

РАСТРОВА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ КІСТОК ЩУРІВ, ЯКІ ЗНАХОДИЛИСЯ ПІД ВПЛИВОМ ГІПООСМОЛЯРНОЇ ГІПЕРГІДРІЇ

Ткач Г.Ф., Погорєлов М.В., Голобородько Л.В.

Медичний інститут Сумського державного університету

Вступ. Растрова електронна мікроскопія з мікроаналізом – морфо-функціональний метод дослідження, який дозволяє одночасно вивчити структурні особливості органу та визначити розподіл основних хімічних елементів на його поверхні. Особливо актуальним є проведення даного дослідження для визначення особливості розподілу елементів високомінералізованих тканин – кісткової, дентину та емалі в нормі та за умов порушень гомеостазу організму [1].

Одним з найменш вивчених чинників, який може викликати порушення будови та функції кістки як органу є порушення водно-сольового обміну [2]. Змінам фізіологічного та репаративного остеогенезу в умовах дегідратаційних порушень водно-електролітного балансу присвячено безліч робіт, в той час як зміни кісткової тканини за дії гіпергідратації майже не вивчалися. Але ж гіпергідріє є досить частим супутником багатьох патологій ендокринної, серцево-судинної та сечовидільної систем та може довгий час протікати безсимптомно [2].

Тому **метою нашої роботи** стало вивчення особливості будови та розподілу основних елементів кісткового матриксу на поверхні плечових, кульшових кісток та ІІІ поперекового хребця в умовах впливу гіпоосмолярної гіпергідрії різного ступеню у тварин молодого, зрілого та старечого віку.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження виконані на 240 білих щурах-самцях молодого (4-х місяців), репродуктивного (8-и місяців) та старечого віку (22 місяців). Всі тварини були поділені на наступні серії: контрольну та експериментальну. Щурі контрольної серії знаходились на звичайному харчовому та питному режимі. Експериментальним щурам моделювали гіпоосмолярну гіпергідратацію легкого, середнього та важкого ступеню. Для досягнення гіпергідрії тваринам зондово вводили дистильовану воду в кількості 10 мл тричі на добу. Також використовували виварені знесолені харчі для зменшення надходження солей в організм. Для запобігання фізіологічної підтримки водного гомеостазу та досягнення необхідного ступеня гідратації щурам вводили синтетичний аналог АДГ (вазопресину) – "Минирін" (Ferring). Тривалість моделювання гіпергідрії залежала від її ступеня та віку тварин: у щурів молодого віку легкий ступінь гіпергідрії досягався через 5 днів (зростання гідратації на 5%), середньої тяжкості – 10 днів (зростання гідратації на 8%) та важкого ступеня – 15 днів (зростання гідратації на 15%). У щурів зрілого віку відповідні ступені гіпергідратації досягались на 10, 15 та 25 день, у тварин старечого віку – на 10, 20 та 25 день.

Тварин виводили з експерименту шляхом передозування наркозу зразу після досягнення відповідного ступеню гіпергідрії. Для визначення реадaptaційних процесів в скелеті за умов важкого ступеню гіпергідратації проводився забір матеріалу через 7, 14, 21 та 30 днів після закінчення експерименту і переходу тварин на звичайний питний і

харчовий режими. Вилучалися плечові, кульшові кістки та ІІІ-й поперековий хребець, які фіксували в глутаральдегіді впродовж 1 доби з дофіксацією в 1% розчині осмію та зневодненням у спиртах зростаючої концентрації (50 – 70 – 80 – 90 та 100%). Отримані зразки заливали в суміші смол "Епон-аралдит". Після полімеризації смоли проводили полірування поверхні досліджуваної кістки. Для покращення візуалізації підготовлену поверхню напиляли сріблом та золотом у стандартній вакуумній установці ВУП-5. Інформації про розподіл основних елементів кістки (кальцію і фосфору) проводили за допомогою растрового електронного мікроскопа РЕММА-102 при збільшенні від 10 до 2500 разів. Визначення вмісту кальцію та фосфору на РЕММА в плечовій кістці проводили в 3 точках: проксимальному та дистальному епіфізі та середині діафізу; в кульшовій кістці та поперековому хребці – в ділянці середини їх тіла [3].

