогенеза, однако, до настоящего времени остается мало изученной роль этой системы в развитии синовиальных суставов и гиалинового хряща. Мы установили: 1) кWntCC неактивна в формирующейся промежуточной зоне сустава и в дифференцирующихся артикулярных хондроцитах на ранних эмбриональных стадиях развития (E10.5 – E14.5); 2) кWntCC активна в артикулярных хондроцитах на этапах позднего эмбрионального развития (E18.5) и в течение постнатального развития (P7 – P10); 3) кWntCC снова неактивна в артикулярных хондроцитах гиалинового хряща сустава взрослых животных. Механизмы и биологическое значение показанной нами регуляции активности кWntCC на разных этапах развития и дифференцировки артикулярных хондроцитов требует дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** Wnt, артикулярные хондроциты, развитие сустава.

**S.L. Kuznetsov, A.O. Molotkov, Saratov Journal of Medical Scientific Research, 2009, vol. 5, №1, p. 26-31**

Canonical and non-canonical Wnt systems are essential regulators of chondrogenesis and bone development. However, the roles of these systems in synovial joint development are not well studied. To determine if canonical Wnt system is active in developing articular chondrocytes we used immunohistochemistry for  $\beta$ -galactosidase and doublecortin (cell-type specific marker for articular chondrocytes) to double label sections through joint regions of E14.5, E18.5, P10 and adult mice. Here the following results are presented. Canonical Wnt signal system does not

work in developing articular chondrocytes at early embryonic stages (E14.5); it is active in the articular chondrocytes at late embryonic stages (E16.5-E18.5) and during postnatal development (P7-P10), but is turned off again in the adult articular chondrocytes. These results suggest that canonical Wnt signaling is being regulated during articular chondrocytes differentiation and joint formation.

**Key words:** canonical Wnt, articular chondrocytes, joint development.

Генетические исследования установили, что Wnt сигнальная система играет важную роль в регуляции развития скелетной ткани [6]. Трубоччатые кости конечностей человека и животных формируются в процессе вторичного (непрямого) остеогенеза [15]. Многочисленными исследованиями установлено, что каноническая и неканоническая Wnt сигнальные системы участвуют в регуляции эндохондрального и перихондрального окостенения [26, 9, 14]. В отличие от хорошо изученных механизмов формирования костной ткани, механизмы развития синовиальных суставов (суставы, соединяющие костные элементы конечностей) изучены недостаточно. Развитие сустава начинается с формирования промежуточной зоны (interzone), разделяющей гомогенную (непрерывную) конденсацию мезенхимы на месте будущего сустава, и образования трехслойной промежуточной зоны [16]. Клетки мезенхимы, расположенные в промежуточной зоне, в ходе дальнейшей дифференцировки приводят к образованию различных клеточных структур сустава (суставные связки, гиалиновый хрящ и др.), в то время как клетки мезенхимы, прилежащие к промежуточной зоне, в дальнейшем участвуют в формировании зоны роста трубчатых костей и костной ткани [22]. Имеющиеся на настоящее время данные свидетельствуют о возможной роли Wnt в формировании синовиальных суставов и в регуляции дифференцировки мезенхимы промежуточной зоны [13]. Поскольку была показана экспрессия Wnt4, Wnt9A, Wnt11, Wnt16 в месте формирования суставов [24], это позволяет предположить роль канонической Wnt сигнальной системы (кWntCC) в регуляции развития структур суставов и в регенерации их тканей, измененных в результате старения или болезни [25]. Отметим, что в последние годы все более широкое распространение получает заместительная клеточная терапия (stem cell therapy) таких распространенных заболеваний суставов, как остеоартрит и ревматоидный артрит [23], что делает проблему изучения роли Wnt в развитии структур суставов высоко актуальной.

Сегодня известны три сигнальные системы, активируемых Wnt сигнальными молекулами: Wnt/Ca<sup>2+</sup> система, Wnt/PCP (planar cell polarity) и  $\beta$ -катенин зависимая кWntCC системы. Основная роль кWntCC системы заключается в регуляции уровня свободного внутриклеточного  $\beta$ -катенина, который, в свою очередь, регулирует экспрессию Wnt-зависимых генов [12]. В отсутствие Wnt сигнала, свободный цитоплазматический  $\beta$ -катенин связывается комплексом GSK3 $\alpha$ /APC/Axin, фосфорилируется и, в последующем, разрушается под воздействием протеаз. Активация кWntCC предотвращает фосфорилирование и деградацию  $\beta$ -катенина, что приводит к повышению уровня свободного  $\beta$ -катенина в цитоплазме, его транслокации в ядро клетки, с последующей активацией транскрипции Wnt-зависимых генов.

В исследованиях на первичной культуре хондроцитов было установлено, что Wnt9A, экспрессия которого показана в тканях сустава, активирует кWntCC в хондроцитах [25]. Генетические исследования на мышах, нокаутированных по Wnt4 и Wnt9A (Wnt4<sup>-/-</sup>; Wnt9A<sup>-/-</sup>) установили кооперативное взаимодействие между Wnt4 и Wnt9A в регуляции развития суставов и поддержании их целостности [25]. Это позволило предположить, что Wnt4 и Wnt9A действуют через кWntCC, направляя дифференцировку хондроцитов в зоне сустава. Однако последние работы убедительно показали, что Wnt4 регулирует внутриклеточную локализацию  $\beta$ -катенина, вызывая передислокацию свободного  $\beta$ -катенина к клеточной мембране, тем

самым предотвращая его транслокацию в ядро клеток и ингибируя активацию кWntCC [8]. В дополнении к этому, Wnt11, экспрессируемый в тканях суставов, взаимодействуя с Lrp6 (ко-рецептор кWntCC), регулирует уровень Axin в цитоплазме клетки [17]. Axin – регулятор кWntCC, ограничивает уровень свободного  $\beta$ -катенина, увеличивая его фосфорилирование и протеолиз, и, таким образом, снижает активность кWntCC [17].

В работе изучена активность кWntCC в структурах синовиальных суставов в процессе эмбрионального (E11 – E18), постнатального развития (P3 – P28) и у взрослых мышей. Используя линию TOPgal (Wnt-репортер) мышей для обнаружения активности кWntCC в тканях [10] и anti-doublecortin (DCX) антитела в качестве специфической метки для артикулярных хондроцитов [27], мы убедительно продемонстрировали, что активность кWntCC регулируется в артикулярных хондроцитах во время эмбрионального и постнатального развития. Показано, что кWntCC неактивна в мезенхиме промежуточной зоны формирующегося сустава на ранних стадиях эмбрионального развития (E10 – E14); активна в дифференцирующихся артикулярных хондроцитах на поздних стадиях эмбрионального развития (E16 – E18) и в течение постнатального развития (P7 – P10), и снова неактивна в артикулярных хондроцитах взрослых животных.

**Материалы и методы.** Для иммуногистохимической оценки экспрессии lacZ, DCX и Vinculin криостатные срезы (10-12 м), полученные у TOPgal мышей на разных стадиях развития (E14.5, E18.5, P7, P10 и взрослых 6-месячных животных), использовали следующие первичные антитела: 1) кроличьи антитела к  $\alpha$ -галктозидазе (lacZ) (1:1000, Cappel, MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA), 2) мышинные антитела к Vinculin (1:100, Santa Cruse Biotechnology, CA, USA), 3) антитела из морской свинки к Doublecortin (DCX) (1:100, Abcam). Вторичные антитела разводили в 1% сыворотке в 0.9% NaCl; во всех случаях вторичные антитела использовали в разведении 1:1000. Были использованы следующие вторичные антитела: 1) Alexa Fluor 488 goat anti-mouse, 2) Alexa Fluor 594 goat anti-mouse, 3) Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit, 4) Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit. Все вторичные антитела производства Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. Для окраски ядер клеток использовался DAPI (1?g/ml).

Результаты ИГХ оценивались на микроскопе Zeiss Axiophot 2, оборудованном камерой AxioCam (Carl Zeiss, Inc., USA). Для получения конфокальных фотографий использовался конфокальный микроскоп Nikon Eclipse C1 (Nikon, USA). Полученные цифровые фотографии обрабатывались в программе Adobe Photoshop.

Для окраски Xgal образцы ткани и целые эмбрионы фиксировали в 1% глутеральдегиде и окрашивали в течение 12-24 часов в растворе субстрата, состоящего из 1 мг/мл 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside (Xgal), 5 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. После окраски эмбрионы и образцы тканей помещали в 3% агарозу и нарезали с толщиной 60-100 ?м на вибротоме (Leica VT1000S, Leica Microsystems, Germany).

Для *in situ* гибридизации образцы тканей фиксировали в течение 12-16 часов в 4% параформальдегиде, нарезали с толщиной 100 ?м на вибротоме Leica VT1000S и хранили при -20°C в 100% метаноле. *In situ* гибридизацию выполняли по методике, описанной ранее [20].

