

## В.А. Пастухова, Е.Н. Скрябина МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОСТЕЙ СКЕЛЕТА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОГО ИНСУЛИНА

*Национальний університет фізического виховання і спорту України, ГЗ "Луганський державний медичний університет"*

**Пастухова В.А., Скрябина Е.Н.** Морфофункциональные особенности костей скелета крыс под влиянием экзогенного инсулина // Украинський морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 4. – С. 64-67.

Цель настоящего научного исследования изучить особенности роста и гистологическое строение длинных трубчатых костей под влиянием экзогенного инсулина. Объектом исследования послужили 96 белых крыс, которые получали инсулин в дозе 3 ЕД/кг в день. Через 7, 14, 30 и 60 дней животных декапитировали под эфирным наркозом. Проводили остеометрию и гистоморфометрию большеберцовых костей. Длительное введение инсулина сопровождалось небольшим ускорением поперечного и замедлением продольного роста, общая ширина эпифизарного хряща большеберцовой кости уменьшалась. В диафизе выявлено увеличение диаметра остеонов и их каналов.

**Ключевые слова:** крысы, инсулин, скелет, рост, строение.

**Пастухова В.А., Скрябина О.М.** Морфофункціональні особливості кісток скелета щурів під впливом екзогенного інсуліну // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 4. – С. 64-67.

Мета цього наукового дослідження - вивчити особливості росту і гістологічну будову довгих трубчастих кісток під впливом екзогенного інсуліну. Об'єктом дослідження послужили 96 білих статевозрілих щурів, які отримували інсулін в дозі 3 ОД / кг в день. Через 7, 14, 30 і 60 днів тварин декапітували під ефірним наркозом. Проводили остеометрію і гістоморфометрію великогомілкової кістки. Тривале введення інсуліну супроводжувалося невеликим прискоренням поперечного та уповільненням подовжного росту, загальна ширина епіфізарного хряща великогомілкової кістки зменшувалася. У діафізі виявлено збільшення діаметра остеонів і їх каналів.

**Ключові слова:** щури, інсулін, скелет, ріст, будова.

**Pastukhova V.A., Skryabina E.N.** Morphological and functional features of the skeletal bones of rats under the influence of exogenous insulin // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 4. – С. 64-67.

The purpose of this research to study the characteristics of growth and histological structure of the long bones under the influence of exogenous insulin. The object of the study were 96 white adult rats who received insulin in a dose of 3 U / kg per day. After 7, 14, 30 and 60 days, the animals were decapitated under ether narcosis. Conducted osteometry and histomorphometry tibia. Prolonged administration of insulin accompanied by a slight acceleration and deceleration of the longitudinal cross-growth, the total width of epiphyseal cartilage of the tibia decreased. In the diaphysis revealed an increase in the diameter of the osteon and their channels.

**Key words:** rat, insulin, skeleton, growth, structure.

Среди фундаментальных проблем современной анатомии наиболее актуальной на сегодняшний день является изучение закономерностей изменения костной системы в условиях воздействия на организм экзо- и эндогенных факторов. Механизм действия инсулина как представителя пептидных гормонов заключается в опосредованной связи с циклическими нуклеотидами. Меняя характеристики плазматической мембраны клеток, инсулин обеспечивает транспорт глюкозы и аминокислот в клетки, и тем самым модулирует активность нейрогормонального ответа. Кроме того, инсулин ингибирует аденилатциклазу и понижает внутриклеточный цАМФ. По данным Алексева Ю.П. (1975) существует и другой "второй вестник", отличающийся от цАМФ, включающий в клетках анаболические реакции. На сегодняшний день известно, что регуляция взаимодействия гормонов в организме проходит с участием цАМФ, влияя на биосинтез которого, инсулин усиливает или ослабляет действие гормонов на клетки [6, 8].