Отримані цифрові дані оброблялися статистично на персональному комп'ютері з використанням програми "ATESTAT" для MS EXCEL [4]. Достовірність розходження експериментальних і контрольних даних оцінювали з використанням критерію Стьюдента, достовірною вважали ймовірність помилки менше 5% ($p \leq 0,05$). З метою виявлення факту й ступеня впливу контрольованих факторів (ступінь гіпергідратації і вік тварин) на результуючі ознаки провели двофакторний дисперсійний аналіз.

Результати та їх обговорення. У тварин молодого та зрілого віку растрова електронна мікроскопія не показала наявності структурних змін компактною речовини діафізу та губчастою речовини кульшової кістки та поперекового хребця. При цьому за умов середнього ступеню гіпергідрії помітне зростання сполучної речовини та наявність сплюснених клітин в хрящовій пластинці росту зазначених кісток.

У щурів старечого віку навіть легкий ступінь порушень ВЕБ призводить до порушення структури досліджуваних кісток у вигляді розшарування пластинок, зменшення кількості остеонів та звуженні їх каналів, наявності поодиноких мікротріщин. Епіфізарний хрящ дещо витончений зі збільшеною кількістю сполучної речовини. Трабекули губчастої речовини кульшової кістки та поперекового хребця незначно витончені, подекуди з розмитим нерівним контуром та пустими остеоцитарними лакунами. За умов середнього ступеню гіпергідратації в компактній речовині діафізу зустрічаються чисельні мікротріщини, первинні остеони та лакуни остеокластичної резорбції (рис. 1). Епіфізарний хрящ характеризується наявністю значної кількості сполучної речовини та нерівномірним розташуванням хондроцитів. Трабекули губчастої речовини нерівномірно витончені з нерівними краями та узурями. Кількість клітин зменшена, відбувається розширення міжтрабекулярного простору. Часто зустрічаються мікротріщини та поодинокі мікропереломи, особливо на поперечних перемичках.

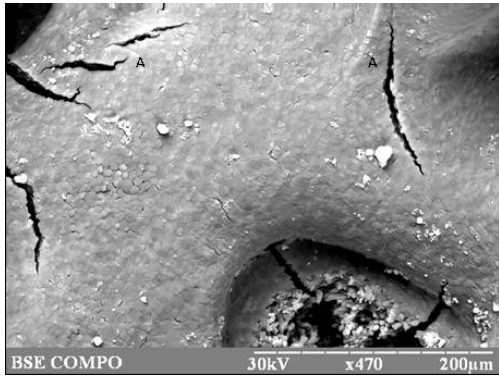


Рис. 1. Растрова електронна мікроскопія трабекули кульшової кістки шура старечого віку в умовах гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеню. Зб. 470. А – мікротріщини.

Важкий ступень гіпоосмолярної гіпергідратації характеризується наявністю структурних змін в кістках тварин всіх вікових груп. Особливості виявлених змін полягають в ступені порушень будови кісток в різних вікових групах. Мінімальні зміни спостерігаються у тварин зрілого та молодого віку, максимальні у шурів старечого віку. Порушення структури кісток даної вікової групи характеризується наявністю значного числа мікротріщин як компактною так і губчастою речовини. Місцями вони зливаються, утворюючи переломи трабекул (рис. 2). Останні значно витончені з нерівними розмитими краями, майже без клітин на поверхні. Конуси ремоделювання характеризуються відсутністю остеобластів, що характерно для значного зменшення активності процесів синтезу кісткового матриксу. Наростковий хрящ плечової кістки та ростова зона кульшової і поперекового хребця характеризуються хаотичним розміщенням хондроцитів та значним масивом сполучної речовини.