**Результаты и их обсуждение.** Для изучения активации кWntCC в тканях сустава была использована

на линиях TOPgal мышей, в геном которых введен ген  $\beta$ -галактозидазы (lacZ) под управлением LEF/TCF  $\beta$ -катенин возбудимого промотора [10]. Таким образом, у TOPgal мышей экспрессия lacZ прямо связана с активацией  $\kappa$ WntCC и наличием свободного  $\beta$ -катенина в клетках. Экспрессия lacZ в тканях может быть обнаружена окраской с Xgal [10] или методом иммуногистохимии (ИГХ) с помощью специфических антител к lacZ. TOPgal мыши с высоким успехом использовались в многочисленных исследованиях, направленных на изучение активации  $\kappa$ WntCC в различных тканях, как на этапах эмбрионального, так и постнатального развития, а также для выявления новых потенциальных мест сигнальной активности  $\kappa$ WntCC. Во всех случаях активация экспрессии lacZ совпала с доказанной функцией  $\kappa$ WntCC в этих тканях [5].

На TOPgal мышах была применена Xgal окраска в почках передних конечностей E10 – E14 (эмбриональный день 10 – 14) мышечных эмбрионов (рис. 1). Отметим, что у E10.5 эмбрионов была обнаружена Xgal окраска, свидетельствующая об активности  $\kappa$ WntCC в клетках, в дорзальной и вентральной поверхностной эктодерме (длинные стрелки на рис. 1,А) и в апикальном эктодермальном гребне (АЭГ) (короткая стрелка на рис. 1,А). Помимо этого была изучена Xgal окраска на поперечных срезах, проходящих через почку передней конечности (рис. 1,Б). Установлено, что кроме поверхностной эктодермы и АЭГ, Xgal окраска присутствует в мезенхиме, непосредственно прилежащей к поверхностной эктодерме (длинные стрелки на рис. 1,Б), но отсутствует в зоне уплотнения мезенхимы – зародышевой зоны формирования будущей кости (показана прерывистой линией на рис. 1,Б). Обнаруженный паттерн Xgal окраски хорошо коррелирует с известным паттерном экспрессии Wnt сигнальных молекул (Wnt5A, Wnt7A и Wnt3) на стадии раннего развития конечности [9]. Экспрессия Wnt7A установлена в дорзальной поверхностной эктодерме, где Wnt7A, действуя через каноническую и неканоническую Wnt сигнальные системы, регулирует процессы развития дорзальной стороны конечности и участвует в поддержании паттерна экспрессии генов вдоль дорзально-вентральной оси конечности [1]. Экспрессия Wnt3 показана в АЭГ, где Wnt3, являющийся активатором  $\kappa$ WntCC, играет ключевую роль в поддержании функций АЭГ и формировании дистальных структур конечности [7]. Wnt5A экспрессируется в дистальной мезенхиме, где регулирует клеточную пролиферацию и скорость проксимально-дистального роста развивающейся конечности [9]. Показанное в работе отсутствие Xgal окраски в зоне уплотнения мезенхимы (рис. 1,Б) подтверждает существующую на настоящий момент гипотезу, что низкая активность  $\kappa$ WntCC необходима для дифференцирования мезенхимы в хондроциты, а активация  $\kappa$ WntCC подавляет дифференцировку клеток мезенхимы в хондроциты за счет взаимодействия между  $\beta$ -катенин и Sox9 [2].

У E12.5 эмбрионов Xgal окраска была обнаружена в зоне хондрогенного уплотнения, развивающихся костей предплечья и плеча – лучевой (Лу), локтевой (Л) и плечевой (П) (рис. 1, В,Г, стрелки указывают на местоположение будущего локтевого сустава). Важно, что Xgal окраска не была обнаружена в области формирующегося локтевого сустава, а также в зоне, разделяющей локтевую и лучевую кости (стрелки на рис. 1, В,Г). Отсутствие Xgal окраски в области формирующегося локтевого сустава свидетельствует, что  $\kappa$ WntCC не играет активной роли в формировании промежуточной зоны и на ранних стадиях развития локтевого сустава. Эти результаты противоречат ранее высказанной гипотезе [24], что  $\kappa$ WntCC подавляет хондрогенный потенциал клеток,

находящихся в промежуточной зоне, не позволяя им дифференцироваться в хондроциты и, таким образом, обеспечивая формирование сустава. Действительно, полученные нами данные показывают, что на этой стадии развития (E12.5) Wnt4 (рис. 1,Д) и Wnt11 (рис. 1,Е) экспрессируются в зоне локтевого сустава (длинные стрелки на рис. 1, Д,Е,Ж), а Wnt5A экспрессируется в надкостнице (perichordium) плечевой кости (длинные стрелки на рис. 1,Ж). Отметим также, что экспрессия Wnt9A и Wnt16 была показана в районе суставов на ранних стадиях развития [21]. В пользу упомянутой гипотезы [25] также говорят данные, полученные в экспериментах с использованием Wnt4<sup>-/-</sup>;Wnt9A<sup>-/-</sup> мышей. Потеря экспрессии Wnt4 и Wnt9A у таких мышей привела к метаплазии и полному сращению нескольких суставов [24]. Более того, эктопическая экспрессия Col2a1 (специфический маркер хондроцитов) была показана в районе локтевого сустава Wnt4<sup>-/-</sup>;Wnt9A<sup>-/-</sup> мышей, что свидетельствует о возможной роли Wnt в регуляции хондрогенного потенциала клеток промежуточной зоны. В совокупности с данными о способности Wnt9A активировать  $\kappa$ WntCC, приведенные результаты говорят в пользу активной роли канонического пути в развитии суставов. Однако результаты нашей работы не укладываются в эту гипотезу. Они в большей мере свидетельствуют, что  $\kappa$ WntCC не играет активной роли в формировании промежуточной зоны. Это подтверждают и недавно опубликованные результаты работ, доказывающие, что Wnt4 и Wnt11 являются не активаторами, а, наоборот, ингибиторами  $\kappa$ WntCC [8, 17]. Наши результаты косвенно подтверждаются данными, полученными с использованием мышей, нокаутированных по  $\beta$ -катенину [24]. В отсутствие  $\beta$ -катенина (ключевого компонента  $\kappa$ WntCC, без которого функционирование этой системы невозможно) у этих мышей сохранялась экспрессия генных маркеров, характерных для клеток промежуточной зоны развивающихся суставов, что доказывает отсутствие значимой роли  $\kappa$ WntCC в регуляции или поддержании фенотипа клеток промежуточной зоны суставов.

На основании полученных результатов и приведенных выше данных других авторов мы полагаем, что  $\kappa$ WntCC не активен на ранних этапах развития суставов и формирования промежуточной зоны, и что дефекты развития суставов, описанные у Wnt4<sup>-/-</sup>;Wnt9A<sup>-/-</sup> мышей, связаны с возможной ролью этих сигнальных молекул в активации неканонической Wnt сигнальной системы.

У E14.5 эмбрионов мы обнаружили яркую Xgal окраску в районе развивающихся трубчатых костей (лучевой, локтевой и плечевой) и пальцевых фаланг (рис. 1, 3,И,К). Характерно, что, как и в случае E12.5, Xgal окраска отсутствовала в районе формирующегося локтевого сустава (длинные стрелки на рис. 1,И) и суставов между фалангами пальцев (короткие стрелки на рис. 1, 3,И). Последнее соответствует результатам, полученным с использованием E12.5 эмбрионов, и подтверждает мысль, что  $\kappa$ WntCC не активна в клетках промежуточной зоны на ранних эмбриональных стадиях развития суставов.

Артикулярные хондроциты – вытянутые, веретенообразные клетки, которые играют ключевую роль в развитии и поддержании функций синовиальных суставов. Предполагается, что артикулярные хондроциты происходят из клеток промежуточной зоны, или из клеток, расположенных в пролиферативной части зоны роста (growth plate) трубчатых костей [16, 22].

В работе был использован метод иммуногистохимии (ИГХ) с антителами, специфически связывающимися с doublecortin (DCX), чтобы пометить артикулярные хондроциты. Подчеркнем, что DCX является специфическим маркером артикулярных хондроци-

тов, а экспрессия DCX не обнаружена в хондроцитах, а экспрессирующая в формировании костной ткани [27].

Для изучения роли *kWntCC* в развитии артикулярных хондроцитов были помечены срезы через локтевой сустав TOPgal мышей на стадиях эмбрионального (E14.5 и E18.5) и постнатального (P7, P10) развития антителами к *lacZ* и DCX.

Хондроциты дифференцируются из клеток мезенхимы в процессе уплотнения (конденсация) мезенхимы [3]. В работе мы изучили экспрессию клеточных маркеров, характерных для клеток мезенхимы и артикулярных хондроцитов одновременно с оценкой активности *kWntCC* в этих клетках. У E14.5 эмбрионов мезенхимальные клетки, помеченные антителами к Vinculin (красная метка на рис. 2, А), находились в наружных слоях формирующейся промежуточной зоны, в то время как артикулярные хондроциты (помечены антителами к DCX, зеленая метка на рис. 2, А) располагались в среднем слое промежуточной зоны (см. рис. 2, А1). Интересно, что многие из DCX положительных клеток (артикулярные хондроциты) также были помечены антителами к Vinculin (длинные стрелки на рис. 2, А1). Это свидетельствует, что на данной стадии эмбрионального развития (E14.5) экспрессия клеточных маркеров, характерных для мезенхимы, по-прежнему обнаруживается в дифференцирующихся артикулярных хондроцитах.

С целью изучения активности *kWntCC* были помечены срезы через переднюю конечность эмбрионов TOPgal мышей (E14.5) антителами к Vinculin и *lacZ* (рис. 2, Б, Б1). Интенсивная *lacZ* окраска была обнаружена в хондроцитах, расположенных в зоне роста длинных костей (звездочка на рис. 2, Б). Клетки мезенхимы (Vinculin+ клетки), расположенные во внешних слоях промежуточной зоны, прилежащих к зоне роста кости, были помечены антителами к Vinculin и *lacZ* (Vinculin+ и *lacZ*+) (рис. 2, Б1). Это свидетельствует, что *kWntCC* активен в клетках мезенхимы промежуточной зоны. Важно, что окраска срезов, проходящих через передние конечности E14.5 TOPgal эмбрионов, с антителами к *lacZ* (красная окраска) и DCX (зеленая окраска) показала, что только малая часть артикулярных хондроцитов (DCX+ клетки), расположенных в непосредственной близости от зоны *lacZ*+ клеток мезенхимы, были помечены одновременно *lacZ* и DCX антителами (стрелки на рис. 2, В). Это свидетельствует, что *kWntCC* активна только в малой части артикулярных хондроцитов на данной стадии развития (E14.5).

У E18.5 эмбрионов артикулярные хондроциты (DCX+ клетки веретенообразной формы) формируют слой клеток (толщины в 2-3 клетки) на поверхности эпифиза костей, входящих в локтевой сустав (зеленая окраска на рис. 2, Г, Г1). Важно, что в отличие от данных, полученных на E14.5 эмбрионах, большинство артикулярных (DCX+) хондроцитов также *lacZ*+ (т.е. метятся антителами к *lacZ*) (длинные стрелки на рис. 2, Г1). Это свидетельствует, что на данной стадии развития (E18.5) *kWntCC* активна в большинстве (если не во всех) артикулярных хондроцитах. Окраска с антителами к Vinculin была обнаружена только на поверхности эпифиза; ни одной клетки, помеченной одновременно антителами к Vinculin и к DCX или *lacZ*, на данном этапе развития обнаружено не было (рис. 2, Д).

Была использована окраска с Xgal и методы ИГХ для анализа активности *kWntCC* в артикулярных хондроцитах на стадиях постнатального развития. Xgal окраска продольных срезов через эпифиз бедренной кости (рис. 3, А, А1), полученных у постнатальных (P) 7 TOPgal мышей выявила наличие множества Xgal+ веретенообразных клеток, расположенных в поверхностном слое (гиалиновом хряще)

эпифиза (длинные стрелки на рис. 3, А1). Сходные результаты были получены с использованием ИГХ с антителами к *lacZ* на срезах эпифиза, взятых у P10 TOPgal мышей (рис. 3Б). Характерные веретенообразные *lacZ*+ клетки расположены в поверхностном слое (гиалиновом хряще) эпифиза (стрелки на рис. 3, Б1); некоторые из этих клеток были также DCX+ (стрелки на рис. 3, Б2). Наложение этих фотографий (Рис. 3Б3) показывает, что часть артикулярных хондроцитов (DCX+ клетки) также *lacZ*+ (стрелки на рис. 3, Б3). Это доказывает, что *kWntCC* активна в артикулярных хондроцитах на этапах постнатального развития.

Для изучения активности *kWnt* в артикулярных хондроцитах взрослых животных, были окрашены срезы через локтевой сустав, взятые у TOPgal мышей в возрасте 6 месяцев, используя ИГХ с антителами к *lacZ* и DCX (рис. 3, В, Г). Многочисленные DCX+ клетки (артикулярные хондроциты) были обнаружены в поверхностном слое гиалинового хряща суставной поверхности (рис. 3, В). ИГХ с использованием антител к *lacZ* показала, что активность *kWntCC* отсутствует в клетках, расположенных в поверхностном слое эпифиза, но активна в клеточной популяции, расположенной во внутренней зоне эпифиза кости (длинные стрелки на рис. 3, Г); мы не смогли обнаружить клетки с двойной DCX+ и *lacZ*+ окраской. Важно также, что *lacZ*+ клетки полностью отсутствовали в поверхностном слое гиалинового хряща.

Таким образом, результаты нашей работы свидетельствуют, что *kWntCC* неактивна в артикулярных хондроцитах гиалинового хряща в синовиальных суставах взрослых животных. Заслуживает внимания выявленная нами популяция *lacZ*+ клеток, располагающаяся во внутреннем слое эпифиза. Как установлено, активация *kWntCC* в клеточной популяции у взрослых животных и человека является характерной чертой их принадлежности к стволовым клеткам, расположенным в этой ткани [4, 18, 19]. Действительно, стволовые клетки были успешно изолированы из гиалинового хряща, полученного из сустава взрослого человека [11].

В процессе исследования мы не обнаружили *lacZ*+ клеток в гиалиновом хряще, но популяция *lacZ*+ клеток была найдена в зоне эпифиза, непосредственно примыкающей к гиалиновому хрящу (рис. 3, В, Г). Эти результаты требуют дальнейших исследований, направленных на выявление роли и функции *lacZ*+ клеток в регенерации гиалинового хряща и эпифиза кости, поврежденных вследствие старения или болезни. Другими словами, необходимо выяснить являются ли эти клетки действительно стволовыми клетками, способными дифференцировать в артикулярные хондроциты.

Полученные результаты достаточно убедительно свидетельствуют – каноническая *Wnt* сигнальная система не активна на ранних стадиях эмбрионального развития суставов (стадия формирования промежуточной зоны), что противоречит гипотезе участия *kWntCC* в регуляции дифференцировки клеток промежуточной зоны. Наши данные показывают, что активность *kWntCC* динамично изменяется в процессе развития артикулярных хондроцитов гиалинового хряща. Мы установили, что *kWntCC* не активна в дифференцирующих артикулярных хондроцитах на ранних стадиях развития (E14.5) и в артикулярных хондроцитах суставов взрослых животных, но активна на этапах позднего эмбрионального (E18.5) и постнатального развития (P7 – P10). Что касается биологической роли и механизмов обнаруженной нами регуляции активности *kWntCC* в артикулярных хондроцитах, то они требуют дальнейшего изучения.

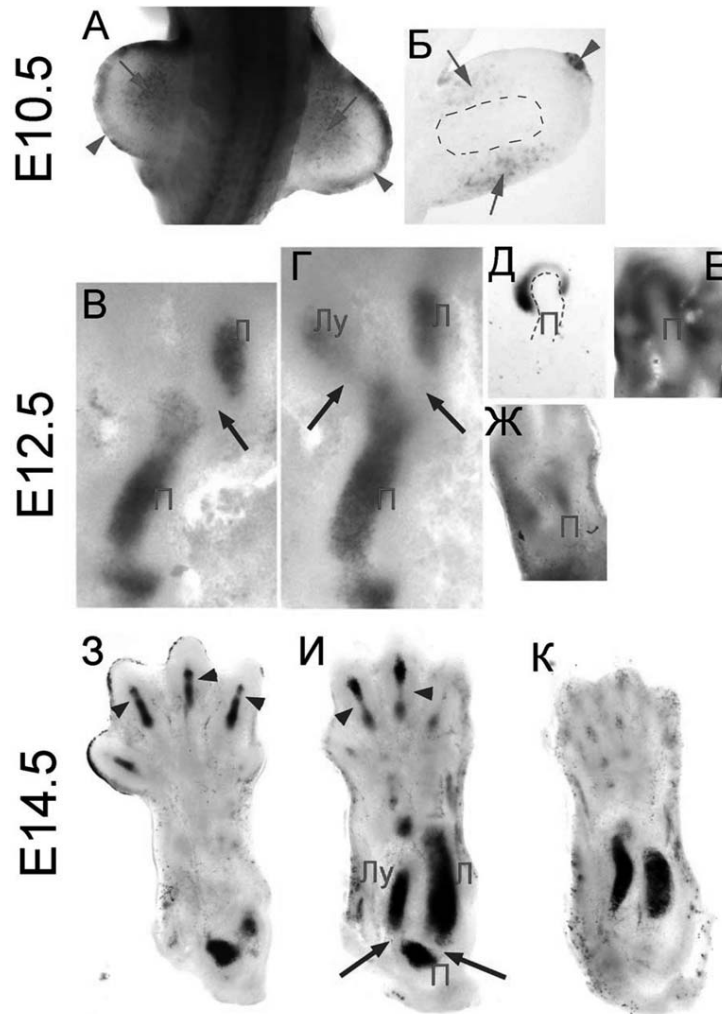


Рис. 1. Активность  $\kappa$ WntCC на ранних этапах эмбрионального развития. **А** – Xgal окраска E10.5 TOPgal эмбрионов; **Б** – Xgal окраска поперечных срезов через почку передней конечности E10.5 TOPgal эмбрионов; **В, Г** – Xgal окраска срезов через передние конечности E12.5 TOPgal эмбрионов (Лу, лучевая кость; Л, локтевая кость; П, плечевая кость); **Д, Е, Ж** – *In situ* гибридизация на срезах через передние конечности E12.5 эмбрионов Д – Wnt4, Е – Wnt11, Ж – Wnt5A); **З, И, К** – Xgal окраска срезов через переднюю конечность E14.5 TOPgal эмбрионов

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Adamska, M. Genetic interaction between Wnt7a and Lrp6 during patterning of dorsal and posterior structures of the mouse limb / M. Adamska, A.C. Billi, S. Cheek et al. // *Dev Dyn.* – 2005. – V. 233(2). – P. 368-72.
- Akiyama, H. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation / H. Akiyama, J.P. Lyons, Y. Mori-Akiyama et al. // *Genes Dev.* – 2004. – V. 18(9). – P. 1072-87.
- Archer, C.W. and Francis-West, P. The chondrocyte // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2003. – V. 35(4). – P. 401-4.
- Barker, N. Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells / N. Barker, H. Clevers // *Gastroenterology.* – 2007. – V. 133(6). – P. 1755-60.
- Barolo, S. Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef? / S. Barolo // *Oncogene.* – 2006. – V. 25(57). – P. 7505-11.
- Baron, R. Wnt signaling: a key regulator of bone mass / R. Baron, G. Rawadi, S. Roman-Roman // *Curr Top Dev Biol.* – 2006. – V. 76. – P. 103-27.
- Barrow, J.R. Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge / J.R. Barrow, K.R. Thomas, O. Boussadia-Zahui // *Genes Dev.* – 2003. – V. 17(3). – P. 394-409.
- Bernard, P. Wnt4 inhibits beta-catenin /TCF signaling by redirecting beta-catenin to the cell membrane / P. Bernard, A. Fleming, A. Lacombe // *Biol Cell.* – 2007. – V. 1. – P. 1.
- Church, V.L. Wnt signalling during limb development / V.L. Church, P. Francis-West // *Int J Dev Biol.* – 2002. – V. 46(7). – P. 927-36.
- DasGupta, R. Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation / R. DasGupta, E. Fuchs // *Development.* – 1999. – V. 126(20). – P. 4557-4568.
- Dowthwaite, G.P. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population / G.P. Dowthwaite, J.C. Bishop, S.N. Redman // *J Cell Sci.* – 2004. – V. 117(Pt 6). – P. 889-97.
- Gordon, M.D. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors / M.D. Gordon, R. Nusse // *J Biol Chem.* – 2006. – V. 281(32). – P. 22429-33.
- Hartmann, C. Skeletal development—Wnts are in control / C. Hartmann // *Mol Cells.* – 2007. – V. 24(2). – P. 177-84.
- Hartmann, C. A. Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis / C. A. Hartmann // *Trends Cell Biol.* – 2006. – V. 16(3). – P. 151-8.
- Karsenty, G. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development / G. Karsenty, E.F. Wagner // *Dev Cell.* – 2002. – V. 2(4). – P. 389-406.

16. Khan, I.M. The development of synovial joints / I.M. Khan, S.N. Redman, R. Williams // *Curr Top Dev Biol.* – 2007. – V. 79. – P. 1-36.
17. Kofron, M. Wnt11/beta-catenin signaling in both oocytes and early embryos acts through LRP6-mediated regulation of axin / M. Kofron, B. Birsoy, D. Houston // *Development.* – 2007. – V. 134(3). – P. 503-13.
18. McGowan, S.L. Stem cell markers in the human posterior limb and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas / S.L. McGowan, H.F. Edelhauser, R.R. Pfister // *Mol Vis.* – 2007. – V. 13. – P. 1984-2000.
19. Michaelidis, T.M. Wnt signaling and neural stem cells: caught in the Wnt web / T.M. Michaelidis, D.C. Lie // *Cell Tissue Res.* – 2008. – V. 331(1). – P. 193-210. Epub 2007 Sep 9.
20. Molotkov, A. Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning / A. Molotkov, N. Molotkova, G. Duyster // *Development.* – 2006. – V. 133(10). – P. 1901-10.
21. Pacifici, M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries / M. Pacifici, E. Koyama, M. Iwamoto // *Birth Defects Res C Embryo Today.* – 2005. – V. 75(3). – P. 237-48.
22. Pacifici, M. Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation / M. Pacifici, E. Koyama, Y. Shibukawa // *Ann N Y Acad Sci.* – 2006. – V. 1068. – P. 74-86.
23. Richter, W. Cell-based cartilage repair: illusion or solution for osteoarthritis / W. Richter // *Curr Opin Rheumatol.* – 2007. – V. 19(5). – P. 451-6.
24. Spater, D. Role of canonical Wnt-signalling in joint formation / D. Spater, T.P. Hill, M. Gruber // *Eur Cell Mater.* – 2006. – V. 12. – P. 71-80.
25. Spater, D. Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis / D. Spater, T.P. Hill, R. J. O'Sullivan // *Development.* – 2006. – V. 133(15). – P. 3039-49.
26. Yang, Y. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation / Y. Yang, L. Topol, H. Lee // *Development.* – 2003. – V. 130(5). – P. 1003-15.
27. Zhang, Y. Doublecortin is expressed in articular chondrocytes / Y. Zhang, J.A. Ryan, P.E. Di Cesare // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – V. 19. – P. 19.

УДК 616.1 – 057.875 – 035.2:612.172.6]:001.891(045)

### МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ СТУДЕНТОВ

**А.В. Лобачева** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, ассистент кафедры лечебной физкультуры, спортивной медицины и физиотерапии; **В.Н. Николенко** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, проректор по научной работе, заведующий кафедрой анатомии человека, профессор, доктор медицинских наук; **А.А. Свистунов** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, проректор по учебной работе, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, профессор, доктор медицинских наук; **С.Л. Бибер** – Университет Вайоминга, США, заведующий кафедрой статистики, профессор, доктор медицинских наук. E-mail: Alina\_Lobacheva@mail.ru

### MORPHOFUNCTIONAL INDICES AND RISK FACTORS OF CARDIOVASCULAR HEART DISEASES AT STUDENTS' HEALTH EVALUATION

**A.V. Lobacheva** – Saratov State Medical University, Department of Therapeutic Physical Training, Sport Medicine and Physiotherapy, Assistant; **V.N. Nikolenko** – Saratov State Medical University, Pro-rector of Scientific work, Head of Department of Human Anatomy, Professor, Doctor of Medical Science; **A.A. Svistunov** – Saratov State Medical University, Pro-rector of Educational work, Head of Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Professor, Doctor of Medical Science; **S.L. Bieber** – University of Wyoming, USA, Head of Department of Statistics, PhD Professor. E-mail: Alina\_Lobacheva@mail.ru

**А.В. Лобачева, В.Н. Николенко, А.А. Свистунов, С.Л. Бибер, Саратовский научно-медицинский журнал, 2009, том 5, №1, 31-36**

В работе отражены результаты изучения морфо-функциональных показателей, определения соматотипов, выявления факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, оценки состояния здоровья студентов, которые могут быть использованы для разработки индивидуальных программ его сохранения.

**Ключевые слова:** антропометрия, тип конституции, факторы риска, здоровый образ жизни.

**A.V. Lobacheva, V.N. Nikolenko, A.A. Svistunov, S.L. Bieber, Saratov Journal of Medical Scientific Research, 2009, vol. 5, №1, p. 31-36**

This article contains the results of examination of morphofunctional parameters; determination of somatotypes; identification of cardiovascular diseases' risk factors, and evaluation of health condition of students – all of which can be used for the development of personalized health preservation programs.

**Key words:** anthropometrical examination, constitutional type, risk factors, healthy life style.

Состояние здоровья нации и, в первую очередь, молодого поколения свидетельствует об эффективности системы здравоохранения. Человек и его здоровье – это главное достояние и главный приоритет социальной политики государства и является предметом пристального внимания Министров образования и здравоохранения РФ [6,8]. Удельный вес сердечно-сосудистых заболеваний в структуре общей смертности остается высоким, причем лидирующее положение занимает ишемическая болезнь сердца и цереброваскулярная патология [8]. Такие факторы риска, как курение, гиподинамия, избыточный вес, нарушения режима питания и рациона, артериальная гипертензия, сахарный диабет, наследственная предрасположенность, лидируют в развитии сердечно-сосудистых заболеваний [3, 6, 8]. Эта проблема остается акту-

альной и в настоящее время, так как недостаточная информация о состоянии здоровья студентов затрудняет проведение первичной профилактики. Для усовершенствования профилактических мероприятий возможно использование методов клинической антропологии [2, 5, 7, 10], которые позволяют на основании изучения соматотипов [1, 4, 9] выделить группы студентов, имеющих факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Существующие в литературе столь необходимые данные явно недостаточны, а подчас и противоречивы.

В связи с этим **целью** работы явилось выявление морфо-функциональных показателей, факторов риска и степени риска сердечно-сосудистых заболеваний для оценки состояния здоровья студентов и разработки программ его сохранения.