

© Мальцева В. Є.

УДК 576.31:591.471.322:546.815/.819

**Мальцева В. Є.**

## **ВПЛИВ СВИНЦЮ НА КЛІТИНИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ТІЛ ХРЕБЦІВ ЩУРІВ НА ФОНІ ОСТЕОПОРОЗУ**

**ДУ «Інститут патології хребта та суглобів**

**ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (м. Харків)**

**anemona11@gmail.com**

Робота є фрагментом НДР «Вивчити ремоделювання кісткової тканини тіл хребців та структурну організацію міжхребцевих дисків в умовах остеопорозу, обтяженого дією несприятливих екологічних чинників», 2014-2016 рр., ЦФ 2014.1. НАМНУ, № державної реєстрації 0114U003015.

**Вступ.** Свинець є найбільш розповсюдженим важким металом, що впливає на здоров'я населення України. У 2015 році Україна увійшла в десятку країн з найбільш забрудненим повітрям у світі, одним із забрудників є свинець [5]. Про шкідливий вплив свинцю на здоров'я людини відомо досить давно, але на теперішній час постає проблема впливу невеликих концентрацій свинцю на організм, зокрема його дія на фоні остеопорозу [6,8].

Свинець накопичується в кістковій тканині протягом всього життя та вивільняється у кров під час процесу резорбції кістки. На фоні остеопорозу активність процесу резорбції може посилюватися, що призводить до можливості впливу свинцю на кісткову тканину не тільки безпосередньо перебуваючи в її структурі, але й на мезенхімальні клітини, що слугують попередниками остеобластів, клітин, які формують кісткову тканину. Таким чином, вивчення дії свинцю на кісткову тканину тіл хребців є актуальною.

**Мета дослідження** — встановити особливості впливу свинцю на клітини кісткової тканини тіл хребців поперекового відділу хребта щурів на фоні остеопорозу.

### **Об'єкт і методи дослідження**

Моделювання впливу свинцю. В експерименті вивчено вплив свинцю на організм щурів з модельованим остеопорозом, що відповідає дії цього елемента на людей, які проживають в урбанізованому середовищі на основі моделі розробленої J. J. Carmouche з співавторами [7]. Дослідження виконано на 40 білих лабораторних щурах. У щурів віком 6 міс. моделювали остеопороз шляхом проведення оваріоектомії [9]. Через 4 міс. після проведення оваріоектомії тварин розділили на дві групи: щури дослідної групи протягом 10 тижнів отримували розчин ацетату свинцю (230 мг свинцю на 1 л дистильованої води) як питну воду, а контрольної – дистильовану воду. Щурів віком 12,5 міс. після закінчення експерименту з впливу свинцю виводили з дослідження шляхом декапітації під ефірним наркозом. Для проведення подальших досліджень виділяли фрагменти поперекового відділу хребта L<sub>1</sub>-L<sub>IV</sub>. Виконання експериментального дослідження затверджено комітетом з біоетики ДУ «Інституту

патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (протокол № 127 від 24.02.2014 р.) згідно з Європейськими законодавчими нормами та законом України [1,2].

Гістологічний аналіз. Виділені фрагменти хребта щурів фіксували в 10% формаліні, декальцинували в 10% мурашиній кислоті, зневоднювали в серії спиртів і хлороформі, просочували, заливали в парафін і виготовляли зрізи. Фарбували зрізи гематоксиліном та еозином [3]. Під час морфометричного аналізу компактної та губчастої кісткової тканини тіл хребців вимірювали щільність остеоцитів та відносну кількість остеоцитів з розширеними лакунами. Вимірювання проводили на 3 зрізах в 5 полях зору зі збільшенням 200 під мікроскопом Olympus BX-63.

Для електронно-мікроскопічного аналізу фрагменти (1 мм<sup>3</sup>) тіл хребців префіксували в 5% фіксаторі Карновського, декальцинували в 3,7% розчині трилону Б, додатково фіксували в 1% розчині чотириокису осмію (OsO<sub>4</sub>), зневоднювали в розчинах етилового спирту зростаючої міцності і в ацетоні, заключали у суміш епоксидних смол епона та аралдита. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю і уранілацетатом за методом Е. Рейнольдса та аналізували в трансмісійному електронному мікроскопі ЕМВ-100БР [4].

Статистичний аналіз отриманих даних виконаний з використанням програм «IBM SPSS Statistics 20» і «Microsoft Office Excel 2003». Для кожного з показників у досліджуваних групах визначали середню арифметичну величини (M) і помилку середнього (m). Для порівняння середніх значень використовували t-критерій Стьюдента. При цьому розраховували досягнутий рівень значущості (P), критичним вважали його значення 0,05.

### **Результати досліджень та їх обговорення.**

Електронно-мікроскопічний аналіз губчастої кісткової тканини контрольної групи тварин показав, що на поверхні трабекул зустрічалися остеобласти, але великі ділянки на їх поверхні були без клітин або вкриті неактивними остеобластами, що мали сплюснену форму та округле еухромне ядро. Остеобласти мали видовжену форму та гетерохромне ядро з чітко контурованою двохшаровою мембраною. В цитоплазмі таких клітин виявляли гранулярну ендоплазматичну сітку (гЕПС) з великою кількістю цистерн, деякі з них були розширені та заповнені продуктами біосинтезу (**рис. 1 а**). гЕПС займала велику частину площі цитоплазми, що свідчить про

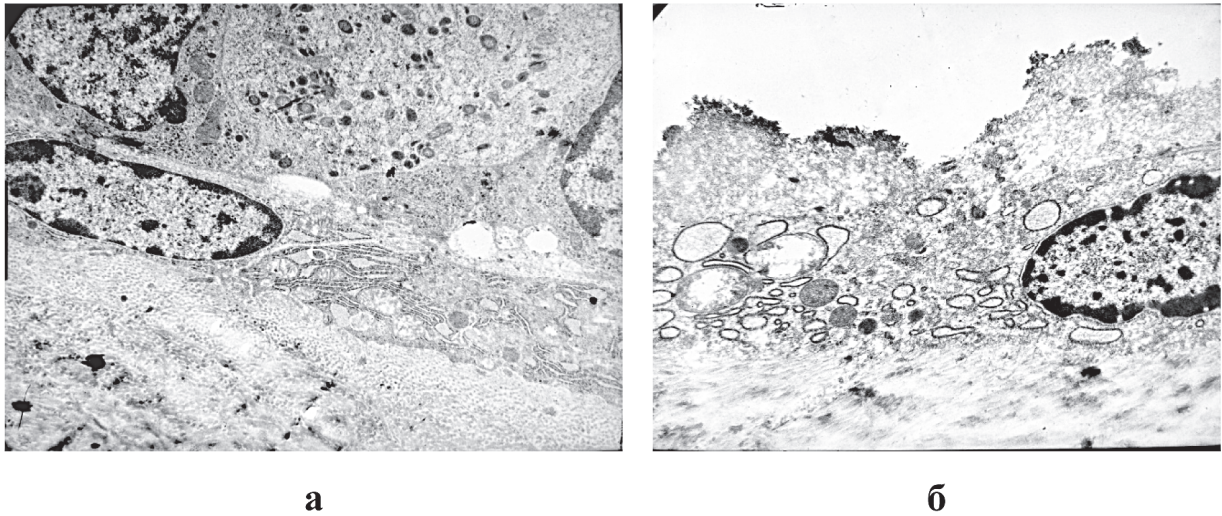


Рис. 1. Остеобласти щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп на поверхні кісткових трабекул. Зб. 6000. Контрастування за Рейнольдсом.

активний біосинтез остеобластами білків кісткової тканини.

На ділянках, в цитоплазмі таких клітин розташовувалися безструктурні зони. Поблизу безструктурних зон траплялись вторинні лізосоми, всередині яких визначалися фрагменти неперетравлених органел клітини. Це може свідчити про очищення ними цитоплазми від пошкоджених компонентів, також на це вказувала наявність у деяких клітин поодиноких залишкових тілець, які є результатом неперетравлених лізосомою продуктів або пошкоджених компонентів клітини. Також в остеобластах виявляли велику кількість мітохондрій, деякі з яких були набухлі.

Остеокласти на поверхні трабекул траплялися зрідка, мали 3-5 гетерохромних ядер та велику

кількість вакуолей. Зустрічалися попередники остеокластів, які мали 2-3 ядра та не були прикріплені до поверхні трабекул, а розташовувалися поблизу.

Остеоцити розташовувалися в лакунах, що мали контури, на ділянках зубчасті, що може вказувати на процес остеоцитарного остеолізу. Остеоцити мали велике гетерохромне ядро, цитоплазму з невеликою кількістю органел (поодинокі профілі ГПС, мітохондрії та вакуолі). Траплялися остеоцити з мітохондріями зі зруйнованими кристами.

Аналіз компактною кістковою тканиною контрольної групи показав наявність остеоцитів розташованих у різних за формами лакунах (рис. 2 а). У деяких клітин контури лакун були зубчасті. У цитоплазмі зустрічалися великі за розмірами мітохондрії, іноді зі зруйнованими кристами та нечіткими контурами мембран.

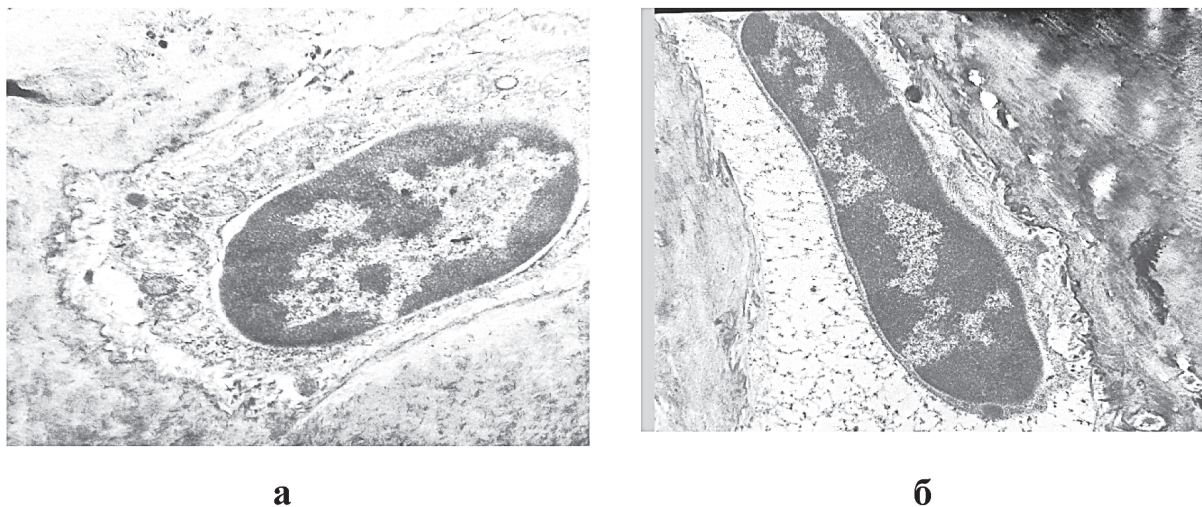


Рис. 2. Остеоцити щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп на поверхні кісткових трабекул. Компактна кісткова тканина. Зб.: а) 10000; б) 8000. Контрастування за Рейнольдсом.

Також зустрічалися вторинні лізосоми. В переважній більшості клітин у цитоплазмі переважали мікротрубочки та мікрофіламенти, що може свідчити про зниження функціональної активності остеоцитів. Матрикс мав однорідну будову з розташованими поодинокими каналцями відростків остеоцитів.

