

УДК: 611.71/.72: 531.113: 616-076
© Кутя С.А., 2011

ПЕРЕСТРОЙКА КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ГРАВИТАЦИОННЫХ ПЕРЕГРУЗОК ПО ДАННЫМ ГИСТОМОРФОМЕТРИИ Кутя С.А.

ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.П. Георгиевского»

Кутя С.А. Перестройка костной ткани крыс под влиянием гравитационных перегрузок по данным гистоморфометрии // Украинський морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 63-65.

В статье представлены результаты исследования процессов перестройки костей крыс, подвергавшихся воздействию гравитационных перегрузок, методом морфометрии недекальцинированных срезов костей, полученных и окрашенных по оригинальной методике. Установлены особенности изменений в зависимости от кратности воздействия перегрузок и возраста животных. Высказаны предположения относительно механизма развития выявленных изменений.

Ключевые слова: кости, перестройка, гравитационные перегрузки, гистоморфометрия.

Кутя С.А. Перебудова кісткової тканини щурів під впливом гравітаційних перевантажень за даними гистоморфометрії // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 63-65.

В статті наведені результати дослідження процесів перебудови кісток щурів, що піддавалися дії гравітаційних перевантажень, методом морфометрії недекальцинованих зрізів кісток, отриманих та забарвлених за оригінальною методикою. Встановлені особливості змін в залежності від кратності дії перевантажень та віку тварин. Висловлені припущення щодо механізму розвитку виявлених змін.

Ключові слова: кістки, перебудова, гравітаційні перевантаження, гистоморфометрія.

Kuty S.A. Bone-turnover in rats under hypergravity conditions: histomorphometric assessment // Український морфологічний альманах. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 63-65.

Article contains results of investigation of bone-turnover in rats exposed to hypergravity. Morphometry of undecalcified sections prepared and stained by original method was used. Features of changes depending on multiplicity of overload influence and rat's age were revealed. Possible mechanism of hypergravity effect on bone-turnover was suggested.

Key words: bone-turnover, hypergravity, histomorphometry.

Морфо-функциональное состояние любого органа определяется состоянием постоянно протекающих процессов синтеза и распада, а количественное изменение их интенсивности, как и соотношения, в конечном счете, определяет способность адаптироваться к изменению внешних условий. Костная ткань является одной из высоколабильных тканей организма, находящейся в состоянии постоянного неустойчивого равновесия, с одновременно протекающими аппозицией и резорбцией. Учитывая, что костная система сформировалась в процессе эволюции под действием силы земного притяжения, можно предположить, что любые изменения этого фактора должны неизбежно сказаться на состоянии процессов перестройки костной ткани.

Так K.R. Gordon et al. [11] отмечали стимулирующий эффект гипергравитации на рост губчатого вещества бедренной кости мышей, подвергавшихся действию 10-минутных гравитационных перегрузок величиной 4g 6 раз в день в течение 30 дней. В то время как J.J.W.A. Van Loon [12] приводит данные об уменьшении количества губчатого вещества в тазовой и плечевой костях, а также увеличении степени анизотропии трабекул головки бедренной кости крыс девятимесячного возраста, которые были зачаты, рождены и росли в условиях повышенной гравитации (2,5g). Активацию остеокластической резорбции *in vitro* обнаружили в своем исследовании A. Nemoto, T. Uemura [13], которые показали, что гипергравитация не оказывает эффекта на количество остеокластов с резорбционной активностью, но увеличивает резорбционную активность активированных остеокластов.

В наших предыдущих исследованиях были установлены особенности изменения биофизических свойств, микротвердости и фазового состава минерального компонента костей крыс, подвергавшихся действию повторяющихся гравитационных перегрузок [3-5]. Все эти показатели позволяют косвенным образом судить о физиологической перестройке в костях. Единственным же методом прямого и точного анализа ее процессов в настоящее время является гистоморфометрия. В связи с этим, целью нашего исследования явилось установление при помощи упомянутого метода особенностей процессов костеобразования и остеорезорбции под влиянием гравитационных перегрузок в зависимости от кратности их действия.

Материал и методы исследования. Исследование проведено на 36 двухмесячных крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 120-130 г, которые были разделены на две серии. Животных первой серии ежедневно подвергали воздействию поперечных гравитационных перегрузок величиной 9g в течение 10 минут в виде следующих друг за другом трех "площадок" продолжительностью по 3 минуты (с двумя 30-ти секундными перерывами между ними). Гипергравитацию моделировали путем вращения животных в периферических контейнерах на центрифуге Ц-2/500 (рабочий диапазон от 1 до 50 g, радиус плеча 50 см, градиент нарастания - 1,6 g/c, градиент спада - 0,6-0,8 g/c). Контролем служили животные второй серии, которых на период сеанса гипергравитации помещали в аналогичные контейнеры и размещали на платформе центрифуги.

По истечении сроков эксперимента (10, 30, 60 дней) на следующий день после последнего сеанса гипергравитации животных декалцировали под эфирным наркозом, забирали и очищали от мягких тканей большеберцовые кости. Дальнейшие манипуляции осуществляли по оригинальной методике [9]. Изготавливали блоки из участка вторичной спонгиозы толщиной 3-5 мм, которые фиксировали в 70% этаноле в течение суток, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали без декальцинации в эпон. Срезы толщиной 1-2 мкм изготавливали на ультрамикротоме «ULTRACUT» с использованием как стеклянных, так и алмазных ножей. Полученные полутонкие срезы окрашивали по методу Косса с последующим контрастным окрашиванием 1% раствором метиленового синего и 0,05% раствором основного фуксина.

Микроморфометрическое исследование проводили на компьютерном морфометрическом комплексе, в состав которого входят: микроскоп Olympus CX-31, цифровой фотоаппарат Olympus C5050Z с пиксельной матрицей, соединенный с микроскопом системой видеоадаптеров этой же фирмы.

Гистоморфометрию проводили при помощи компьютерной программы Image J. Определяли следующие показатели:

- параметры костеобразования:

- O.Th – osteoid thickness – толщина остеоида – средняя толщина (мкм) пластов остеоида;
- OV/BV – osteoid volume – объем остеоида – часть (%) губчатой костной ткани, которая не подверглась кальцификации;

- OS/BS – osteoid surface – поверхность остеоида – часть (%) общего периметра губчатой костной ткани, которая покрыта остеоидом;

- Ob.S/BS – osteoblast surface – поверхность остеобластов – часть (%) общего периметра губчатой костной ткани, покрытой активными остеобластами;

- параметры остеорезорбции:

- ES/BS – eroded surface – эрозированная поверхность – часть (%) поверхности губчатой кости покрытой лакунами резорбции;

- N.Oc – number of osteoclasts – количество остеокластов на квадратный миллиметр среза кости.

Все показатели измеряли в соответствии с рекомендациями American Society of Bone and Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee (комитета по гистоморфометрической номенклатуре Американского общества по исследованию костей и минералов) [10].

Цифровые данные обрабатывали статистически. Достоверной считали вероятность ошибки менее 5% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Данные гистоморфометрии показателей костеобразования (n=6)

Кратность действия перегрузок	Параметр		O.Th	OV/BV	OS/BS	Ob.S/BS
	Серия					
10	Контроль		4,48±0,19	7,56±0,21	20,24±0,38	21,52±0,44
	Перегрузка		7,09±0,28*	8,94±0,12*	22,92±0,74*	21,92±0,37
30	Контроль		6,45±0,15	7,85±0,31	27,88±0,34	25,90±0,16
	Перегрузка		7,10±0,22*	7,66±0,23	28,76±0,74	25,24±0,52
60	Контроль		8,33±0,14	8,19±0,19	23,65±0,61	26,09±0,59
	Перегрузка		7,47±0,18*	7,63±0,16*	22,51±0,17	23,97±0,44*

Примечание: * – ($p < 0,05$)

Таблица 2. Данные гистоморфометрии показателей резорбции кости (n=6)

Кратность действия перегрузок	Параметр		ES/BS	N.Oc
	Серия			
10	Контроль		4,15±0,09	0,39±0,02
	Перегрузка		4,42±0,06*	0,43±0,01
30	Контроль		4,01±0,11	0,42±0,02
	Перегрузка		4,15±0,07	0,43±0,02
60	Контроль		4,27±0,05	0,44±0,01
	Перегрузка		4,09±0,04*	0,40±0,01*

Примечание: * – ($p < 0,05$)

Морфометрический анализ недекальцинированных срезов вторичной спонгиозы большеберцовых костей показал, что десятикратное воздействие гравитационных перегрузок привело к достоверному увеличению, в сравнении с данными контрольной серии, показателей O.Th (на 58,3%), OV/BV (на 18,2%), OS/BS (на 13,2%) и ES/BS (на 6,4%).

В группе животных, подвергавшихся воздействию гравитационных перегрузок тридцать раз, практически все параметры соответствовали контрольным значениям. Исключение составил показатель O.Th, который, также как и у животных предыдущей группы, превышал данные контроля, но менее значимо – на 10,1% ($p < 0,05$).

С увеличением кратности действия перегрузок до шестидесяти у животных эксперимен-

тальной серии выявили достоверное уменьшение практически всех исследуемых показателей относительно контроля: O.Th на 10,4%, OV/BV на 6,9%, OS/BS на 4,8% ($p > 0,05$), Ob.S/BS на 8,1%, ES/BS на 4,2%, N.Oc на 8,7%.

В результате проведенного нами исследования можно предположить, что при воздействии на костную систему двухмесячных крыс такого стрессора, как гипергравитация, наиболее ранней реакцией является активация как костеобразования, так и резорбции с преобладанием первого процесса. Это предположение основывается на том, что после десяти сеансов моделирования гравитационных перегрузок во вторичной спонгиозе большеберцовых костей крыс нами обнаружено увеличение поверхности губчатого вещества, покрытого лакунами (этот показатель количественно характе-

ризует процесс резорбции), а также значительным утолщением пластов остеоида, увеличением объема и поверхности остеоида, отражающими процесс костеобразования.

Увеличение кратности воздействия гравитационных перегрузок до тридцати не приводит к изменению интенсивности процессов перестройки костной ткани, так как изучавшиеся показатели соответствовали контрольным значениям. Этот факт свидетельствует о быстрой адаптации губчатого вещества костей к гипергравитации.

У крыс, подвергавшихся действию гравитационных перегрузок 60 раз, нами выявлено замедление как процессов образования костной ткани, так и ее резорбции. На это указывает уменьшение величин всех исследованных показателей. Выявленные изменения позволяют предположить о начале формирования отрицательного костного баланса с последующим развитием остеопоротических изменений в губчатом веществе большеберцовых костей крыс.

Говоря о возможных механизмах действия гравитационных перегрузок на процессы перестройки костной ткани, необходимо отметить следующие факторы.

1. *Нарушения гемодинамики.* При воздействии гравитационных перегрузок в организме происходит перемещение циркулирующей массы крови в соответствии с вектором перегрузки [7]. Этот эффект вызывает существенное расстройство кровообращения в костях. При этом изменения возникают во всех компонентах микроциркуляторного русла, включая и их нервные структуры [2].

2. *Мышечная активность,* являющаяся пусковым фактором остеогенеза, играет важную роль при действии поперечных гравитационных перегрузок, моделировавшихся в нашем эксперименте. Известно, что при действии подобных перегрузок, вызывающих деформацию грудной и брюшной полости, в акте дыхания принимают не только основная, но и дополнительная мускулатура. В то же время другие мышцы туловища и конечностей находятся в состоянии напряжения или статической нагрузки [1].

3. *Нарушения прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза.* В последние годы появились исследования [6, 8], свидетельствующие о существенной активации процессов перекисного окисления липидов в условиях повышенной гравитации, что, на наш взгляд, может приводить к возникновению изменений в костной ткани. В этой связи, коррекция нарушений окислительного гомеостаза при действии гравитационных перегрузок является патогенетически обоснованной.

Вероятно, сочетание указанных факторов, в конечном итоге, приводит к изменениям в костной ткани, выявленным в нашем исследовании.

Сопоставление обнаруженных нами фактов с результатами других работ является проблематичным. Это связано с тем, что каждое исследование, посвященное влиянию гипергравитации на биологические объекты, преследует свои цели, ставя соответствующие задачи и подводя методологическую основу, которая сильно отличается в разных экспериментах.

Несмотря на разрозненность и противоречивость имеющихся в литературе данных [11-13], на основании полученных нами результатов, можно заключить, что гравитационные пе-

регрузки оказывают значительное влияние на процессы физиологической перестройки костной ткани, затрагивая как остеорезорбцию, так и костеобразование. Направленность же изменений зависит от кратности их действия.

В перспективе планируется изучение влияния гравитационных перегрузок на перестройку костной ткани крыс других возрастных групп методами как статической, так и динамической гистоморфометрии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бухтияров И.В. Сравнительная характеристика показателей газоэнергообмена при воздействии боковых (G_y), продольных (G_z) и продольно-боковых перегрузок (G_z/G_y) / И.В. Бухтияров, О.А. Головкина // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2005. – Т.39, №5. – С. 10 – 13.
2. Влияние экстремальных факторов на строение органов и тканей [сб. научн. тр. / науч. ред. Привес М.Г., Михайлов С.С.]. – М.: Медицина, 1972. – 96 с.
3. Кутя С.А. Микротвердость костей крыс при гравитационных перегрузках и применении различных способов повышения устойчивости к ним / С.А. Кутя // Укр. морф. альм. – 2009. – Т.7, №3. – С. 46 – 48.
4. Кутя С.А. Влияние поперечных гравитационных перегрузок на органые характеристики костей крыс разного возраста / С.А. Кутя // Укр. морф. альм. – 2010. – Т.8, №2. – С. 115 – 117.
5. Кутя С.А. Возрастные особенности минеральной фазы плечевых костей крыс при систематическом гипергравитационном воздействии / С.А.Кутя // Труды КГМУ им. С.И.Георгиевского «Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения». – 2010. – Т. 146, ч. V. – С. 90 – 93.
6. Окисновально-антиоксидантний статус щурів за умов гіпергравітації / Н.Я. Карбашевська, С.А. Олійник, Ю.М. Білоконь [та ін.] // Фізіологічний журнал. – 2001. – Т.47, №5. – С. 77 – 81.
7. Основы космической биологии и медицины [под ред. О.Г.Газенко, М.Кальвина]. Т.2. – М.: Наука, - 1975. – 420 с.
8. Пикалюк В.С., Вміст деяких компонентів сироватки крові щурів при гравітаційних перевантаженнях та за умов використання способів підвищення стійкості до їх дії / В.С. Пикалюк, С.А. Кутя, Г.О. Мороз // Патологія. – 2009. – Т.6, №1. – С. 78 – 80.
9. Пикалюк В.С. Модифікація методики гистологического исследования костной ткани / В.С. Пикалюк, С.А. Кутя, Д.В. Шадура // Морфология. – Т. IV, №3. – С. 72 – 76.
10. Parfitt A.M. Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units / A.M. Parfitt, M.K. Drezner, F.H. Glorieux [et al.] // J. Bone Min. Res. – 1987. – Vol. 2, №6. – P. 595 – 610.
11. Gordon K.R. Changes in the architecture of cancellous bone in the femora of developing mice as a result of short duration hypergravity / K.R. Gordon, S.R. Reese, P.A. Knecht // American Zoologist. – 1989. – Vol. 29, №1. – P. 205 – 219.
12. Van Loon J.J.W.A. Hypergravity studies in the Netherlands / J.J.W.A. Van Loon // J. Gravit. Physiol. – 2001. – Vol. 8, №1. – P. 139 – 142.
13. Nemoto A. Hypergravity effects on osteoclasts activity / A. Nemoto, T. Uemura // J. Gravit. Physiol. – 2000. – Vol. 7, №2. – P. 127 – 128.

Надійшло 11.11.2010 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін