

**Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю
“ВІКОВІ АСПЕКТИ ЗАХВОРЮВАНЬ КІСТКОВО-М’ЯЗОВОЇ СИСТЕМИ”,
10-11 квітня 2014 р., Харків**

УДК: 591.84:616–089.583.29:577.73:092.9

**УЛЬТРАСТРУКТУРА ГУБЧАТОЙ КОСТИ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ
КРЫС В УСЛОВИЯХ ОБЩЕЙ ЛЕГКОЙ ГИПОТЕРМИИ**

Бенгус Л.М., Дедух Н.В., Пошелок Д.М.

*ГУ “Институт патологии позвоночника и суставов
им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины”, Харьков*

Резюме. Исследование показало, что губчатая кость старых животных более чувствительна к действию гипотермии. В костной ткани старых крыс активизация остеокластической резорбции обнаружена раньше, чем у молодых животных (на 7 и 14 сутки, соответственно). Нарушения внутрикостной микроциркуляции и их прогрессирование после действия гипотермии развивались раньше и были более выражены у старых животных, что можно связать с возрастзависимым снижением адапционно-компенсаторных возможностей. После действия гипотермии в губчатой кости молодых и старых крыс отмечено угнетение костеобразования, преобладание покоящихся остеобластов и оголенные поверхности кости. Гипотермия вызывает дисбаланс процессов костного ремоделирования со сдвигом остеобласт-остеокластного и остеоцитарного ремоделирования в сторону активизации костной резорбции.

Ключевые слова: гипотермия, костное ремоделирование, крысы, возраст.

Введение

В настоящее время на фоне стремительного развития научно-технического прогресса и связанной с ним урбанизации человечество оказывает пагубное влияние на экологическую ситуацию планеты в целом. Одним из проявлений такого влияния являются нехарактерные сезонные температурные режимы.

Известно, что костная ткань является мобильной структурой, которая реагирует на действие разнообразных факторов как внутреннего, так и внешнего происхождения, в том числе, на температурное воздействие. Реакция костной ткани заключается в изменении характера ее перестройки или ремоделирования. В научной литературе имеются единичные работы (выполненные в условиях *in vitro* на культуре остеобластов свода черепа крысы, остеокластах костного мозга мыши и остеобластах человека), в которых сообщается о повреждающем действии гипотермии на костный метаболизм [1, 2]. На сегодня практически отсутствуют данные об эффекте тотальной гипотермии на ультраструктурную организацию костной ткани в условиях *in vivo*. В связи с этим в данной работе была поставлена цель – изучить особенности ультраструктурной организации губчатой кости дистального метафиза бедра белых крыс разного возраста после воздействия общей легкой гипотермии.

Материал и методы исследования

Состояние гипотермии у белых крыс 6 и 24-месячного возраста (молодые и старые животные, соответственно) моделировали путем 5-ти часовой экспозиции животных в холодильной камере при температуре -20°C на протяжении 5 суток. Ректальная температура у крыс была снижена на $3-4^{\circ}\text{C}$. Животных выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки после холодового воздействия с соблюдением международных нормативов по биоэтике [3, 4].

Для электронно-микроскопического исследования фрагменты костной ткани (размером 1 мм^3) дистального метафиза бедренной кости крыс префиксировали в 5% фиксаторе Карновского с постфиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия. Материал дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации и ацетоне, заключали в смесь эпоксидных смол “эпон–аралдит” [5]. Ультратонкие срезы, толщиной 50–60 нм, контрастировали по Reynolds [6], после чего исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа ЭМВ-100 БР. Цифровые негативы электронограмм изготавливали с помощью фотокамеры Canon EOS–300D.

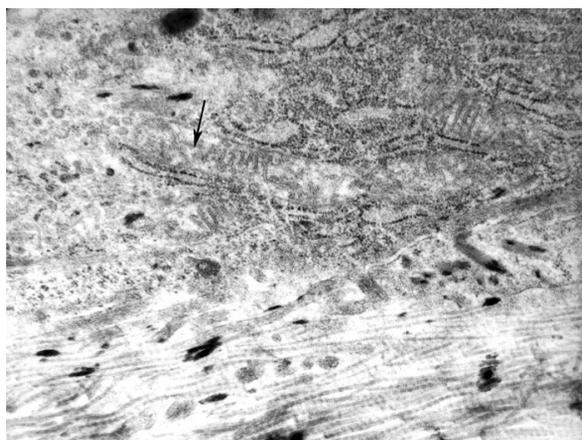


Рис. 1. Фрагмент остеобласта. Удлиненная крупная набухшая митохондрия (стрелка). Деструкция крист. Лизис цитолеммы остеобласта. Коллагеновые волокна неминерализованного остеоида. 3 суток после гипотермии. 6 мес. крыса. Контрастирование по Рейнольдсу, x16800.

Результаты исследования и обсуждение

Молодые животные

3 суток после гипотермии. Ультраструктурный анализ губчатой кости молодых животных показал, что на поверхности костных трабекул обнаружены остеобласты в состоянии функциональной активности с множеством канальцев гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС) в цитоплазме. Над остеобластами нередко располагались преостеобласты. Несмотря на признаки биосинтетической активности, в цитоплазме как остеобластов, так и преостеобластов присутствовало значительное количество лизосом, что, по-видимому, было связано с активизацией в клетках ферментативного гидролиза продуктов деструкции, образованных под влиянием гипотермии. В цитоплазме остеобластов выявлена деструкция митохондрий, которая сопровождалась их набуханием. Отмечены признаки очагового лизиса двухконтурной мембраны и крист митохондрий. Нередко встречались митохондрии нетипичных крупных размеров, имеющие удлиненную форму (рис. 1).

В минерализованном матриксе костных трабекул присутствовали остеоциты, имеющие деструкцию цитолеммы и органоиды, содержащие набухшие просветленные митохондрии. В расширенных костных лакунах резорбционного типа с неровными зубчатыми краями нередко присутствовали остеоциты с электронноплотным фрагментированным ядром, что указывало на их гибель путем апоптоза. Вблизи деструктивно измененных остеобластов на костной по-

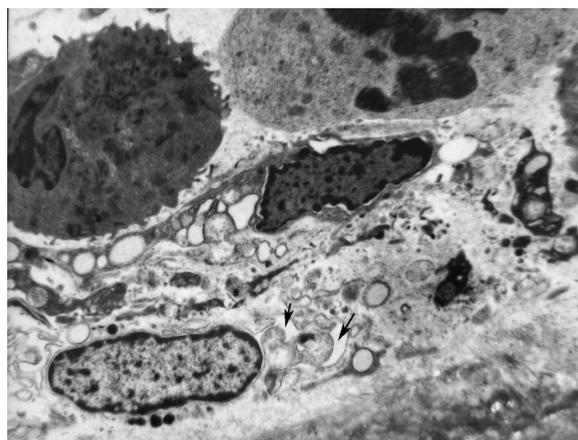


Рис. 2а. Остеобласт на поверхности остеоида. Набухание канальцев гЭПС в цитоплазме остеобласта (стрелки). 7 суток после гипотермии. 6 мес. крыса. Контрастирование по Рейнольдсу, x4000.

верхности были выявлены вскрытые канальцы остеоцитов.

7 суток после гипотермии. На трабекулярных поверхностях присутствовали остеобласты с выраженной деструкцией цитоплазматической мембраны. В цитоплазме остеобластов, расположенных на поверхности неминерализованного остеоида, нередко имело место нарастание отчетливых явлений, проявляющихся в виде набухания канальцев гЭПС (рис. 2а). Полости таких канальцев характеризовались низкой электронной плотностью, что указывало на их заполнение отчетливой жидкостью.

В минерализованном костном матриксе присутствовали остеоциты, значительная часть которых находилась на разных стадиях апоптози-



Рис. 2б. Деструкция остеоцита. Интенсивная гетерохроматизация клеточного ядра. Дезорганизация цитоплазмы. 7 суток после гипотермии. 6 мес. крыса. Контрастирование по Рейнольдсу, x4000.

ческой гибели клетки. Такие остециты содержали ядро с высокой долей гетерохроматина или же оно было полностью гетерохроматизировано (рис. 26), отмечались обширные очаги лизиса кардиолецитов и формирование первичных мелких апоптотических телец.

В красном костном мозге вблизи трабекулярных поверхностей выявлялись расширенные по типу синусоидов гемокапилляры с низкой плотностью форменных элементов. Между отростками эндотелиоцитов имелись щели, что указывает на нарушение контакта между ними.

14 суток после гипотермии. Изменения ультраструктурной организации клеток и матрикса губчатой кости были обнаружены и на этот срок наблюдения. На поверхности костных трабекул на значительном протяжении были локализованы покоящиеся остеобласты, имеющие сплюсненную форму, небольшое гетерохроматизированное ядро и узкий ободок слабоорганизованной цитоплазмы. Встречались участки костной поверхности, не содержащие остеобластов, – “оголенная” поверхность, что, по-видимому, связано с гибелью остеобластов. В некоторых остеобластах в цитоплазме выявлены миелолиновые фигуры, являющиеся результатом деструкции фосфолипидов мембран, а также небольшие очаги деструкции цитоплазмы.

На трабекулярных поверхностях также были обнаружены остеокласты, находящиеся в состоянии высокой функциональной активности, о чем свидетельствует наличие в клетках нескольких ядер (3–5) с преобладанием эухроматина и периферическим гетерохроматином, а также ци-

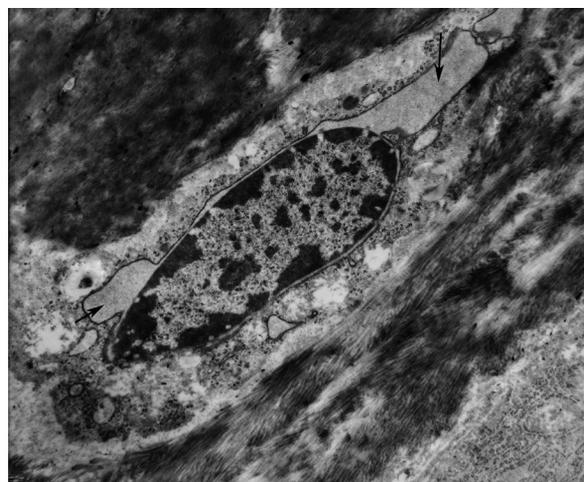


Рис. 3а. Остеоцит в лакуне. Расширенное перинуклеарное пространство (стрелки). 14 суток после гипотермии. 6 мес. крыса. Контрастирование по Рейнольдсу, x6000.

топлазмы с большим количеством вакуолей, фагосом и вторичных лизосом. Некоторые остеокласты имели сформированную гофрированную каемку, псевдоподии которой непосредственно контактировали с резорбируемой минерализованной костью.

В расширенных гемокапиллярах костного мозга выявлены признаки деструкции эндотелия. Вблизи таких синусоидов отмечены диапедезные кровоизлияния. Встречались также запустевшие капилляры. Нередко возле гемокапилляров обнаруживались формирующиеся остеокласты, содержащие 1–2 ядра и цитоплазму с большим количеством округлых и овальных митохондрий. Вблизи костных трабекул также выявлены остеокласты, которые находились на стадии инактивации. В цитоплазме таких клеток выявлено множество вакуолей и фагосом, однако клетки не имели непосредственного контакта с костной поверхностью.

Наиболее выраженные изменения ультраструктурной организации были зафиксированы в остеоцитах. В них отмечено формирование расширенных перинуклеарных пространств, заполненных тканевой жидкостью (рис. 3а).

В отдельных остеоцитах наблюдалась гетерохроматизация ядра с нарушением целостности ядерной мембраны. В цитоплазме остеоцитов была отмечена низкая плотность мембранных

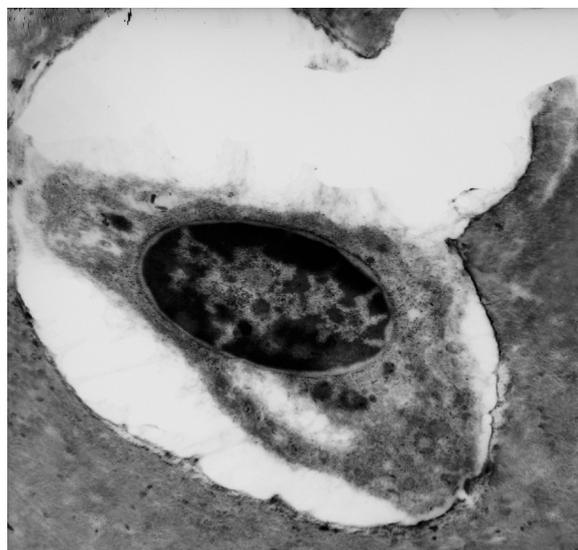


Рис. 3б. Остеоцит с гетерохроматизированным ядром и слабоорганизованной цитоплазмой. Лизис цитоплазматической мембраны. Расширенная резорбционная лакуна и костный канал остеоицита. Перистоеоцитарный остеолиз. 14 суток после гипотермии. 6 мес. крыса. Контрастирование по Рейнольдсу, x8000.

органовидов, имелись выраженные деструктивные изменения: присутствие очагов деструкции переменных размеров. В большинстве остеоцитов выявлялся локальный лизис цитоплазматической мембраны, вплоть до ее полного отсутствия. Выявлялись остеоциты, расположенные в расширенных резорбционных лакунах, которые имели неровные зубчатые края (рис. 3б). Это является отражением активизации периостеоцитарного остеолита в ответ на гипотермию.

В настоящее время функционированию остеоцитов уделяется большое внимание [7–10]. Остеоциты рассматривают не просто как клетки, заключенные в минерализованный костный матрикс, которые отвечают за механическую прочность скелета, являются механосенсорными клетками, но и как клетки, регулирующие минеральный обмен костной ткани посредством изменения остеоцитарного ремоделирования, которое имеет место в кости наряду с остеобласт-остеокластным ремоделированием [7, 9, 10]. По данным Н. Qing и L.F. Bonewald (2009) остеоциты ремоделируют перилакунарный и периканаликулярный матрикс кости [7]. Активизация периостеоцитарного (он же – остеоцитарный, перилакунарный) остеолита или перилакунарной резорбции является свидетельством сдвига остеоцитарного ремоделирования в сторону активизации костной резорбции за счет остеоцитов, что мы и выявили в нашем исследовании после влияния гипотермии.

Следует отметить, что на данный срок исследования нами были обнаружены более выраженные нарушения ультраструктурной организации остеоцитов, по сравнению с остеобластами. Это можно объяснить тем, что на фоне гипотермии остеобласты, которые находятся на поверхности костных трабекул, имеют лучшие условия для обеспечения их трофики – за счет близости кровеносных капилляров костного мозга. На фоне гипотермии, приводящей к общему замедлению кровотока и угнетению внутриканальцевой костной микроциркуляции, остеоциты, будучи замурованными в минерализованный костный матрикс, оказываются в условиях более выраженного нарушения трофики, что приводит к формированию в них значительных ультраструктурных изменений и нередко заканчивается гибелью остеоцитов.

Признаки активизации костной резорбции были также отмечены в области периоста. Периостальная поверхность кости на значительном

протяжении была бахромчатой, представленной множеством мелких костных фрагментов. В зоне резорбции периоста нередко выявлялись мононуклеарные фагоциты – клетки, играющие вспомогательную роль в процессе костной резорбции и включающиеся в этот процесс после завершения основной остеокластической резорбции.

Минерализованный костный матрикс имел неоднородную структуру. Он характеризовался наличием участков различной электронной плотности, что отражает разную степень его минерализации, возможно, обусловленную продолжительным холодным воздействием.

Старые животные

3 суток после гипотермии. В губчатой кости 24-х месячных животных на данный срок исследования были выявлены нарушения ультраструктурной организации остеобластов в виде очагов деструкции канальцев гЭПС и митохондрий, повышения плотности вторичных лизосом и остаточных телец в цитоплазме клеток, участков лизиса цитоплазматической мембраны. В остеоцитах отмечены локальная деструкция цитолеммы, электронно-плотные включения и деструктивные полости в цитоплазме с кальцификацией их поверхности, признаки активизации остеоцитарного остеолита (расширенные лакуны с зубчатыми краями). В перилакунарных областях выявляются очаги пятнистой кальцификации матрикса. Отмечено нарушение проницаемости гемокapилляров, плазморрагия, деструкция эндотелия.

7 суток после гипотермии. Электронно-микроскопические изменения в губчатой кости животных, обнаруженные через 7 суток после действия гипотермии, в целом подобны таковым, выявленным через 3 суток. При этом в остеобластах зафиксировано набухание и дезорганизация митохондрий, что указывает на нарушение энергетического обмена клеток. В цитоплазме остеобластов присутствуют полости деструкции. В остеоцитах отмечены участки деструкции ядерной мембраны и незначительное расширение перинуклеарного пространства.

На данный срок исследования у старых животных имеет место активизация процессов костной резорбции, о чем свидетельствует формирование кластеров остеокластов. На поверхности трабекул располагаются функционально активные остеокласты с гофрированной каемкой (рис. 4а).

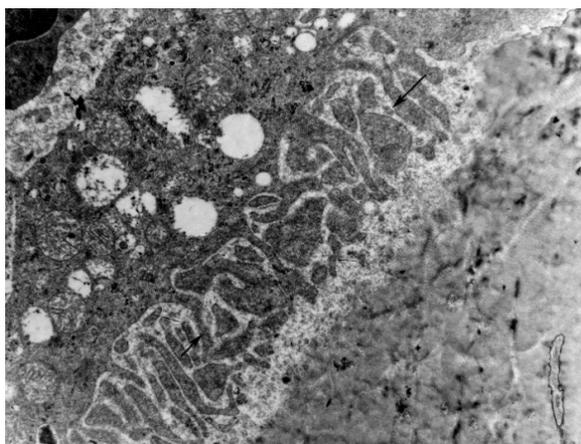


Рис. 4а. Фрагмент функционально активного остеокласта с хорошо сформированной гофрированной камеркой (стрелки). 7 суток после гипотермии. 24 мес. животное. Контрастирование по Рейнольдсу, x8000

Сохраняются нарушения внутрикостной микроциркуляции – деструкция эндотелия синусоидных гемокапилляров костного мозга, большие липидные капли в очагах деструкции. В гемокапиллярах отмечено прилипание или сладж форменных элементов крови друг к другу, что приводит к повышению вязкости крови и затрудняет ее перфузию через микрососуды. Известно, что сладж-синдром возникает при заболеваниях, сопровождающихся увеличением в крови фибриногена и глобулинов и снижением содержания альбуминов (сахарный диабет, миеломная болезнь, ишемическая болезнь сердца), а также при гипотермии, обморожениях [11, 12]. Прогрессирование таких нарушений приводит к запуску капилляров (рис. 4б), что и было обнаружено в нашем исследовании на данный срок наблюдения.

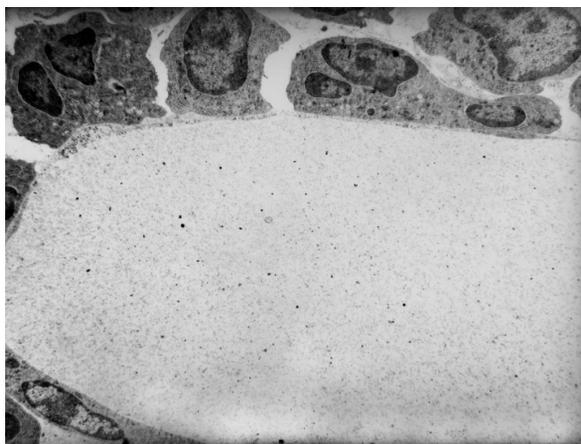


Рис. 4б. Старое животное. Запустевший гемокапилляр. 7 суток после гипотермии. 24 мес. животное. Контрастирование по Рейнольдсу, x4000.

14 суток после гипотермии. На поверхности костных трабекул преобладали покоящиеся остеобласты, имеющие вытянутую форму, гетерохроматизированное ядро и скудную цитоплазму. В минерализованном матриксе костных трабекул располагались остециты с гетерохроматизированным ядром и деструкцией митохондрий (частичный лизис 2-х контурной мембраны). В остеocyтах, расположенных в расширенных лакунах с неровными зазубренными краями, была повышена плотность лизосом, что свидетельствует о переключении их метаболизма на активизацию перилакунарной резорбции. Выявлены единичные вскрытые лакуны, содержащие остеocyты на стадиях деструкции. Причем возле таких остеocyтов располагались функционально активные остеокласты, псевдоподии которых проникали в лакуны остеocyтов. В связи с этим представляют интерес современные исследования J. Xiong и С. А. O'Brien (2012), которые установили, что именно остеocyты являются главным источником остеокластогенных цитокинов – RANKL, которые способствуют формированию остеокластов и активизации их резидентных форм [13].

Для костного матрикса характерными были неоднородная минерализация, наличие пятнистых очагов обызвествления. Костный мозг содержал запустевшие гемокапилляры.

Заключение

Таким образом, после действия гипотермии в губчатой кости как у молодых, так и у старых крыс отмечено угнетение формирования костной ткани, преобладание покоящихся остеобластов и оголенные поверхности костных трабекул. Имеет место дисбаланс процессов костного ремоделирования с угнетением процесса костеобразования и повышением активности костной резорбции за счет функциональной активности остеокластов и остеocyтов.

Литература

1. Patel J.J., Utting J.C., Key M.L. et al. Hypothermia inhibits osteoblast differentiation and bone formation but stimulates osteoclastogenesis // *Exp. Cell. Res.* – 2012. – Vol. 318. – P. 2237–2244.
2. Aisha M.D., Nor-Ashikin M.N.K., Sharaniza A.B.R. et al. The effects of hypo- and hyperthermia on SPARC in normal human osteoblast cells // *Regenerative Research.* – 2012. – Vol. 1. – P. 62–65.
3. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний пере-

- клад [Электронний ресурс] – Режим доступу: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=994_137.
4. Закон України №3447–IV від 21.02.2006: “Про захист тварин від жорстокого поводження” (Стаття 26).
 5. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / М.: “Мир”, 1975. – 324 с.
 6. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high PH an electronopaque stain in electron microscopy. // J. Cell Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208–212.
 7. Qing H., Bonewald L.F. Osteocyte Remodeling of the Perilacunar and Pericanalicular Matrix // Int. J. Oral Science. – 2009. – Vol. 1. – №2. – P. 59–65.
 8. Bonewald L.F. The amazing osteocyte // J. Bone and Mineral Res. – 2011. – Vol. 26 (2). – P. 229–238.
 9. Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Шубняков И.И. Динамическая оценка остеоцитарного ремоделирования костной ткани при использовании неинвазивного метода // Морфология. – 2009. – Т. 135 (2). – С. 66–73.
 10. Аврунин А.С. Остеоцитарное ремоделирование: история вопроса, современные представления и возможности клинической оценки // Травматология и ортопедия России. – 2012. – №1, Вып. 63. – С. 128–134.
 11. <http://www.medkurs.ru/lecture3k/ph/pp7/5630.html>.
 12. <http://www.medichelp.ru/posts/view/5260>.
 13. Xiong J., O'Brien C.A. Osteocyte RANKL: New Insights into the Control of Bone Remodeling // J. Bone Miner. Res. – 2012. – Vol. 27 (3). – P. 499–505.

THE ULTRASTRUCTURE OF TRABECULAR BONE OF YOUNG AND OLD RATS UNDER GENERAL MILD HYPOTHERMIA

Bengus L.M., Dedukh N.V., Poshelok D.M.

“Institute of Spine and Joint of prof. M.I. Sitenko NAMS of Ukraine”, Kharkiv

The aim. To research the features of ultrastructural organization of cancellous bone of femur distal metaphysis of white rats of a different age after influence of light total hypothermia.

Methods. Electron microscopy methods were researched the ultrastructural organization of cancellous bone of femur distal metaphysis of young and old rats after light total hypothermia.

Results. The cancellous bone of old animals is more sensitive to the light total hypothermia. In bone tissue of old rats the signs of activation of osteoclast resorption were found out earlier, than at young animals (on 7 days and 14 days, appropriately). After hypothermia disturbance of intraosseous microcirculation and their progression with forming of empty hemocapillars developed earlier and were more expressed at 24 month animals, that it is possible depend on to the aged decrease of adaptive and compensatory possibilities.

Conclusion. After influence of light total hypothermia into cancellous bone young and old rats were detected suppression of bone formation, predominance of rest osteoblasts and uncovered bone surfaces. There were the disbalance of bone remodeling with a displacement both osteoblast-osteoclast and osteocyte remodeling toward activation of bone resorption.

Key words: hypothermia, bone remodeling, rats, age.