Під час аналізу губчастої кісткової тканини у дослідній групі тварин траплялися поодинокі остеобласти, що мали видовжену форму та розміщувалися на поверхні кісткових трабекул. Такі клітини мали в цитоплазмі велику кількість різних за розмірами розширених цистерн гЕПС з чітко контурованими рибосомами на поверхні. Однак, клітинна мембрана цих клітин не мала чітких контурів, а на ділянках була зовсім відсутня, що вказує на загибель остеобластів (рис. 1 б).

Крім того, в цитоплазмі зустрічалися збільшені у розмірах мітохондрії зі зруйнованими кристами. Також спостерігали велику кількість різних за розмірами електронно-щільних вторинних лізосом. Деякі з остеобластів мали зруйновану плазматичну мембрану, у таких клітин спостерігали виражений набряк мітохондрій та поодинокі каналці гЕПС. Також зустрічалися остеобласти з цитоплазмою, в якій переважали мікротрубочки та мікрофіламенти поряд з поодинокими невеликими вторинними лізосомами, що не характерно для цитоплазми такої функціонально-активної клітини як остеобласт. Ядра остеобластів мали зруйновану на ділянках двоконтурну мембрану. Спостерігалися остеобласти з ознаками некрозу або деструктуровані клітини.

Остеокласти за структурною організацією не відрізнялися від клітин контрольної групи тварин.

Остеоцити в губчастій кістковій тканині дослідної групитваринмалигетерохромніядра, розміщувалися у лакунах з зубчастими краями. Цитоплазма таких клітин була представлена в переважній більшості мікротрубочками та мікрофіламентами, що свідчить про низьку функціональну активність клітини. Також траплявся детрит в лакунах.

У компактній кістковій тканині дослідних щурів остеоцити з гетерохромними ядрами були розташовані в лакунах з контурами, що нагадували голки, настільки вони зазнали дії резорбції (рис. 2 б). Крім того зустрічалися лакуни значно розширені за розмірами відносно розмірів остеоцитів, що може бути результатом активного процесу остеоцитарного остеолізису. Цитоплазма остеоцитів була бідною на органели та у більшості клітин переважали компоненти цитоскелету, іноді зустрічалися великі вторинні лізосоми. Траплялися лакуни з голкоподібними контурами, які містили детрит. Крім того, у матриксі компактної кістки зустрічалися

Щільність остеоцитів кісткової тканини тіл хребців щурів

Параметри	Контрольна група	Дослідна група
<b>Губчаста кісткова тканина</b>		
Щільність остеоцитів (у мм <sup>2</sup> )	1235,32 ± 47,37	1026,57 ± 49,62*
Розширені лакуни (%)	16,73 ± 1,03	20,50 ± 2,32
<b>Компактна кісткова тканина</b>		
Щільність остеоцитів (у мм <sup>2</sup> )	1169,01 ± 50,75	928,11 ± 70,66*
Розширені лакуни (%)	16,53 ± 2,66	32,89 ± 4,72*

\*Примітка. P < 0,05; порівняння з контрольною групою.

великі за розмірами порожнини з безструктурними компонентами, що нагадували детрит та мали контури схожі на контури лакун остеоцитів, що зазнали дії остеоцитарного остеолізису. Це може бути результатом резорбційної дії остеокластів, що є реакцією на загибель остеоцитів. Матрикс мав неоднорідну будову, часто траплялися електронно-щільні ділянки.

Вимірювання щільності остеоцитів у губчастій кістковій тканині щурів після дії свинцю виявило зниження цього показника на 16,9%, а у компактній кістковій тканині – на 20,6% порівняно з контрольною групою (табл.). Аналіз відносної кількості розширених лакун остеоцитів у компактній кістковій тканині показав підвищення їх чисельності в 1,98 рази порівняно з контролем, тоді як у губчастій кістці різниці не виявлено.

Гістологічний аналіз підтвердив негативні зміни, що відбуваються в клітинах кісткової тканини тіл хребців після дії свинцю на фоні остеопорозу. А саме, деградація мембранних органел остеобластів, що призводить до загибелі клітин у губчастій кістковій тканині, розширення лакун остеоцитів в компактній кістковій тканині, внаслідок остеолітичної активності цих клітин. Також відмічено загибель остеоцитів у компактній та губчастій кістковій тканині, що викликає порушення цілісності кісткового матриксу.