В литературе имеются сведения о влиянии инсулина на морфогенез костей скелета [2, 4]. Однако они неоднозначны, часто противоречивы и освещают, в основном, ранний этап он-

тогенеза. Поэтому целью представленной работы было исследование процессов роста под влиянием экзогенного инсулина на более поздних стадиях онтогенеза.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводился на 96 белых крысах-самцах двух возрастов: неполовозрелого – массой 50-60г. и половозрелого – исходной массой 200-230г. Животные были распределены на 2 группы. Животным первой (контрольной) группы вводили подкожно дистиллированную воду в дозе равной объему вводимого инсулина. Вторую (экспериментальную) группу составили животные, которым подкожно вводили инсулин в дозе 3 ЕД/кг в сутки [3]. Животные содержались в стандартных условиях вивария.

Выведение крыс из эксперимента проводилось на 7,14,30 и 60 сутки декапитацией под эфирным наркозом. Тушки скелетировали с выделением большеберцовых костей. Остеометрию проводили по методике W.Duerest (1926). При помощи штангенциркуля измеряли с точностью до 0,1 мм следующие остеометрические показатели: наибольшая длина, наибольшая ширина диафиза, передне-задний размер середины диафиза, наибольшая ширина проксимального и дистального эпифизов.

Проводили также гистологическое исследо-

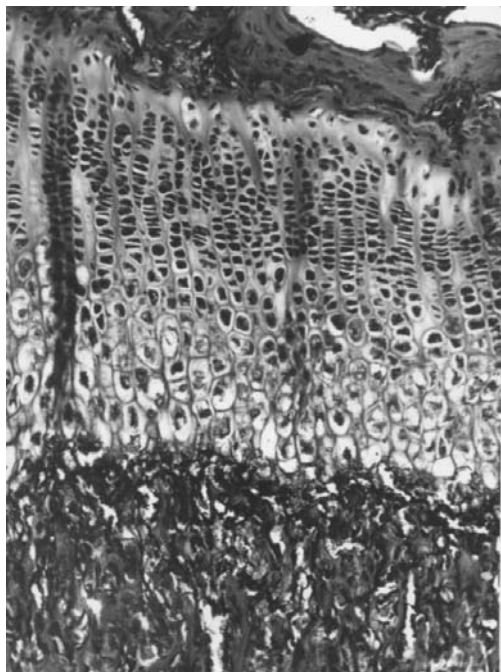
вание проксимальных эпифизов и середины диафизов большеберцовых костей. При гистологическом исследовании кости фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, декальцировали в 5% растворе муравьиной кислоты, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле, заливали парафином или целлоидином.

Готовили срезы толщиной 8-10 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином. Морфологическое исследование диафиза и проксимального эпифиза большеберцовых костей проводили с помощью винтового микрометра МОВ-1-15xГОСТ 7865-56 и окулярной измерительной сетки.

Морфометрию зон эпифизарного хряща проводили по следующим параметрам: общая ширина эпифизарного хряща, ширина индифферентной, пролиферативной и дефинитивной зон эпифизарного хряща (классификация зон эпифизарного хряща по В.Г.Ковешникову, 1980).

При помощи 100-точечной окулярной измерительной сетки определяли соотношение клеточных элементов и межклеточного вещества эпифизарного хряща, объемную долю спонгиозы в зоне первичного остеогенеза. На препаратах диафиза измеряли ширину внутренних и наружных генеральных пластинок, ширину остеонного слоя, площадь поперечного сечения диафиза, площадь сечений костномозгового канала и компактного вещества, а также диаметр остеонов и их каналов.

Полученные данные обрабатывались статистически на персональном компьютере типа IBM PC с использованием критерия Стьюдента.



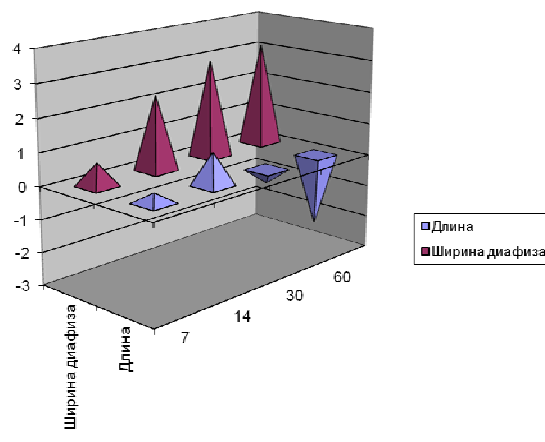
**Рис.1.** Проксимальный эпифизарный хрящ большеберцовой кости крыс неполовозрелого возраста подопытной группы. Срок – 7 дней. Увеличение 100х. Окраска препаратов гематоксилин-эозином.

**Результаты и их обсуждение.** Источником продольного роста длинных трубчатых костей является эпифизарный хрящ. Изменения его структуры в течение эксперимента были неоднозначны. Так, к 7 дню исследования отмечается расширение общей ширины эпифизарного хряща до  $651,06 \pm 17,3$  мкм, преимущественно за счет пролиферативной и дефинитивной его зон (рис. 1). Увеличение количества остеоцитов и доли первичной спонгиозы в зоне остеогенеза свидетельствуют о повышенной интенсивности костеобразовательных процессов.

Такие изменения структуры эпифизарного хряща можно объяснить анаболическим эффектом инсулина [11]. Данные, полученные нами в результате эксперимента не согласуются с исследованиями Ч.Чадхази и Н.В.Дедух (1988) о том, что инсулин замедляет образование хрящевой ткани.

Выявленные противоречия можно объяснить различными эффектами экзогенного и эндогенного инсулина, так как в соответствии с наличием механизма отрицательной обратной связи экзогенный инсулин угнетает выработку собственного инсулина и приводит к перестройке островкового аппарата поджелудочной железы [7].

Следовательно, дальнейшее сужение эпифизарного хряща становится закономерным, хотя абсолютное значение ее величины и остается немногим больше контрольных значений.



**Рис. 2.** Остеометрия большеберцовой кости неполовозрелых крыс подопытной группы.

В неполовозрелом возрасте длительность введения инсулина приводит к замедлению темпов прироста продольных размеров большеберцовых костей на 3,2% по сравнению с контролем. Наиболее закономерно менялась интенсивность роста костей в ширину, достигая максимальных значений к концу эксперимента. Так, прирост поперечных размеров для большеберцовой кости составил 5,45% по сравнению с контрольными значениями (рис. 2). Замедление прироста длины костей, уменьшение количества хондроцитов в столбике пролиферирующего хряща, а также уменьшение доли первичной спонгиозы, свидетельствуют о снижении скоро-

сти созревания хряща, уменьшении пролиферативной активности и как следствие этого нарушается процесс образования органического матрикса.

Такие изменения также связаны с тем, что повторные гипогликемии приводят к мобилизации продукции контринсулярных факторов (адреналин, кортикоиды), повышающих потребность организма в инсулине [10].

В течение эксперимента происходит некоторое утолщение середины диафиза большеберцовых костей, достигающее максимальных величин к 60 дню исследования (рис. 2). Наряду с этим достоверное расширение диаметра остеона наблюдалось к 30 дню эксперимента. К этому же сроку исследования отмечается увеличение площади диафиза на 2,59% по сравнению с контролем за счет расширения костномозгового канала (рис. 3).



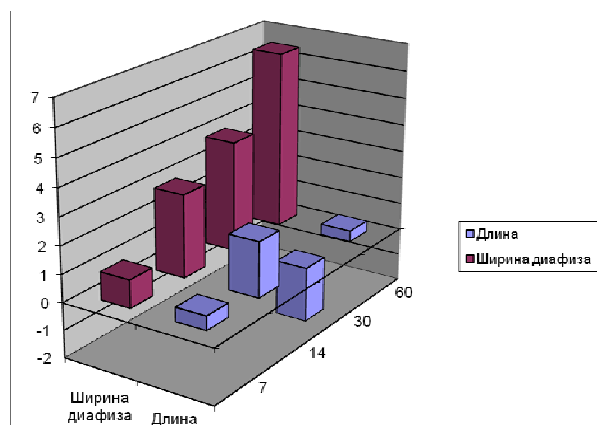
**Рис. 3.** Диафиз большеберцовой кости крыс неполовозрелого возраста подопытной группы. Срок – 30 дней. Увеличение 100х. Окраска препаратов гематоксилин-эозином.