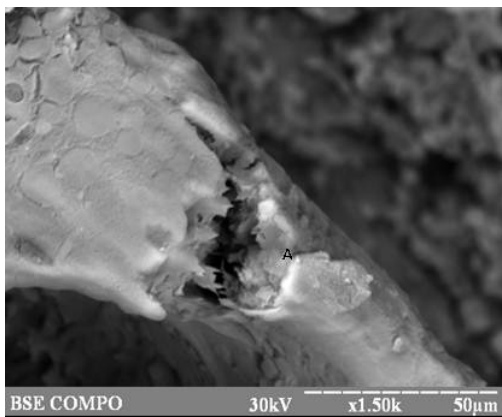


Рис. 2. Растрова електронна мікроскопія трабекули поперекового хребця шура старечого віку в умовах гіпоосмолярної гіпергідрії важкого ступеню через добу після закінчення експерименту. Зб. 1500. А – мікротріщина.

В період реадптації відбувається наростання структурних змін в усі вікові періоди з максимальною маніфестацією на 14 добу спостереження. Співставляючи дані растрової електронної мікроскопії з результатами світлооптичної мікроскопії можна зробити висновок, що 14-21 доба реадптаційного періоду є ключовою точкою початку відновлення пошкоджених структур. Це може бути пов'язане з термінами ремоделювання, цикл якого триває від 45 до 90 днів [5]. Таким чином, дія зовнішньосередовищного фактору (гіпергідрія) призводить до уповільнення циклу ремоделювання, активність якого відновлюється після припинення впливу гіпергідратації.

До 14-21 доби реадптаційного періоду відбувається посилення процесів синтезу і спостерігається мікроскопічне відновлення структури кісткової тканини. З іншого боку, за механостатичною гіпотезою Н. Frost [5], гіпергідрія може призводити до порушення проведення механічних та біохімічних сигналів до клітин в глибині кістки, які є частиною кісткової ремоделюючої одиниці (BRU) [5]. Покращення водно-сольового обміну в період реадптації відновлює роходження зазначених сигналів, що виявляється у активації процесів ремоделювання і відновлення структури пошкодженого органу.

Зондовий мікроаналіз досліджуваних кісток показав втрату основних елементів кристалічної ґратки гідроксилапатиту у тварин всіх вікових груп. При цьому рівень зменшення кальцію та фосфору має виражену вікову залежність. У тварин молодого та зрілого віку легкий ступень гіпергідратації не викликає втрати зазначених елементів у досліджуваних кістках. У тварин старечого віку рівень втрати кальцію коливається від 5,68% ($p \leq 0,05$) в діяфізі плечової кістки до 8,33% ($p \leq 0,05$) – в дистальному епіфізі, фосфору – від 5,74% ($p \leq 0,05$) в проксимальному епіфізі кульшової кістки до 7,58% ($p \leq 0,05$) – в III поперековому хребці. Середній ступень гіпергідратації викликає достовірне зменшення кальцію та фосфору в усіх вікових групах, при цьому максимальні зміни спостерігаються у тварин старечого віку і досягають 11,86% ($p \leq 0,05$). Найбільші втрати елементів спостерігаються в проксимальному епіфізі плечової кістки та в тілі кульшової, що може бути внаслідок більш активного метаболізму губчастої речовини зазначених кісток.

Аналізуючи втрати елементів в досліджуваних кістках за умов важкого порушення водно-сольового обміну слід зазначити, що у тварин зрілого віку рівень втрати кальцію та фосфору не перевищують 8,85% ($p \leq 0,05$), що свідчить про стабільність кристалічної та аморфної фази фосфату кальцію в умовах гіпоосмолярної гіпергідратації. У тварин молодого віку рівень втрати остеогенних елементів досягає для фосфору 10,12% ($p \leq 0,05$), для кальцію – 12,43% ($p \leq 0,05$). Найбільші зміни відмічаються у тварин старечого віку, що пояснюється значним зростанням активності процесів резорбції та порушенням внутрішньої структури гідроксилапатиту з віком [6,7] (рис. 3).

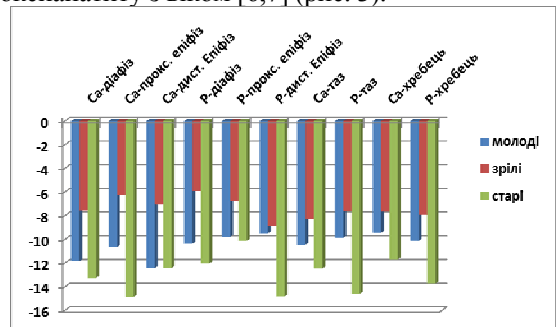


Рис. 3. Динаміка змін рівню кальцію та фосфору за результатами РЕММА кісток тварин різних вікових груп за умов дії гіпоосмолярної гіпергідрії важкого ступеню.

Максимальне зменшення досліджуваних елементів досягає 14,82% ($p \leq 0,05$). Слід зауважити, що мінімальна втрата кальцію та фосфору спостерігається в діяфізі плечової кістки, максимальна – в епіфізах плечової кістки, а також на поверхні трабекул кульшової кістки та поперекового хребця. Отримані дані можуть свідчити про більш високу метаболічну активність губчастої речовини.

В період реадптації відбувається посилення

втрати елементів в усіх кістках до 14-21 доби після закінчення моделювання гіпоосмолярної гіпергідрії (рис. 4). У щурів молодого та зрілого віку відбувається прискорене відновлення вмісту кальцію та фосфору в усіх досліджуваних ділянках, що свідчить про активацію процесів синтезу кісткової речовини з її мінералізацією. У щурів старечого віку також помітне зменшення різниці з контролем, проте навіть через 30 днів різниці з контролем є значною та досягає 16,62% ($p \leq 0,05$).

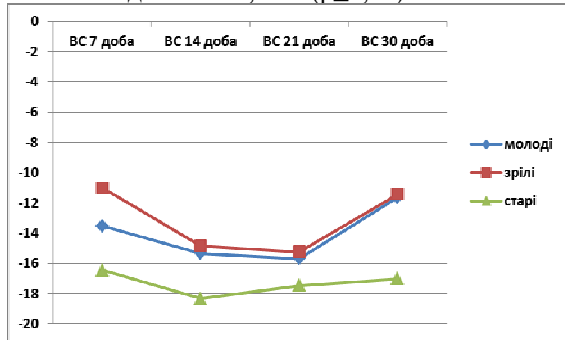


Рис. 4. Динаміка змін рівню кальцію та фосфору за результатами РЕММА в ділянці проксимального епіфізу плечової кістки тварин різних вікових груп в період реадптації.

Двохфакторний дисперсійний аналіз вмісту кальцію та фосфору на поверхні досліджуваних кісток показав переважний вплив чинника ступеню гіпергідрії без суттєвої різниці для плечової і кульшової кісток та III поперекового хребця (рис. 5). Так, сила впливу даного чинника на рівень кальцію складає 64,92% ($p \leq 0,05$), для фосфору – 54,11% ($p \leq 0,05$). Віковий чинник також має достовірний та значний вплив на рівень елементів, що описує вікові зміни мінералізації кісток. Відповідно сила впливу складає для кальцію 23,87% ($p \leq 0,05$), для фосфору – 35,87% ($p \leq 0,05$). На вміст

кальцію в досліджуваних кістках достовірний вплив має фактор взаємодії контрольованих чинників, сила впливу при цьому складає 9,54% ($p \leq 0,05$).

Висновки: Таким чином, гіпоосмолярна гіпергідрія легкого та середнього ступеню не призводить до розвитку структурних змін в кістках тварин молодого та зрілого віку. В той же час у щурів старечого віку мінімальні зміни спостерігаються вже за умов легкого ступеню порушень ВЕБ, значно зростаючи в умовах важкої гіпергідратації. Структурні зміни супроводжуються порушенням мінерального складу органу, що виявляється у втраті кальцію та фосфору на поверхні досліджуваних кісток. В період реадптації відновлення структури та елементного гомеостазу відбувається лише у тварин молодого та зрілого віку з 21 доби спостереження.