**Висновки**

1) У компактній кістковій тканині тіл хребців щурів після дії свинцю на фоні остеопорозу виявлено зниження щільності остеоцитів на 20,6% та підвищення відносної кількості розширених лакун в 1,98 рази внаслідок руйнування мембранних органел та некрозу клітин, а також остеоцитарного остеолізису.

2) Встановлено, що дія свинцю на губчасту кісткову тканину тіл хребців щурів викликає достовірне зниження щільності остеоцитів на 16,9% внаслідок деградації мембранних органел, та загибель остеобластів у стані різної функціональної активності.

3) Остеоцити компактної кісткової тканини тіл хребців щурів більш чутливі до дії свинцю, ніж у губчастій кістковій тканині.

**Перспективи подальших досліджень.** міжхребцевих дисків щурів після впливу свинцю на фоні остеопорозу.  
Планується виконання поляризаційно-оптичних досліджень кісткової тканини тіл хребців і

### Література

1. Европейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137).
2. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. / Верховна Рада України. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>.
3. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.
4. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. – М.: Мир, 1975. – 324 с.
5. Украина и ТОП-10 самых загрязненных стран мира. – 2015. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://znaj.ua/ru/news/world/34132/ukrayina-v-top10-najbilsh-zabrudnenih-krayin.html>.
6. Chronic lead poisoning magnifies bone detrimental effects in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis / C.M. Lee, A.R. Terrizzi, C. Bozzini [et al.] // *Exp Toxicol Pathol.* – 2016. – Vol. 68, № 1. – P. 47-53.
7. Lead exposure inhibits fracture healing and is associated with increased chondrogenesis, delay in cartilage mineralization, and a decrease in osteoprogenitor frequency / J.J. Carmouche, J.E. Puzas, X. Zhang [et al.] // *Environ. Health Perspect.* – 2005. – Vol. 113, № 6. – P. 749-755.
8. The influence of lead on the biomechanical properties of bone tissue in rats / G. Olchowik, J. Widomska, M. Tomaszewski [et al.] // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* – 2014. – Vol. 21, № 2. – P. 278-281.
9. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research / P.P. Lelovas, T.T. Xanthos, S.E. Thoma [et al.] // *Comparative medicine.* – 2008. – Vol. 58, № 4. – P. 424-430.

УДК 576.31:591.471.322:546.815/.819

#### **ВПЛИВ СВИНЦЮ НА КЛІТИНИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ТІЛ ХРЕБЦІВ ЩУРІВ НА ФОНІ ОСТЕОПОРОЗУ** **Мальцева В. Є.**

**Резюме.** В експериментальному дослідженні вивчено вплив свинцю на клітини компактної і губчастої кісткової тканини тіл хребців щурів на фоні остеопорозу з використанням методів світлової та електронної мікроскопії. Виявлено, що в компактній кістковій тканині вплив свинцю призводить до зниження щільності остеоцитів на 20,6% і підвищення кількості розширених лакун в 1,98 рази, внаслідок руйнування мембранних органел і некрозу клітин, а також остеоцитарного остеоліза. Встановлено, що в губчастій кістковій тканині щурів свинець викликає зниження щільності остеоцитів на 16,9%, в результаті деградації мембранних органел, і загибель остеобластів в стані різної функціональної активності.

**Ключові слова:** щур, свинець, кісткова тканина, хребет, остеоцит, остеобласт.

УДК 576.31:591.471.322:546.815/.819

#### **ВОЗДЕЙСТВИЕ СВИНЦА НА КЛЕТКИ КОСТНОЙ ТКАНИ ТЕЛ ПОЗВОНКОВ КРЫС НА ФОНЕ ОСТЕОПОРОЗА**

**Мальцева В. Е.**

**Резюме.** В экспериментальном исследовании изучено влияние свинца на клетки компактной и губчатой костной ткани тел позвонков крыс на фоне остеопороза с использованием методов световой и электронной микроскопии. Обнаружено, что в компактной костной ткани воздействие свинца приводит к снижению плотности остеоцитов на 20,6% и повышению относительного количества расширенных лакун в 1,98 раза, вследствие разрушения мембранных органелл и некроза клеток, а также остеоцитарного остеоліза. Установлено, что в губчатой костной ткани крыс свинец вызывает снижение плотности остеоцитов на 16,9%, в результате деградации мембранных органелл, и гибель остеобластов в состоянии различной функциональной активности.

**Ключевые слова:** крыса, свинец, костная ткань, позвоночник, остеоцит, остеобласт.

UDC 576.31:591.471.322:546.815/.819

#### **THE EFFECT OF LEAD ON BONE CELLS OF VERTEBRAE IN RATS WITH OSTEOPOROSIS**

**Maltseva V. E.**

**Abstract.** Lead is the most widely distributed heavy metal which has effects on the health of the population of Ukraine. At present there is a problem of influence of low concentrations of lead on the human organism, particularly at osteoporosis.

The aim of the study was to determine the features of lead exposure on the cells of the bone tissue of the vertebral bodies of the lumbar spine of rats with osteoporosis.

Object and methods. The study was performed on 40 white laboratory rats. In the experiment was investigated the lead exposure in rats, which corresponding to effect of this element on the people living in the urban environment. The modeling of osteoporosis was performed by ovariectomy. After 4 months rats were divided into 2 groups: the experimental group received lead acetate solution (230 ppm in distilled water) with drinking water, and the control group – distilled water for 10 weeks. Rats aged 12.5 months were removed from the experiment by decapitation

and fragments of lumbar spine LI-LIV were analyzed by light and electron transmission microscopy. The statistic method: unpaired Student's t-test.

*Results.* In the cancellous bone in the experimental group were found isolated osteoblasts that had elongated form and were located on the trabecular surface. Many cisternae of rough endoplasmic reticulum were found in cytoplasm of such cells. Cisternae had of different sizes and were extended. However, the plasma membrane of these cells didn't have clear contours, and at the sites it was completely absent, that indicating the death of osteoblasts. Also in the cytoplasm met increased in size mitochondria with damaged cristae. It was observed a large number of different-sized electron-dense secondary lysosomes. Some of osteoblasts had the damage of plasma membrane. Also were found of osteoblasts with cytoplasm where microtubules and microfilaments were dominated. The structural organization of osteoclasts did not differ from the cells of the control group. Osteocytes in cancellous bone had heterochromatic nucleus and were located in the lacunae with jagged edges. The cytoplasm of these cells was presented of microtubules and microfilaments.

In compact bone osteocytes of experimental rats had heterochromatic nuclei and were located in the lacunae with contours, reminiscent of needles, so they are exposed to the resorption. Also was found significantly expanded in size lacunae relative to the size of osteocytes, which may be the result of an active process osteocytic osteolysis. The cytoplasm of osteocytes was poor in organelles and components of the cytoskeleton prevailed in most cells. There were lacunae with needle edges that contained detritus.

After lead exposure the density of osteocytes in the cancellous bone of rats was decreased by 16.9%, in the compact bone tissue – by 20.6% compared with the control group. Analysis of the relative number extended lacunae of osteocytes in of compact bone showed increasing their numbers in 1.98 times compared to the control, while in cancellous bone differences were not found.

*Conclusion.* The effect of lead in rats on the background of osteoporosis leads to degradation of membrane organelles of osteoblasts, leading to cell death in the cancellous bone, to expansion of osteocytes lacunae in compact bone, due to osteolytic activity of these cells. Also was observed loss of osteocytes in a compact and cancellous bone that leads to damage of the integrity of the bone matrix.

**Keywords:** rat, lead, bone, spine, osteocyte, osteoblast.

*Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.*

*Стаття надійшла 10.05.2016 року*