Выявленные процессы свидетельствуют о непродуктивной активации поднадкостничного роста и могут быть результатом компенсаторных процессов, направленных на стабилизацию обменных процессов в исследуемых костях.

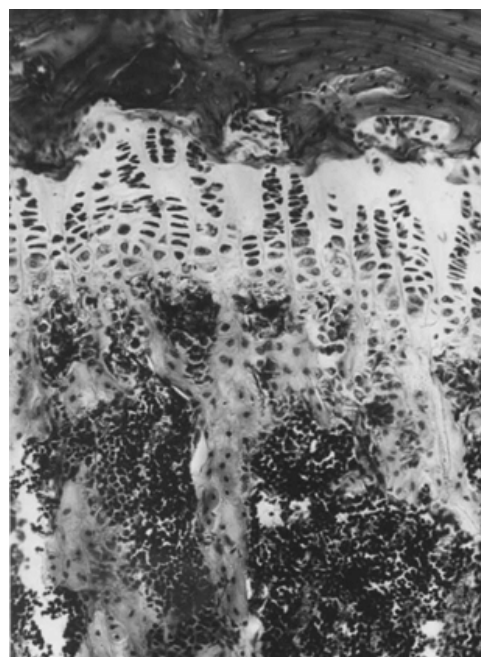
Следующую серию подопытной группы животных составили крысы репродуктивного возраста. Гиперинсулинемия выявленная в начальные сроки эксперимента способствует увеличению продольных размеров большеберцовых костей (на 1,54%) по сравнению с контролем (рис. 4). При этом отмечается расширение эпифизарного хряща [11], достигающее максимальных значений к 14 дню эксперимента.

В дальнейшем инсулиновая интоксикация

[7], а также изменение регуляторной деятельности инсулина, направленное в сторону катаболических реакций по механизму отрицательной обратной связи (10) приводят к замедлению и уменьшению темпов прироста продольных размеров костей. Так, на 30 день эксперимента длина большеберцовой кости была меньше контрольных величин на 1,92%. Выявленные изменения остеометрических характеристик костей подопытной группы крыс закономерно отразились на их гистологической структуре.



**Рис. 4.** Остеометрия большеберцовой кости половозрелых крыс подопытной группы.



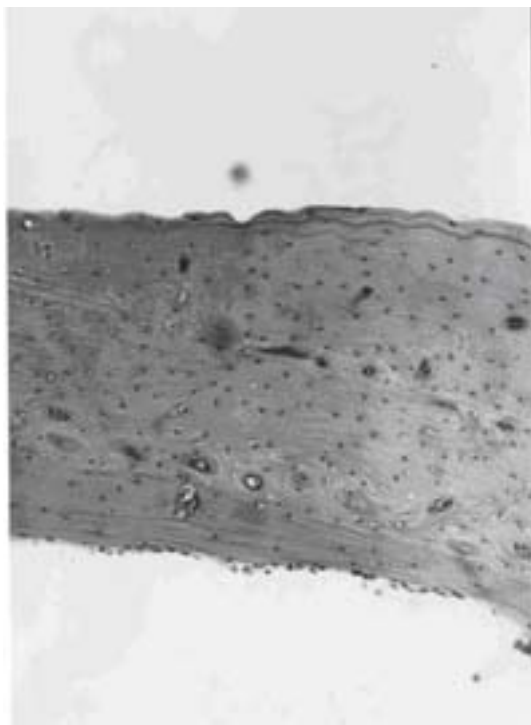
**Рис. 5.** Проксимальный эпифизарный хрящ большеберцовой кости крыс половозрелого возраста подопытной группы. Срок – 30 дней. Увеличение 100х. Окраска препаратов гематоксилин-эозином.

Так, к концу 30-х суток введения инсулина ширина эпифизарного хряща сузилась до  $167,31 \pm 8,16$  мкм, что составляет 16,1% от контрольных значений. Это сужение произошло за счет уменьшения пролиферативной и дефинитивной зон (рис. 5). Наряду с общим сужением эпифизарного хряща происходит уменьшение

процентного содержания клеток в зоне пролиферирующих хондроцитов, а также доли первичной спонгиозы.

Изменения поперечных размеров исследуемых костей носили более выраженный характер. В течение всего эксперимента наблюдалось увеличение прироста поперечных размеров костей. Так, к концу эксперимента ширина большеберцовой кости превышает контрольные показатели на 5,26% (рис.6). Увеличение темпов прироста поперечных размеров костей у подопытных животных репродуктивного возраста вероятно связан с активацией поднадкостничного роста.

Наряду с этим гистоморфометрическое исследование диафиза большеберцовых костей выявило сужение диаметра остеонов (рис.6). При этом, начиная с 14 дня исследования, увеличение площади поперечного сечения диафиза по сравнению с контролем сопровождается увеличением площади сечения костномозгового канала и сужением остеонного слоя. Возможно, это связано с тем, что повышенная продукция гормона роста вызванная инсулиновой гипогликемией во взрослом организме вызывает не столько увеличение роста костей в длину, сколько их утолщение и деформацию [12].



**Рис. 6.** Диафиз большеберцовой кости крыс половозрелого возраста подопытной группы. Срок – 30 дней. Увеличение 100х. Окраска препаратов гематоксилин-эозином.

#### **Выводы:**

1. В первую неделю введения крысам инсулина наблюдается повышенная пролиферативная активность эпифизарного хряща в большеберцовых костях, а также ускорение темпов их продольного и поперечного роста.

2. Длительное введение инсулина живот-

ным приводит к снижению пролиферативной активности эпифизарного хряща в большеберцовых костях. Вместе с тем замедляются темпы продольного роста большеберцовых костей при сохранении повышенной активности прироста поперечных размеров.

3. Степень выявленных изменений зависит от возраста животных и продолжительности эксперимента.

### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:**

1. Алексеев Ю.П. Иммуные свойства инсулина / Ю.П. Алексеев // Проблемы эндокринологии. - 1975. - №4. - С.102-115.
2. Дедух Н.В. Структурно-функциональная организация тканей опорно-двигательной системы / Н.В. Дедух // Ортопед. травматол. - 1994. - №4. - С.89-90.
3. Лабораторные животные / В.И. Западнюк, И.П. Западнюк, Е.А. Захария. - Киев: Вища школа, 1983. - 383 с.
4. Кистаури А.К. Костная патология у больных сахарным диабетом / А.К. Кистаури // Сов. медицина. - 1982. - №2. - С. 32-35.
5. Ковешников В.Г. Зональное строение эпифизарного хряща / В.Г. Ковешников // Антропология, антропология и спорт. - Винница. - 1980. - Т.2. - С. 251-252.
6. Кулемина Л.Ю. Особенности роста, формирования костей скелета под влиянием экзогенных простогландинов и ингибиторов их эндогенного синтеза / Л.Ю. Кулемина. - Автореф. дис. канд. мед. наук. - Ленинград. - 1989. - 18с.
7. Михайленко М.А. К вопросу о влиянии различных доз инсулина на живой организм / М.А. Михайленко. - Автореф. дис. канд. мед. наук. - Смоленск, 1966. - 18 с.
8. Федоров Н.А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов / Н.А. Федоров. - М.: Медицина, 1979. - 184 с.
9. Чадхази Ч. Влияние инсулина на дифференцировку хряща *in vitro* / Ч. Чадхази, Н.В. Дедух // Бюллетень экспериментальной биол. и мед. - 1988. - №2. - С. 219-221.
10. Шрейбер В. Патопфизиология желез внутренней секреции / В. Шрейбер. - Прага: Авиценум, 1987. - 493 с.
11. Barret-Cannor E. Does hyperinsulinemia preserve bone? / E. Barret-Cannor, P. Kritz-Silverstein // Diabetes Care. - 1996. - V. 19, № 12. - P. 1388-1392.
12. Insulinlike growth factor-binding protein-1 expression in cultured human bone cell: regulation by insulin and glucocorticoid/ Conover C.A., Lee P.P., Riggs B.L., Powell P.R.// Endocrinology. - 1996. - V. 137. - №8. - P. 32-95.

Надійшла 11.09.2013 р.

Рецензент: проф. В.М. Волошин