

УДК 57.043:57.084.1–615.832.96:616.71

© Д. М. Пошелок, С. В. Малишкіна, 2013

## СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ КОМПАКТНОЇ КІСТКИ ПІСЛЯ ЗАГАЛЬНОЇ ГІПОТЕРМІЇ

Д. М. Пошелок, С. В. Малишкіна

Лабораторія експериментального моделювання (зав. – к. б. н. С. В. Малишкіна), ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України». 61024, Україна, м. Харків, вул. Пушкінська, 80. E-mail: s\_malysh@ukr.net

### STRUCTURAL ORGANIZATION OF COMPACT BONE AFTER GENERAL HYPOTHERMIA

D. M. Poshelok, S. V. Malyshkina

#### SUMMARY

In an experiment on rats that were under simulated condition of light hypothermia, the changes of the compact bone were researched using histological and morphometrical methods. It has been established that under the influence of light hypothermia in the shaft bone stocks of rats destructive changes develop on the 7th and 14th days. These changes are caused by osteocytes with pyknotic nuclei and empty capsules of osteocytes, which appear and increase in number as function of the observation time. We have detected expansion of the osteocyte capsules and an increase of the diameters of the osteon central channels, destruction and desolation of blood vessels. The diaphysis histoarchitectonics is being disturbed, which is indicated by structural changes of the osteon stratum and disruption of the osteons.

### СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ КОМПАКТНОЇ КОСТИ ПОСЛЕ ОБЩЕЙ ГИПОТЕРМИИ

Д. М. Пошелок, С. В. Малишкіна

#### РЕЗЮМЕ

В експерименте на 40 крысах, у которых было смоделировано состояние легкой гипотермии, исследовали структурные изменения в компактной кости с использованием гистологических и морфометрических методов. Установлено, что под влиянием легкой гипотермии в костной ткани диафиза крыс на 7 та 14 сутки развиваются деструктивные изменения. Они связаны с появлением и увеличением со сроком наблюдения количества остеоцитов с пикнотическими ядрами и пустых лакун остеоцитов. Отмечается расширение лакун остеоцитов и диаметров центральных каналов остеонов, деструкция кровеносных сосудов и их запустение. Нарушается гистоархитектоника диафиза на что указывает изменение структуры остеонного шара и дезорганизация остеонов.

**Ключові слова:** експеримент, щури, загальна гіпотермія, структура кістки.

Особливості перебудови кістки в умовах дії різних несприятливих факторів є фундаментальною проблемою біології та медицини. Кісткова тканина є фізіологічно динамічною та надзвичайно чутливою до екзогенних негативних впливів (травма, дія різних шкідливих екологічних факторів) оскільки вона тісно пов'язана з нервово-судинною та м'язовою системами [2, 9]. Відомо, що з віком метаболічні процеси в організмі уповільнюються [10]. Є дані і про те, що у літніх людей та людей похилого віку спостерігається зниження температури тіла (гіпотермія) [12]. Поєднання цих двох факторів – уповільнення процесів метаболізму та хронічна гіпотермія може бути причиною різних порушень в органах і тканинах, в тому числі і кістковій тканині. Відомі лише окремі експериментальні роботи стосовно дії гіпотермії на кісткову тканину, де розкривається її негативний вплив на культивовані клітини кісткового мозку та остеобласти [12, 14].

Мета дослідження: дослідити структурні зміни у компактній кістковій тканині щурів після дії загальної легкої гіпотермії.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти виконані на 30 щурах (самиці, 6-місячного віку) у 2 серіях: 1 серія (дослід) – тварини, у яких моделювали загальну легку гіпотермію

шляхом 5-добового перебування тварин у холодильній камері ( $t = -20^{\circ}\text{C}$ ) впродовж 5 годин щоденно. Щури знаходились у відсіках камери поодиноці. Ректальну температуру вимірювали кожної доби. Середні значення ректальної температури після 25 годин перебування у холодильній камері становили  $36,8\text{--}37,5^{\circ}\text{C}$  (в нормі у щурів температура дорівнює  $38,0\text{--}39,0^{\circ}\text{C}$ ).

Гіпотермія – це патологічний стан, який зумовлений зниженням внутрішньої температури тіла до  $35^{\circ}\text{C}$  і менше. В літературі існує чимало класифікацій гіпотермії. Ми дотримуємось класифікації Н. Е. Мищук (2006), за якою гіпотермію, в залежності від рівня температури тіла, класифікують як легку ( $32\text{--}35^{\circ}\text{C}$ ), помірну ( $28\text{--}32^{\circ}\text{C}$ ), тяжку ( $28\text{--}20^{\circ}\text{C}$ ) і глибоку ( $< 20^{\circ}\text{C}$ ).

2 серія – контрольні тварини утримувались поодиноці у клітках при кімнатній температурі. Тварин (у контролі та досліді) годували до та після початку моделювання гіпотермії. Тварин виводили з експерименту на 7 та 14 добу після останнього сеансу гіпотермії шляхом передозування гіопенталу натрію. Експерименти на щурах проведені з дотриманням вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин ...» [4]. Протокол відповідності проведених експериментальних досліджень сучасним вимогам

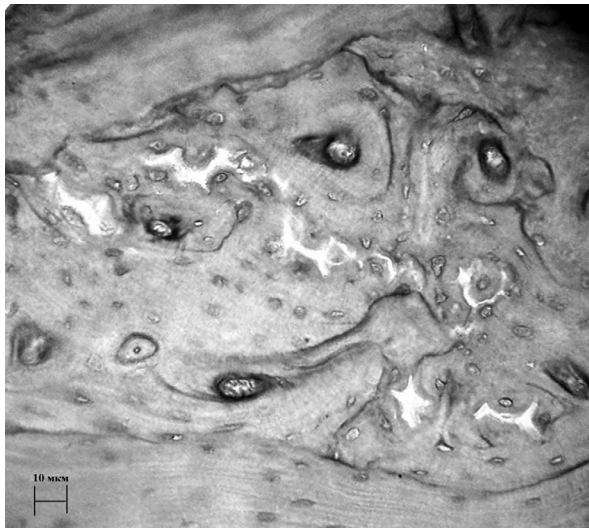
біоетики затверджений Комітетом з біоетики ДУ «ПІХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМНУ» (протокол № 88 від 30.05.2011 р.).

Матеріалом для дослідження служили діафізи стегнових кісток щурів. У роботі використані гістологічні та гістоморфометричні методи. Для гістологічного дослідження обробку фрагментів стегнових кісток (нижня третина діафіза) проводили за стандартними методами, керуючись рекомендаціями Д. С. Саркісова та Ю. Л. Перова [7]. Поперечні зрізи діафізу (6–10 мкм) забарвлювали гематоксиліном Вейгерта та еозином, а також пікрофуксином за Ван-Гізона. Дослідження гістологічних зрізів проводили у світловому мікроскопі MICROS (Austria). Виконано підрахунок кількості остеоцитів та порожніх лакун остеоцитів у полі зору мікроскопа (при зб. 40×) та визначено діаметр лакун остеоцитів (окуляр-мікромір MOB-15×). У кожному окремому випадку аналізували п'ять полів зору на кожному зрізі. Отримані цифрові дані оброблені методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента. Статистично значимою вважали різницю при  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Контрольні щури (до дослідних щурів 7 та 14 доби після гіпотермії). На зрізі діафіза щурів виявляється шар внутрішніх та зовнішніх генеральних пластинок між якими розташовується остеонний шар (рис. 1). Забарвлення матриксу кістки гематоксиліном було рівномірним, слабо оксифільним. Необхідно відмітити, що остеонний шар у діафізі щурів відрізняється від структурної організації у людини відсутністю остеонів з чіткою концентричною структурою.

Періост представлений шаром колагенових волокон та 2–3 рядками продовгуватих, яскраво



**Рис. 1. Фотовідбиток гістопрепарату у ділянці діафізу: тонкостінна кровоносна судина у остеонному шарі з клітинами крові у просвіті. Значна щільність остеоцитів у продовгуватих лакунах. Контроль. Зб. 200. Гематоксилін Вейгерта та еозин**

забарвлених клітин фібробластичного диферону. На поверхні ендосту відмічені ділянки, вкриті шаром активних остеобластів.

Шар внутрішніх генеральних пластинок дещо вужчий за шар зовнішніх пластинок, а остеонний шар порівняльний з шириною зовнішніх генеральних пластинок. Місцями на зрізі важко визначити межу між остеонним шаром та шаром внутрішніх генеральних пластинок.

Цементні лінії переважної більшості внутрішніх та зовнішніх генеральних пластинок рівномірні та виявляють незначну базофілію. У остеонному шарі спостерігаються остеони переважно еліптичної форми і лише невелика кількість остеонів мають округлу форму. Контури незначної частини остеонів нерівномірні. Кісткові концентричні пластинки остеонів представлені однією або двома генераціями кісткової тканини. Між остеонами розташовуються вставні пластинки. Центральні судинні канали остеонів невеликих діаметрів містять кровоносні судини, заповнені клітинами крові. Стінки центральних каналів окремих остеонів забарвлені виражено базофільно.

По всій території компактної кістки відмічається велика кількість яскраво забарвлених остеоцитів полігональної та овальної форми, розташованих у продовгуватих лакунах. Більшу частину клітини займає крупне базофільне ядро, продовгуватої форми. Клітини розташовуються у вузьких продовгуватих лакунах. Кількість остеоцитів у полі зору мікроскопа становить  $74,6 \pm 6,1$ . Лише місцями фіксуються поодинокі лакуни без остеоцитів чи остеоцити з пікнотичними ядрами. Їх відсоток дорівнює 5,1%. У всіх шарах діафіза спостерігаються різнокаліберні проривні кровоносні судини з вузькими просвітами, в яких виявляються клітинні елементи крові. Червоний кістковий мозок у кістковомозковому каналі має характерні клітини. Добре визначаються мегакаріоцити та численні кровоносні судини, заповнені клітинами крові.

На зрізі діафіза дослідних щурів через 7 діб після дії гіпотермії, як і у контрольних щурів, спостерігається шар зовнішніх та внутрішніх генеральних пластинок та остеонний шар між ними. Цементні лінії, на більшій частині території шарів, нечіткі, тому місцями межа між шарами не визначається. Періост, на відміну від контрольних щурів, представлений тонким шаром розшарованих колагенових волокон з одним та подекуди двома рядами фібробластів, більша частина з яких мають пікнотичні ядра.

У шарі зовнішніх генеральних пластинок цементні лінії нерівномірні, окремі зигзагоподібні. Ширина пластинок між лініями різна – від вузьких до широких. Місцями у остеонному шарі відмічається значне порушення упорядкованого розташування остеонів. Виявляються остеони різної форми з нерівномірними нечіткими цементними лініями. Поблизу таких остеонів розташовуються фрагменти вставних

пластинок з узурованими контурами. Значна частина остеонів представлена дрібними формами з однією генерацією пластинок та розширеним центральним судинним каналом. Стінки більшої частини центральних каналів виражено нерівномірні з базофільним забарвленням. Деякі центральні канали остеонів пусті. Поблизу таких остеонів спостерігається підвищення базофілії кісткового матриксу. Описані зміни гістоархітекτονіки можуть свідчити про початкові явища реактивних змін у кістковій тканині під впливом гіпотермії даного режиму.

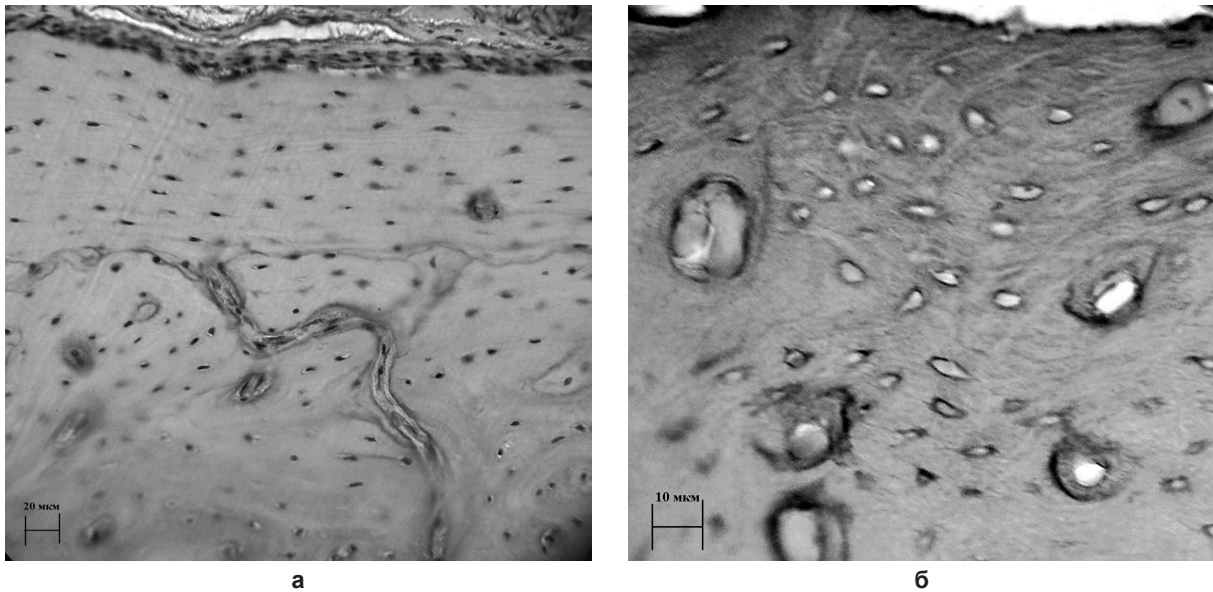
У остеонному шарі та місцями по території зовнішніх генеральних пластинок виявляються тріщини та щілини, базофілія стінок судинних каналів. Звертає увагу запусіння просвітів проривних кровоносних судин, базофілія та деструкція їх стінок. Відмічені зміни у кровоносному руслі діафіза щурів вказує на негативний вплив гіпотермії на кровопостачання кістки, а це, в свою чергу, має негативні наслідки для структурної організації кісткової тканини. Із літератури відомо, що стан кісткової тканини у значній мірі залежить від структурно-функціональних характеристик мікроциркуляторного русла [13]. Виражені структурні порушення у кровоносних судинах кісток щурів та дегенеративні зміни кісткової тканини спостерігали у щурів, які знаходились у антиопорностатичному положенні впродовж 28 діб [3, 6]. Розташування остеоцитів по території кістки нерівномірне. Відмічаються території кістки, де остеоцити не визначаються, та осередки з остеоцитами, ядра котрих пікнотичні. На території зовнішніх генеральних пластинок відмічені ділянки з повною відсутністю остеоцитів у лакунах та з лакунами, які заповнені детритом. Лакуни без остеоцитів розширені, окремі з них мають нерівномірні краї. Останнім часом встановлено, що остеоцити є багатофункціональними клітинними елементами кістки та їх життєздатність і функціональна активність має велике значення для збереження структурно-функціональної цілісності скелета [1]. Доведено, що остеоцити беруть участь у процесах ремодельовання кісткової тканини шляхом остеолізу та внутрішньолакунарного формування кісткового матриксу в залежності від механічних і метаболічних впливів [11]. Тому можна стверджувати, що поява остеоцитів із пікнотичним ядрами, порожніх лакун остеоцитів і розширення лакун остеоцитів у діафізі щурів дослідної групи пов'язано з активізацією остеоцитарного остеолізу, спричиненого гіпотермією. Подібні зміни у кістковій тканині описані і при інших видах дії зовнішніх негативних факторів на опорно-рухову систему. Так, встановлено, що в умовах гіпокінезії спостерігається збільшення кількості порожніх лакун та питомої площі остеоцитарних лакун [5]. Загальна кількість остеоцитів та порожніх лакун у полі зору мікроскопа в нашому дослідженні становить  $65,9 \pm 5,3$ , що вірогідно не відрізняється від визначеного

ного у контрольних щурів. Проте кількість порожніх лакун дорівнювала  $31,7\%$  що перевищує показники контролю у  $6,2$  разів.

Червоний кістковий мозок у кістковомозковому каналі з клітинами, котрі мають нечіткі контури, більша частина з яких має ознаки лізису. Просвіти кровоносних судин заповнені гомогенними масами.

14 доба після дії гіпотермії. У дослідних щурів на даний термін дослідження не було відмічено значних відмінностей у структурній організації кістки при порівнянні з попереднім терміном. Зафіксовані деструктивні зміни в структурі шарів компактної кістки діафізу, остеонів, їх центральних каналів, щільності остеоцитів та їх структурної організації у дослідних щурів на 7 добу після гіпотермії виявлялись і на 14 добу. При цьому території деструкції кістки були більшими, ніж на 7 добу. Так, на гістологічних зрізах діафізу спостерігаються нечіткі шари зовнішніх та внутрішніх генеральних пластинок з остеонним шаром між ними. Звертає увагу звуження остеонного шару відносно відміченого у контрольних щурів. Цементні лінії зовнішнього шару на більшій частині діафізу нерівномірні – зигзагоподібні, місцями виражено базофільні. У остеонному шарі відмічаються різної форми нечіткі остеони. Зовнішня поверхня концентричних пластинок остеонів має нерівномірні контури та, місцями, базофільне забарвлення. Деякі остеони представлено уламковими структурами. Частина остеонів має виражено асиметричну форму з розширеними пустими судинними каналами, стінки котрих потовщені та базофільні. Структура шару внутрішніх генеральних пластинок та остеонного шару місцями порушена за рахунок формування осередків кісткової тканини без клітин, відокремлених дрібними та крупними тріщинами та щілинами (рис. 2 а). Місцями виявляються ділянки розшарування кісткового матриксу та осередки лізису. Щільність остеоцитів зі збереженою структурою по території кістки значно зменшена у порівнянні з контролем. Як і на 7 добу, визначаються території без остеоцитів, ділянки з лакунами без остеоцитів, з лакунами, заповненими гомогенними масами, та з остеоцитами, які мають пікнотичні ядра (рис. 2 б).

Загальна кількість остеоцитів разом із порожніми лакунами на визначеній площі становила  $54,2 \pm 4,8$ , що було менше на  $27,4\%$  від показників контрольних щурів. Кількість порожніх лакун при порівнянні з 7 добою збільшилась на  $7,1\%$ . Звертає увагу зміна форми порожніх лакун та лакун з остеоцитами, котрі мають пікнотичні ядра. Лакуни у дослідних щурів на цей термін були розширеними (рис. 2 б), їх ширина була в середньому на  $28,5\%$  більшою за ширину лакун у контрольних щурів. Окремі лакуни втрачають чіткість контурів і стають «розмитими». На відміну від контрольних щурів спостерігається значна кількість розширених судинних каналів у внутрішніх генеральних пластинках та остеонному шарі. Їх



**Рис. 2.** Фотовідбитки гістопрепаратів у ділянці діафізу дослідних щурів: а) виражена дезорганізація остеонного шару, тріщини, базофілія країв центральних каналів остеонів; б) численні розширені пусті лакуни остеоцитів. Пусті та заповнені детритом судинні канали. 14 доба після гіпотермії. Зб. 400. Гематоксилін Вейгерта та еозин

стілки узуровані та виражено базофільні. Більша частина судин порожня або заповнена гомогенними розовими масами чи детритом (рис. 2 б). За даними В.В. Некачалова (2000), судини, «вростаючи» у кістку, «перфорують» її, сприяють спонгізації та зникненню кісткової речовини [8], що дає підставу стверджувати про наявність ознак васкулярного типу резорбції кістки в умовах дії гіпотермії.

#### ВИСНОВКИ

Під впливом легкої гіпотермії у кістковій тканині діафізу щурів відмічаються деструктивні зміни, котрі пов'язані з появою та збільшенням за терміном дослідження кількості остеоцитів із пікнотичними ядрами та порожніх лакун остеоцитів. Виявляється розширення лакун остеоцитів та діаметрів центральних каналів остеонів, деструкція кровоносних судин та їх запустіння. Порушується гістоархітектоніка діафізу, на що вказує зміна структури остеонного шару, дезорганізація остеонів. Описані зміни в остеоцитах та загалом в діафізі можна розглядати як один із механізмів розвитку остеопенічних порушень у кістковій тканині.

Перспективи подальшого розвитку. У подальшому є доцільним проведення досліджень структурної перебудови компактною кістки на ранні періоди після моделювання гіпотермії та у відновному періоді, а також дослідження губчастої кістки в аналогічних умовах. Доцільним є вивчення перебудови кісток у тварин різного віку з використанням електронно-мікроскопічного методу, що надасть можливість розкрити механізми розвитку деструктивних змін у кістках під впливом гіпотермії.

*Дослідження є фрагментом НДР «Вивчити механізми розвитку остеопенічних та остеопоротичних порушень скелету в умовах травматичного ушкодження довгих кісток» (№ держреєстрації 0111U000068)*

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Аврунин А.С. Остеоцитарное ремоделирование: история вопроса, современные представления и возможности клинической оценки/А.С. Аврунин// Травматология и ортопедия России. – 2012. – Т. 63, № 1. – С. 128–134.
2. Аврунин А.С. Медицинские и околomedические причины высокого внимания общества к проблеме потери костной массы. Анализ динамики и структуры публикаций по остеопорозу/А.С. Аврунин, Р.М. Тихилов, И.И. Шубняков//Гений ортопедии. – 2009. – № 3. – С. 59–66.
3. Бабак С.В. Изменения в структуре каналов и кровеносных сосудов бедренных костей крыс при снятии опорной нагрузки/С.В. Бабак//Укр. морфологічний альманах. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 5–7.
4. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс]/Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – (Міжнародний документ Ради Європи). – Режим доступу до документа: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=994_137).
5. Золотова-Гайдамака Н.В. Морфологические изменения в остеоцитах в условиях моделированной гипокинезии/Н.В. Золотова-Гайдамака, Н.В. Родионова//Укр. морфологічний альманах. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 66–68.

6. Золотова-Гайдамака Н. В. Морфологические особенности остеоцитов бедренной кости белых крыс при воздействии гипокинезии/Н. В. Золотова-Гайдамака, М. А. Исламова//Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 2, Т. 1. – С. 70–74.
7. Микроскопическая техника: Руководство/Под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. - М.: Медицина, 1996. - 544 с.
8. Некачалов В. В. Патология костей и суставов. Руководство/В. В. Некачалов. – СПб: Сотис, 2000. – 288 с.
9. Родионова Н. В. Цитологічні механізми перебудов у кістках при гіпокінезії та мікрогравітації. НВП Видавництво «Наукова думка» НАН України», 2006. – 238 с.
10. Ткач Г. Ф. Вікові особливості остеометричних показників скелета тварин в умовах впливу гіпергідратації організму/Г. Ф. Ткач//Український морфологічний альманах. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 101–104.
11. Bonewald L. F. The Amazing osteocyte/L. F . Bonewald//J. Bone Mineral Res. – 2011. – Vol. 26, № 2. – P. 229–238.
12. Hypothermia stimulates osteoklastogenesis but inhibits osteoblast differentiation and bone formation/J. Patel, I. Orriss, M. Key [et al.]/Done.- 2009.-Vol. 44. – № 2. – S. 305.
13. Hystological analysis of compact bone tissue in adult laboratory rats/M. Martiniakova, R. Omelka, B. Grosskopf [et al.]/Slovak. J. Anim. Sci. – 2009. – Vol. 42. – P. 56–59.
14. Motyl K. J. Temperatures rising: brown fat and bone/K. J. Motyl//Discov. Med. – 2011. – Vol. 11, № 58. – P. 179–185.