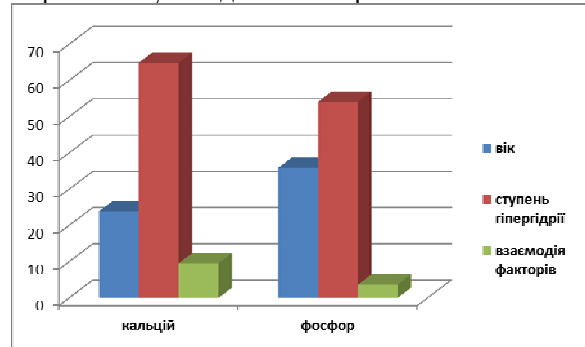


Рис. 5. Результати двофакторного дисперсійного аналізу впливу контрольованих факторів на вміст кальцію та фосфору в плечових кістках за результатами РЕММА.

Перспективи подальших досліджень. Планується вивчити можливість корекції виявлених змін помірними динамічними фізичними навантаженнями.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Применение метода растровой электронной микроскопии для изучения репаративной регенерации кости / В.З. Сикора, В.И. Бумейстер, М.В. Погорелов [та ін.] // XV Российский симпозиум по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел. - Москва, 2007. - С. 309-310.
2. Сучасні уявлення про водно – сольовий обмін / М.В. Погорелов, В.І. Бумейстер, Г.Ф. Ткач [та ін.] // Вісник проблем біології і медицини. - 2009. - №2. - С. 8-14.
3. Погорелов М.В. Биофизические методы исследования в функциональной оценке состояния костной ткани в норме и при патологии / М.В. Погорелов, Г.Ф. Ткач // Военная медицина. - 2010. - №4(17). - С. 103 – 109.
4. Макарова Н.В. Статистика в Excel / Н.В. Макарова, В.Я. Трофимец. - М.: Финансы и статистика, 2002. - 368 с.

Ткач Г.Ф., Погорелов М.В., Голобородько Л.В. Растрова електронна микроскопія кісток щурів, які знаходилися під впливом гіпоосмолярної гіпергідрії // Український медичний альманах. - 2011. - Том 14, № 6. - С. 206-208.

За допомогою растрової електронної микроскопії вивчені зміни структури та елементного гомеостазу кісток щурів різного віку в умовах гіпергідратаційних порушень водно-сольового обміну. Визначені вікові особливості, які полягають у низькій чутливості кісток тварин молодого та зрілого віку в умовах порушень водно-сольового балансу. Визначений ступень впливу різних чинників на зміни елементного складу досліджуваних кісток.

Ключові слова: гіпергідратація, кістки скелету, РЕММА, кальцій, фосфор.

Ткач Г.Ф., Погорелов М.В., Голобородько Л.В. Растровая электронная микроскопия костей крыс, которые находились под влиянием гипосмолярной гипергидрии // Український медичний альманах. - 2011. - Том 14, № 6. - С. 206-208.

При помощи растровой электронной микроскопии изучены изменения структуры и элементного гомеостазу костей крыс разного возраста в условиях гипергидратационных нарушений водно-солевого баланса. Определены возрастные особенности, которые выражаются в более низкой чувствительности костей животных молодого и зрелого возраста в условиях нарушений водно-солевого баланса. Определен степень влияния разных факторов на изменения элементного состава исследуемых костей.

Ключевые слова: гипергидратация, кости скелета, РЕММА, кальций, фосфор.

Tkach G.F., Pogorelov M.V., Goloborodko L.V. Scanning electron microscopy of rat's bones in hypoosmolarity overhydration // Український медичний альманах. - 2011. - Том 14, № 6. - С. 206-208.

With the help of scanning electron microscopy we studied changes in the structure and elemental homeostasis of bones of rats of different ages in violations of water-salt disbalance. Defined age-specific features, which are expressed in a lower sensitivity of animal bones and young adulthood in terms of violations of water-salt balance. The degree of influence of various factors on changes in the composition of the investigated elementnog bones.

Key words: hyperhydration, the bones of the skeleton, REMMA, calcium and phosphorus.

Надійшла 11.09.2011 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін