

Национальная академия медицинских наук Украины
Государственное учреждение «Институт патологии позвоночника и суставов
им. проф. М.И. Ситенко Национальной академии медицинских наук Украины»

На правах рукописи

ПОШЕЛОК ДЕНИС МИХАЙЛОВИЧ

УДК: 57.043 : 57.084.1–615.832.96 : 616.71

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ГИПОТЕРМИИ

(экспериментальное исследование)

(03.00.19 – криобиология)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель

д-р биол. наук, проф. Дедух Н. В.

Харьков-2014

СОДЕРЖАНИЕ

Список условных обозначений, символов, единиц, сокращений и терминов.....	4
Введение.....	5
Раздел 1. Моделирование и ремоделирование кости (аналитический обзор литературы)	15
1.1. Ремоделирование костной ткани.....	15
1.2. Структурно-метаболические особенности костной ткани в условиях действия гипотермии.....	25
Раздел 2. Материалы и методы исследования.....	40
2.1. Экспериментальная часть.....	40
2.2. Методы исследования.....	44
Раздел 3. Анализ температуры тела крыс разного возраста в процессе отработки методики моделирования легкой гипотермии	49
3.1. Анализ показателей температуры тела животных в начале эксперимента (утро) в течение 5 суток.....	49
3.2. Анализ температуры тела животных по суткам (1-5 сутки) и часам (начало, 1, 3, 5 часов) в течение эксперимента.....	51
3.3. Анализ показателей температуры тела животных в течение 7 суток после окончания холодого действия	54
Раздел 4. Ремоделирование губчатой кости после гипотермии.....	56
4.1. Влияние гипотермии на губчатую кость 6-месячных животных.....	56
4.1.1. Контрольные животные.....	56
4.1.2. Влияние гипотермии на губчатую кость 6-месячных животных.....	61
4.2. Изучение структурной организации губчатой кости 24-месячных животных после гипотермии.....	82
4.2.1. Контрольные животные.....	82

4.2.2.Состояние губчатой кости 24-месячных животных после гипотермии	87
Раздел 5. Структурная организация компактной кости крыс разного возраста после действия гипотермии.....	106
5.1. Особенности структурной организации компактной кости 6-месячных животных после действия гипотермии.....	106
5.2. Структурная организация компактной кости у 24-месячных крыс после гипотермии.....	134
Раздел 6. Исследование <i>in vitro</i> особенностей колониеобразования мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крыс после холодого воздействия.....	149
Раздел 7. Исследование минеральной плотности костной ткани, макро- и микроэлементов бедренной кости крыс после гипотермии...	156
7.1. Исследование минеральной плотности костной ткани у крыс различного возраста	156
7.2. Изучение макро- и микроэлементов бедренной кости 6-месячных крыс после гипотермии.....	157
7.3. Изучение макро- и микроэлементов бедренной кости 24-месячных крыс после гипотермии.....	160
Выводы	165
Список используемой литературы.....	170

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ, СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

СККМ	стромальные клетки костного мозга
КМ	костный мозг
гЭПС	гранулярная эндоплазматическая сеть
МСК	мезенхимальные стромальные клетки
Araf-1	apoptotic protease - activating factor - 1
Bcl-2	фактор антиапоптотического действия
ВМУ	комплекс клеток, включающий остеобласты, остеокласты, активные мезенхимальные клетки, а также капиллярные петли
BSU	костная структурная единица суммарной активности результатов ремоделирования
Cbfa1	связующий фактор альфа 1
M-CSF	колониестимулирующий фактор макрофагов
OPG	остеопротегерин
RANK	рецептор активатора ядерного фактора каппа-В
RANKL	лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа-В
Runx2	связующий транскрипционный фактор 2
TRPV	transient receptor potential vanilloid
цАМФ	циклический аденозинмонофосфат

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Распространенность костной патологии во всем мире – одна из основных медико-социальных проблем современности. Костная система активно взаимодействует с другими системами организма и в его составе реагирует на действие экзогенных и эндогенных факторов. На этапах жизнедеятельности костная ткань постоянно перестраивается. Это происходит путем ремоделирования, в основе которого лежат два взаимосвязанных процесса: резорбция (пазушная, остеокластическая и остецитарная) и костеобразование (в результате деятельности остеобластов) [10, 104].

Ремоделирование кости протекает по разным типам (физиологическое и патологическое). Для физиологического типа ремоделирования кости характерна потеря кальция до 1 % в год. При патологическом ремоделировании (когда преобладают процессы резорбции над костеобразованием) потеря кальция может составлять от 2 % и более, что приводит к уменьшению костной массы у людей пожилого и старческого возраста до 50 % [45, 51, 84].

На ремоделирование костной ткани влияет ряд факторов, среди которых гендерные особенности, активность метаболических процессов, эндокринный баланс организма, образ жизни человека [7, 19, 109, 119]. Костная ткань очень чувствительна к экзогенным негативным воздействиям (травма, различные вредные экологические факторы) поскольку она тесно связана с нервной, эндокринной, сосудистой и мышечной системами [60, 61, 84, 149]. Изучение особенностей ремоделирования кости в условиях действия различных неблагоприятных факторов является фундаментальной проблемой биологии и медицины.

Механизмы, лежащие в основе процессов ремоделирования костных структур и их взаимосвязь в ответ на действие различных экзогенных факторов, до настоящего времени остаются не выясненными. Нарушение взаимосвязи процесса ремоделирования кости, а именно – преобладание резорбции над костеобразованием приводит к возникновению остеопении и остеопороза –

метаболического заболевания, которое по распространенности занимает третье место после сердечно-сосудистых заболеваний и онкологии [54, 62].

Известно, что с возрастом метаболические процессы в организме замедляются [82]. Есть данные и о том, что у пожилых людей и стариков наблюдается снижение температуры тела (гипотермия) [117]. Сочетание этих двух факторов – замедление процессов метаболизма и хроническая гипотермия могут быть причиной различных нарушений в органах и тканях, в том числе и костной ткани [17, 18, 23, 102].

В литературе широко представлены исследования по влиянию гипотермии на особенности вентиляции легких, функцию головного мозга, периферические нервы, сердечную деятельность, кровообращение и кожу [31, 83, 88, 100, 102, 141, 146, 151]. Известны отдельные экспериментальные работы по изучению структурной организации суставного хряща в условиях действия гипотермии, где авторы доказывают, что общая глубокая гипотермия приводит к выраженным структурно-метаболическим изменениям в хондроцитах [21, 42, 120, 125]. Есть сообщения о действии локальной гипотермии на состояние костной ткани [16, 37].

Однако, практически, отсутствуют данные о влиянии общей гипотермии на морфо-функциональные характеристики костной ткани. Представлены единичные работы, где раскрывается негативное воздействие глубокой гипотермии на культивируемые клетки костного мозга и остеобласты [117, 158]. По разным причинам, во время некоторых видов производственной деятельности человек часто подвергается воздействию низких температур [46]. В связи с выше изложенным, изучение действия гипотермии на костную ткань является важным и актуальным.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа, выполненная на базе ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко НАМНУ», является составной частью исследований, выполняемых в рамках НИР. «Изучить механизмы развития остеопенических и остеопоротических нарушений скелета

в условиях травматического повреждения длинных костей» (№ госрегистрации 0111U000068) автором исследовано развитие остеопении у животных и выделены морфологические критерии нарушений. В рамках темы: «Изучить ремоделирования костной ткани тел позвонков и структурную организацию межпозвоночных дисков в условиях остеопороза, отягощенного воздействием неблагоприятных экологических факторов» (№ госрегистрации 011U003015) автором было выполнено моделирование гипотермии у животных, а также проведен морфометрический, денситометрический анализ костной ткани бедренной кости опытных животных, проведен анализ минерального состава компактной кости.

Цель исследования: раскрыть особенности ремоделирования костной ткани крыс разного возраста после индуцированной гипотермии на основе комплексных исследований.

Задачи исследования:

1. Раскрыть тенденции развития науки по проблеме влияния гипотермии на организм и структурно-метаболическую перестройку костной ткани по данным литературы.
2. Разработать экспериментальную методику моделирования легкой гипотермии у крыс 6- и 24-месячного возраста.
3. Изучить процессы ремоделирования губчатой кости у крыс разного возраста после индуцированной гипотермии, используя морфологические, морфометрические, ультраструктурные показатели.
4. Исследовать процессы ремоделирования компактной кости крыс разного возраста после индуцированной гипотермии, используя комплекс морфологических методов.
5. Проанализировать *in vitro* колониобразующую способность мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крыс разного возраста (6 и 24 месяца) после гипотермии.
6. Определить минеральную плотность костной ткани бедренных костей крыс разного возраста, а также минеральный состав (P, Ca/P, Mg, Zn, Fe, Cu)

компактного вещества бедренной кости крыс после индуцированной гипотермии.

Объект исследования: ремоделирование компактной и губчатой костей крыс после индуцированной гипотермии.

Предмет исследования: температура тела крыс в процессе моделирования гипотермии; морфология и ультраструктурная организация клеток и матрикса бедренной кости крыс разного возраста после гипотермии; структурная организация кровеносных сосудов бедренной кости крыс; морфометрические показатели ремоделирования губчатой и компактной костной ткани; колониобразующая способность стромальных клеток костного мозга крыс разного возраста после гипотермии, минеральная плотность костной ткани бедренной кости и микроэлементный состав компактного вещества бедренной кости крыс.

Методы исследования. В работе использованы следующие методы – морфологический, морфометрический, электронно-микроскопический, цитологический – для характеристики ремоделирования костной ткани; рентгеноспектральный флюоресцентный анализ – для определения макро- и микроэлементного состава компактного вещества бедренной кости крыс; денситометрический метод – для определения минеральной плотности костной ткани крыс; метод культуры клеток – для изучения колониобразующей способности стромальных клеток костного мозга крыс после гипотермии. Для верификации цифровых показателей использованы статистические методы.

Научная новизна полученных результатов. Впервые на большом экспериментальном материале (202 белые лабораторные крысы) проведено комплексное исследование структурной организации костной ткани у крыс разного возраста после холодового воздействия, которое привело к гипотермическому состоянию организма (снижение температуры тела у 6-месячных крыс на 2,29 °С, а у старых животных – на 4,04 °С). На основе результатов исследований сделано теоретическое обобщение, а также решена актуальная научная медико-биологическая задача по раскрытию особенностей

ремоделирования костной ткани в условиях общей легкой (по классификации J.S. Tuli, 2009) гипотермии.

Комплексность исследования (изучение структурных и ультраструктурных изменений клеток и матрикса компактной и губчатой костной ткани животных разного возраста, определение морфометрических показателей, характеризующих ремоделирование костной ткани, а также определение минеральной плотности и микроэлементного состава кости) влияния гипотермии на костную ткань 6- и 24-месячного возраста и, особенно, на ее ремоделирование существенно отличает данную работу от имеющихся в литературе.

Установлено различное влияние гипотермии на организм 6- и 24-месячных животных при изучении температуры тела в динамике при моделировании состояния гипотермии, а также в восстановительный период. Температура тела 6-месячных животных в течение холодого воздействия снижается на 2,29 °С, а у 24-месячных – на 4,04 °С. Восстановление температуры тела у 6-месячных животных происходит гораздо быстрее, чем у животных 24-месячного возраста: у 6-месячных животных – на третьи сутки после окончания эксперимента, а у животных 24-месячного возраста – на 6 сутки после гипотермии.

Доказано, что даже небольшое снижение (на 2-4 °С) температуры тела животных оказывает негативное воздействие на ремоделирование кости. Выраженные изменения в костной ткани и красном костном мозге, как у 6-и, так и 24-месячных животных были зафиксированы на 3-7 сутки после окончания гипотермии. В результате проведенных экспериментальных исследований дополнены научные знания о негативном влиянии гипотермии на состояние кровеносных сосудов кости и установлена интегративная связь нарушений сосудистого русла и костной ткани.

Получены новые знания о влиянии гипотермии на клетки костного мозга. Установлено, что в клетках красного костного мозга развиваются деструктивные изменения, особенно выраженные в мегакариоцитах, ядра в

которых были лизированы, а цитоплазма приобретала гомогенный вид. Впервые исследована колониобразующая способность стромальных клеток костного мозга крыс после гипотермии. Доказано, что гипотермия угнетает пролиферативную активность культивированных стромальных клеток костного мозга, что приводит к снижению количества клеточных колоний и их площадей. На основании проведенных исследований в культуре клеток и электронно-микроскопического анализа выявлено, что гипотермия снижает количество стромальных клеток в костном мозге и негативно влияет на остеогенные клетки-предшественники, что может быть одной из причин нарушения ремоделирования костной ткани.

Получены новые знания об ультраструктурном состоянии клеток костной ткани крыс обеих возрастных групп после гипотермии. Впервые доказано, что большинство остеоцитов, как на костных трабекулах, так и в кортексе, имели деструктивные изменения в цитоплазме и ядре. В цитоплазме остеоцитов зафиксировано присутствие очагов деструкции в виде гомогенных масс, лизис участков плазматической мембраны, низкая плотность слабо развитых мембранных органелл. В ядре остеоцитов отмечено формирование расширенных перинуклеарных пространств, заполненных тканевой жидкостью. Ядра остеоцитов были представлены преимущественно гетерохроматином, а в части остеоцитов отмечены электронно-плотные фрагментированные ядра, что указывает на их гибель путем апоптоза.

Дополнены знания об изменениях в митохондриях в условиях гипотермии, которые связаны с набуханием и просветлением матрикса, очаговым лизисом мембран и крист, а также формированием гигантских митохондрий. Отмеченные нарушения сказываются на энергетическом обеспечении клеток, что является одним из механизмов их деструкции и гибели..

Выявлено, что гипотермия вызывает гибель остеоцитов, что подтверждается наличием большого количества лакун без клеток. У опытных животных обеих возрастных групп количество пустых лакун на все сроки

наблюдения превышали показатели контрольных животных. Наблюдается явления остеоцитарного лизиса, что обуславливает достоверно выраженное расширение лакун остеоцитов. Площадь лакун остеоцитов у опытных животных, как 6-и, так и 24-месячного возраста на 28 сутки после гипотермии была большей, соответственно на 29,3 и 33,3 % по сравнению с показателями в контроле.

Впервые с помощью методов электронно-микроскопического анализа установлено, что гипотермия негативно сказывается на биосинтетической активности остеобластов, на что указывают значительные нарушения ультраструктурной организации гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС), митохондрий и структуры ядра.

Впервые проведен сравнительный анализ и получены новые знания о количественных показателях ремоделирования костной ткани у 6- и 24-месячных животных после легкой гипотермии. Доказано, что гипотермия вызывает изменения большинства морфометрических показателей, характеризующих ремоделирование костной ткани и приводит к дисбалансу процесса ремоделирования кости. Установлено, что площадь костных трабекул у опытных крыс 6-месячного возраста на 28-е сутки после гипотермии была снижена на 16 % по сравнению с контролем, а у 24-месячных животных – на 16,6 %. Количество остеоцитов на костных трабекулах у крыс 6-месячного возраста опытной серии была ниже, чем в контроле на 16,9 %, а численность пустых лакун без остеоцитов, наоборот, больше в 7,5 раза. У 24-месячных опытных животных количество остеоцитов на костных трабекулах было на 21,5 % меньше, а численность лакун без остеоцитов больше на 19,8 %, чем у 6-месячных крыс. После гипотермии у животных обеих возрастных групп были высокими показатели характеризующие резорбтивные процессы.

Впервые показано, что в условиях гипотермии у 24-месячных животных показатели численности полостей резорбции с остеокластами на 28 сутки после гипотермии превышают показатели опытных 6-месячных животных на 33,1 %. Наблюдаются значительные изменения в матриксе костных трабекул –

трещины, расслоение межклеточного вещества с визуализацией коллагеновых волокон.

Получены новые данные о том, что у 6-месячных животных, в отличие от крыс 24-месячного возраста, на 28 сутки после гипотермии, отмечается сдвиг процесса ремоделирования кости в сторону костеобразования, что связано с повышением на 46 % количества резорбтивных полостей, заполненных активными остеобластами и макрофагами, т.е. наблюдается преобладание процессов деструкции над костеобразованием. Полученные данные свидетельствуют о том, что у 24-месячных крыс имеет место дисбаланс процесса ремоделирования кости с преобладанием резорбтивных процессов.

Впервые установлено, что влияние гипотермии приводит к снижению показателей минеральной плотности костной ткани, а также доказано изменение минерального состава (P, Ca/P, Mg, Zn, Cu, Fe) кости в результате действия гипотермии, особенно выраженное на 14 сутки у 24-месячных крыс. Отмечено повышение показателей P – на 9,9 %, Mg – на 13,4 %, Fe – на 56,4 % и Cu – в 3,5 раза по сравнению с контролем. Отношение Ca/P наоборот снизилось на 8,4 %. У 6-месячных животных изменения были менее выраженными. На 28 сутки после гипотермии у 6-месячных животных минеральный состав кости, по определяемым микроэлементам, нормализуется – показатели макро- и микроэлементам не отличаются от контрольных. У крыс 24-месячного возраста содержание фосфора и магния превышают контрольные показатели на 11,3 % и на 9,3 %, а соотношение Ca/P – ниже показателей 6-месячных опытных животных на 14,9 %, т.е. у 24-месячных животных на 28 сутки не происходит полного восстановления микроэлементного состава, характерного для контрольных животных.

Практическая значимость полученных результатов. Результаты комплексного экспериментального исследования по изучению особенностей ремоделирования костной ткани крыс разного возраста после действия общей легкой гипотермии могут быть использованы в цикле лекций профильных кафедр ВУЗов, а также в практической медицине (криомедицине,

травматологии, ортопедии, стоматологии и ветеринарии) для прогнозирования неблагоприятных изменений в скелете и возможности восстановления в период реадаптации.

Личный вклад соискателя. Диссертант самостоятельно выполнил анализ литературных источников и написал литературный обзор. Он самостоятельно провел эксперименты по моделированию гипотермии у крыс, осуществлял температурный контроль организма крыс в период эксперимента. Принимал непосредственное участие в подготовке и выполнении эксперимента по изучению влияния гипотермии на состояние культивируемых стромальных клеток костного мозга. Диссертант принимал непосредственное участие в выполнении гистологического, ультраструктурного и цитологического анализов гистологических срезов костей и культивируемых клеток. Он самостоятельно выполнил морфометрические измерения определяемых показателей костной ткани и статистическую обработку полученных цифровых данных и их интерпретацию. Автором самостоятельно обобщены результаты исследований, сформулированы основные положения и обоснованы выводы.

Апробация результатов диссертации. Материалы исследования и результаты анализа фактического материала, основные положения и выводы диссертационной работы доложены на: научно-практической конференции «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології», Харьков, 2011; научной конференции «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины», Харьков 2012 г.; на 3-ем съезде Украинского общества клеточной биологии с международным представительством, Ялта, 2012 г.; IV симпозиуме «Морфогенез органів і тканин під впливом екзогенних факторів», Симферополь – Алушта, 2013 г.; научно-практической конференции с международным участием (для молодых ученых) «Актуальні проблеми сучасної ортопедії та травматології», Харьков – Снов'янка (Черниговской обл.), 2013г.; научно-практической конференции с международным участием «Вікові аспекти захворювань кістково-мязової системи», Харьков, 2014 г.; Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні дослідження в ортопедії та

травматології», Харьков, 2014 г.; XXXIII международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы», Новосибирск, 2014; на 4-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародною участю, Ужгород, 2014.

Публикации результатов исследований. Результаты диссертации отражены в 15 опубликованных научных работах, из них 6 – в научных журналах, которые входят в перечень ВАК Украины, а также 2 – в Российских изданиях, включенных в наукометрическую базу РИНЦ. По материалам диссертации получен патент Украины на полезную модель (№67527), 7 тезисов в материалах конференций и съездов.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 186 страницах машинописного текста и содержит введение, аналитический обзор литературы и разделы «Материалы и методы исследований», 5 разделов собственных, выводы и список литературы, который включает 159 источников, из которых 83 – иностранные. Работа иллюстрирована 9 таблицами, 124 рисунками, из них 123 микрофотографий

РАЗДЕЛ 1

МОДЕЛИРОВАНИЕ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТИ

(аналитический обзор литературы)

1.1. Ремоделирование костной ткани

Костная ткань – это динамическая ткань, форма и структура которой изменяются в течение жизни. Скелет человека выполняет важную функцию, связанную с поддержанием веса и устойчивости, защищает внутренние органы от повреждения, обеспечивает двигательный процесс в тесном взаимодействии с мышечной тканью. Кроме того, кость – первичное звено гемопоэза. Костная ткань также принимает участие в минеральном метаболизме и является важным компонентом иммунной системы.

Костная ткань представляет собой уникальный композит, состоящий из клеток, органического и минерального матрикса. Костеобразование осуществляется остеобластами. Остеобласты, замурованные в матрикс кости, превращаются в зрелую клетку – остеоцит, принимающую участие в обеспечении жизнедеятельности кости и минеральном обмене. В резорбции кости участвуют остеокласты, клетки не костного происхождения, предшественниками которых являются моноциты и макрофаги.

В жизненном цикле кости выделяют два процесса – моделирование и ремоделирование.

Моделирование кости. Формирование костных органов и их рост происходит благодаря процессу моделирования – это образование различных костей, составляющих скелет в соответствии с законом Вольфа [156], который сформулирован следующим образом: «Вследствие изменения первоначальной формы и под действием продолжительных нагрузок, либо только под действием продолжительных нагрузок, согласно математическим законам изменяется внутренняя архитектура кости что, как вторичный эффект, приводит и к изменению внешней формы», то есть структура, и форма костной ткани постоянно подстраиваются под существующие функциональные

нагрузки. При этом в процесс вовлекается оптимальное количество костной ткани, которое необходимо для построения костного органа. Это предотвращает либо повышенное, либо недостаточное костеобразование.

В результате моделирования изменяются размеры, пропорции и ориентация кости. Моделирование кости осуществляется за счет периостального и эндостального костеобразования, зон роста. Моделирование, в отличие от ремоделирования, продолжается до 20 летнего возраста [138]. После этого возраста ведущую роль играет ремоделирование кости.

Ремоделирование кости – это основной процесс перестройки костной ткани у взрослых. Под ремоделированием кости понимается резорбция, осуществляемая остеокластами, сопровождающаяся костеобразованием с участием остеобластов. Эти два процесса синхронизированы во времени, способствуют формированию костных структур и обеспечивают структурную адаптацию кости к изменению функции. Ежегодно ремоделированию подвергается 2-10 % скелета. В физиологических условиях процессы ремоделирования, протекающие в костной ткани, должны обеспечить как структурно-поддерживающую функцию скелета, репарацию микроповреждений, так и выполнение метаболической роли в минеральном гомеостазе. Выделяют несколько видов резорбции: клеточная (остеокластическая и остеоцитарная) и неклеточная, связанная с аутолитическим распадом, и сосудистая.

Костное ремоделирование происходит в локальных участках скелета и контролируется множеством локальных и системных факторов. Локальные факторы – это полипептидные факторы роста (инсулиноподобные факторы роста, трансформирующий фактор роста бета, фактор роста фибробластов, тромбоцитарный фактор роста и др.), цитокины (интерлейкины, фактор некроза опухолей, колониестимулирующие факторы), другие факторы (простагландины и др.) [64].

Системная (гормональная) регуляция также имеет большое значение. Кроме трех основных гормонов – паратиреоидный гормон, глюкокортикоиды и

кальцитонин, два из которых влияют на резорбцию, а кальцитонин выступает как стимулятор костеобразования, на костные клетки оказывают действие витамин Д, инсулин, гормон роста, эстрогены, андрогены, гормоны щитовидной железы. Вышеуказанные факторы вызывают экспрессию специфических генов и индуцируют соответствующие определенные метаболические изменения.

Дифференцировка остеобластов происходит при участии целого ряда генов – 1) *Cbfa1* (связующий фактор альфа 1) или этот ген определяют также как *Runx2* (связующий транскрипционный фактор 2) генов, экспрессирующих остеопонтин, остеокальцин, а также других белковых факторов, перечисленных выше [159]. Важную функцию выполняет и паратгормон, который связывается с рецепторами остеобластов и через сложную систему белковых факторов в клеточной сигнальной трансдукции – аденилатциклаза, фосфолипаза С влияют на цАМФ, протеинкиназы типа А и С, ионизированный кальций и диацилглицерин, что в целом приводит к стимуляции пролиферации остеобластов [64].

Процесс ремоделирования костной ткани происходит в несколько фаз [96, 106], при этом специфика структурной организации костной ткани накладывает свои особенности на процессы ремоделирования.

Цикл клеточного ремоделирования включает стадии: активация, резорбция, реверсия, формирование остеоида и его минерализация (рис. 2.1). Ремоделирование кости это комплексный процесс, основанный на координированной деятельности остеобластов, остеокластов и макрофагов.

Стадия активации клеток-предшественников остеокластов и зрелых остеокластов опосредована остеобластами [123, 138]. Прогресс в понимании процессов костного ремоделирования был достигнут с открытием цитокиновой системы RANKL – RANK – OPG [110, 138, 155], играющей ключевую роль в формировании, дифференцировке и активности остеокластов. Рецепторы RANKL (лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа-В) экспрессируются на поверхности клеток остеобластического дифферона и

стромальных клеток костного мозга, затем связываются с RANK-рецепторами (рецептор активатора ядерного фактора каппа-В) остеокластов или их клеток-предшественников (моноцитов/ макрофагов).

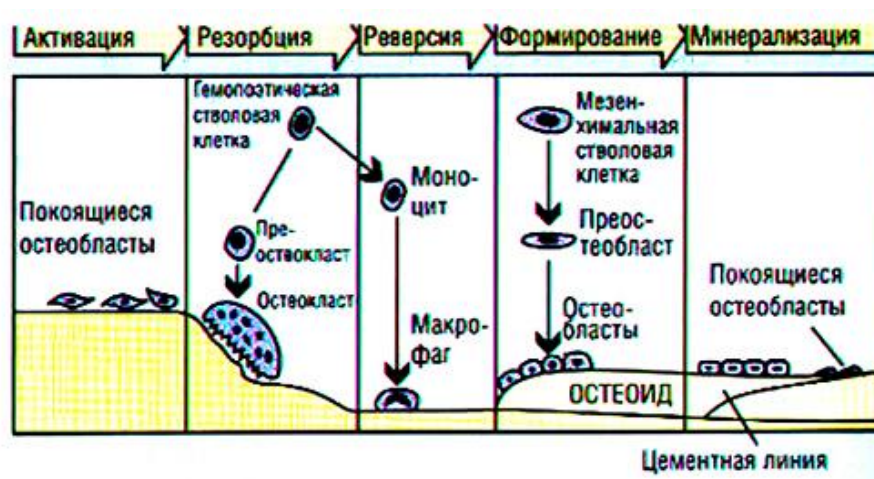


Рис.1.1. Цикл ремоделирования кости по Raisz L.G. (1988) [139].

Это приводит к формированию и активации остеокластов [80, 140], что сопровождается каскадом внутриклеточных трансформаций. Остеопротегерин (OPG) ингибирует связывание рецептора RANKL с RANK и, таким образом, угнетает формирование остеокластов, а также снижает их функциональную активность. OPG экспрессируется клетками остеобластического дифферона, клетками стромы, эндотелиальными клетками и лимфоцитами. Открытие этой системы стало краеугольным камнем для понимания патогенеза остеопороза, остеокластогенеза и регуляции костной резорбции, а также других процессов, вовлеченных в ремоделирование кости [63]. Паратгормон активирует остеобласты и их предшественники, стимулируя продукцию моноцит хемоаттрактантного белка-1, экспрессию рецепторов RANKL – индукторов остеокластогенеза и их активации, цитокинов.

Фаза резорбции. Резорбция кости осуществляется остеокластами. Формирование и активность остеокластов зависит от комплекса гормонов и цитокинов и др. факторов, которые активно изучаются. Контролируется этот процесс клетками остеобластического дифферона (см. выше). Остеокласты

секретируют матриксные металлопротеиназы под влиянием эндокринных и механических сигналов, которые разрушают неминерализованный остеоид, располагающийся на поверхности костных трабекул. Сигналы гибнущих остеоцитов способствуют активированию остеокластов и прикреплению их к поверхности кости гофрированной каемкой. Прикрепление остеокласта происходит при помощи рецепторов интегрина $\alpha_v\beta_3$, который связывается с коллагеном I типа, претерпевает конформационные изменения и выступает как индуктор, способствующий повышению уровня ионизированного кальция и рН, а также стимулирующий фосфорелирование по тирозину ряда протеинов, играющих важную роль в контакте остеокласта с внеклеточным матриксом [63]. В области прикрепления к поверхности кости остеокласта мембрана приобретает гофрированный вид, формируется «светлая зона», в которую поступают литические ферменты. Функция остеокласта заключается в резорбции локального участка кости.

Стадия реверсии (восстановления). После остеокластической резорбции в лакунах присутствуют фрагменты разрушенного не утилизованного органического матрикса. Мононуклеарные клетки, формирующиеся из гемопоэтической стволовой клетки, удаляют эти остатки, подготавливая поверхность кости для последующего формирования остеобластами. Эти клетки были определены как макрофаги. В настоящее время доказано существование нескольких популяций макрофагов, которые экспрессируют щелочную фосфатазу (Heinemann), моноцит + макрофаг антитело-2 и F4/80, являющихся маркером клеток-предшественников остеокластов, которые определены как остеомаксы (Kraal). Остеомаксы – резидентные макрофаги, располагающиеся на эндостальной и периостальной поверхностях кости, на костных трабекулах, при этом эти клетки формируют подобие навеса над лакуной, заполненной остеобластами. Характерной особенностью остеомаксов является звездчатая форма. В кости человека, эти клетки могут быть идентифицированы по экспрессии миелоидного маркера CD68. Они играют важную роль в развитии, гомеостазе и регенерации тканей [114].

Макрофаги экспрессируют металлопротеиназы разрушающие матрикс [134], остеопонтин, необходимый для минерализации остеоида [136]. На этом фоне продуцируются сигналы перехода от стадии резорбции к стадии формирования кости. В большинстве тканей макрофаги могут составлять от 10 до 15 %.

Стадия формирование кости. На этой стадии участок резорбции кости заполняется остеобластами. Природа сигналов, которые координируют этот процесс и направляют клетки, участвующие в формировании кости именно в локальные области резорбции, остается спорным. Известно, что ключевыми факторами, обеспечивающими движение клеток-предшественников в лауну резорбции, являются инсулиноподобный ростовой фактор 1 и 2, трансформирующий фактор роста фибробластов бета и другие сигнальные факторы [150]. Предполагают, что имеются и другие факторы, принимающие участие в механизме активирования остеобластов. К ним относят растворимые молекулы сфингозина-1 фосфата, клеточно заякоренный EphV4 и эфрин B2, экспрессируемые остеокластами. Считают, что сфингозин 1-фосфат, секретируемый остеокластами, индуцирует дифференцировку клеток-предшественников в остеобласты и их созревание.

Об остеогенном потенциале клеток, расположенных в резорбционной лакуне, свидетельствует экспрессия ими щелочной фосфатазы. При этом в клеточном составе резорбционной лакуны не выявляется реакция на маркер моноцитов и макрофагов – моноцит + макрофаг антитело-2, являющегося маркером клеток-предшественников остеокластов. В лакуне резорбции активно протекает биосинтез коллагена I типа, протеогликанов, гликолизированных белков, матричного белка GLA, остеокальцина, склеростина и липидов, входящих в состав межклеточного вещества остеоида. Скорость формирования остеоида и его объем в полости резорбции зависит от количества остеобластов, которые в ней располагаются.

В минерализации остеоида принимают участие матриксные везикулы, которые содержат щелочную фосфатазу, остеокальцин, кальций и др.

В минерализованном матриксе зрелые остеобласты теряют способность экспрессировать склеростин, они окружены лакуной и превращаются в остеоциты.

Концепция ремоделирования. На основе знаний, полученных при изучении стадийности ремоделирования, разработана концепция ремоделирования. Согласно этой концепции, ремоделирование кости (резорбции и формирования) происходит локально, в отдельных участках костей, где появляются группы клеток, которые называются "базисные многоклеточные единицы» (BMU) – комплекс клеток, включающий остеобласты, остеокласты, активные мезенхимальные клетки, а также капиллярные петли [108]. В норме в костной ткани имеет место четкая взаимосвязь и взаимозависимость процессов резорбции и восстановления. Новая костная ткань формируется лишь на тех участках, где имели место процессы резорбции.

Величина BMU у здоровых людей является постоянной по времени образования. С возрастом у человека изменяются следующие параметры: удлиняется время, требуемое на завершение образования одной единицы; уменьшается число новых BMU, которые формируются в единицу времени [96]. Это приводит к снижению интенсивности ремоделирования в физиологических условиях. Другая единица костного ремоделирования – это BRU, компонент перестраивающейся костной ткани. Суммарной активностью результатов ремоделирования является костная структурная единица (BSU). В случае компактной кости в качестве BSU выступает формирование вторичных остеонов. В губчатой кости BSU – замещение костной тканью полости резорбции занимает площадь 0,5-1 мм². Средняя скорость формирования новой костной ткани составляет около 1 мкм в день [106]. Время полного формирования BSU занимает от 3 до 5 мес.

Факторы, влияющие на ремоделирование. Ремоделирование кости в ответ на нагрузку происходит посредством механотрансдукции, процесса, посредством которого механические нагрузки преобразуются в биохимические

сигналы клеток [112]. Воздействие на костные структуры зависит от действующего фактора, продолжительности, величины и скорости нагрузки и осуществляется через тканевую жидкость. Циклически изменяющиеся нагрузки приводят к упругим деформациям кости и повышению давления во внутрикостных полостях, сосудистых каналах и canaliкулах [10, 12, 50]. Тканевая жидкость из областей высокого давления перемещается к области низкого давления, что способствует доставке питательных веществ к остецитам и удалению продуктов деградации. В качестве механосенсоров рассматривают остециты, которые регулируют ремоделирование путем передачи сигналов в другие клетки с помощью сигнальных молекул или путем прямого контакта с клетками (клетками-предшественниками остеобластов, остеобластами) посредством цитоплазматических отростков [86]. Кроме того, остеогенные клетки-предшественники могут дифференцироваться в остеобласты или остеокласты также через механосенсоры в зависимости от интенсивности нагрузки. При физической нагрузке цикл ремоделирования костной ткани смещается в сторону увеличения массы кости вследствие угнетения функции остеокластов и/или повышения активности остеобластов [89, 97]. Об этом свидетельствует увеличение в сыворотке крови уровня щелочной фосфатазы и остеокальцина, являющихся маркерами активности остеобластов [105].

На течение процесса «резорбция–костеобразование» в сторону повышения резорбции, влияет возраст пациента, образ жизни, вредные привычки (курение, алкоголь), гипокинезия, потребление кальция, белков, эндокринная и соматическая патология, генетические факторы и множество других факторов.

Основным структурным химическим элементом скелета является кальций. Он является основой оксиапатита и обеспечивает прочностные параметры кости. Выведение кальция из организма по различным причинам приводит не только к потере механических свойств костной ткани, но и нарушает баланс данного элемента в организме в целом [52].

Кальций является жизненно необходимым элементом. Почти каждой клетке, включая клетки сердца, нервов и мышц, необходим кальций для обеспечения нормальной жизнедеятельности. В человеческом организме кальций находится в трех основных местах: 1) в костях скелета (около 99 % наших костей являются для нас "резервуаром" кальция); 2) в клетках; 3) в крови. Именно кровью кальций доставляется в органы и ткани организма и именно в те места, где он необходим. Кости и зубы содержат более 90 % кальция, имеющегося в организме человека. Каждая кость скелета – это живая, активно функционирующая и непрерывно обновляющаяся структура. Кроме структурно-опорной функции (в составе костной ткани) кальций участвует в проведении нервного импульса, в нервно-мышечном сокращении, в работе системы свёртывания крови, тканевом дыхании, активирует ряд ферментов, обладает десенсибилизирующим (антигистаминным) действием

Фосфор является вторым, после кальция, по массе минеральным элементом в теле животных и человека. 85% фосфора, находится в костях. Фосфор участвует в формировании костей и зубов, входит в состав гидроксилапатита, играет важную роль в энергетическом обмене на клеточном уровне. Он – необходимый элемент ДНК, входит в состав многих белков.

Магний – второй, после кальция, наиболее распространенный элемент в теле человека. Одна треть скелетного магния распределена на поверхности кости и выполняет функцию депо. Магний является кофактором многих ферментов, а именно щелочной фосфатазы и пирофосфатазы, которые оказывают непосредственное влияние на формирование костной ткани. Значительные изменения концентрации магния влияют на секрецию гормонов паращитовидной железы. Дефицит магния приводит к замедлению роста кости, ускорению процессов резорбции, уменьшению объема кости и увеличению ее хрупкости, а повышенные концентрации магния угнетают процессы кристаллизации гидроксилапатита. Магний конкурирует в организме с кальцием и может замещать кальций в кристаллической решетке [9, 94].

Цинк является ингибитором ферментов цитохромоксидазы и каталазы, которые играют важную роль в повышении способности остеобластов синтезировать коллаген. Он проявляет ингибирующее влияние на паратгормон, который стимулирует процессы резорбции кости. Даже при низких концентрациях цинк замедляет функции остеокластов. Цинк положительно влияет на увеличение внутриклеточного содержания кальция, перераспределяет его уровень в цитозоле. Он также является активатором щелочной фосфатазы, участвует в регуляции секреции кальцитонина [68, 81, 101]. В литературе имеются данные о различном содержании цинка в костях скелета – позвонках, бедренной кости и большеберцовой костях крыс [41].

Медь играет важную роль в физиологии костной ткани. Она является коферментом многих ферментов костной ткани, принимает участие в каталитических реакциях ряда ферментных систем в остеогенных клетках, способствуя поддержанию уровня дифференциации [9]. Также известна роль меди в энергетическом транспортном механизме между апатитом и коллагеном, она принимает участие в процессах синтеза коллагена, в процессах образования гидроксилapatита, препятствуя деминерализации костной ткани [27].

Железо, хотя и не является структурным элементом костной ткани, играет важную роль в процессах остеогенеза. Железо входит в состав цитохрома, выполняющего функцию электронного переноса в процессе дыхания. При его недостатке в цитохрооксидазе возникает ингибирование дыхательной цепи митохондрий остеобластов, в результате чего нарушается пролиферация и дифференцировка остеобластов [43]. Железо влияет на стабилизацию гидроксилapatита в остеоидной субстанции, Оно является кофактором для пролил- и лизилгидроксилазы, которые принимают участие в формировании коллагена костной ткани. Дефицит данного микроэлемента может приводить к повышению пористости кости, ухудшению ее биомеханических характеристик [48, 68, 76, 121].

Выявлено, что средне выраженные изменения локального рН или продолжительная гипоксия также нарушают процессы ремоделирования кости

в сторону повышения резорбции, в то время как умеренная кратковременная гипоксия стимулирует пролиферацию остеобластов и их биосинтетическую активность [113, 118].

В качестве фактора, повышающего костеобразование, выступает гипертермия. Под ее воздействием в культивированных остеобластах снижается экспрессия RANKL рецепторов, активирующих остеокласты, но биосинтез OPG остеобластами соответствует норме [131]. Нарушение баланса между RANKL и OPG оказывает отрицательное влияние на процессы ремоделирования кости за счет ингибирования процесса резорбции.

Нарушение ремоделирования костной ткани может происходить при различных заболеваниях костной системы. Наиболее распространенным является остеопороз. Так, при остеопорозе, вызванном длительным приемом глюкокортикоидов, костеобразование снижено, а резорбция повышена, при постменопаузальном остеопорозе костеобразование может быть в норме, однако резорбция значительно превышает этот показатель, при болезни Педжета – костеобразование намного выше резорбции, при остеопетрозе на фоне высокого костеобразования значительно снижены процессы резорбции [51]. Оба процесса – резорбция и костеобразование тесно связаны между собой. Дисбаланс этих процессов – усиление резорбции на фоне снижения костеобразования способствует снижению массы кости, что является фактором риска развития остеопении и остеопороза.

В целом, поиск факторов, нарушающих синхронный механизм ремоделирования, является актуальным, как в плане профилактики, так и лечения заболеваний костной системы.

1.2. Структурно-метаболические особенности костной ткани в условиях действия гипотермии

Многочисленными исследованиями установлено, что физиологические и морфологические изменения в организме после воздействия холодного фактора зависят от его интенсивности и продолжительности [4, 11, 28, 30, 36,

103, 147]. Холод умеренной интенсивности положительно влияет на организм человека. Однако несовершенство методов его использования при лечении пациентов, чрезмерное воздействие в естественных условиях могут привести к глубоким морфологическим изменениям не только в отдельных органах, но и организме в целом. В литературе широко представлены данные об особенностях вентиляции легких под влиянием гипотермии, об исследованиях функции головного мозга, периферических нервов, иммунной системы, сердечной деятельности, кровообращения и воздействия на кожу [6, 31, 83, 88, 100, 102, 141, 146, 151]. Однако, несмотря на распространенность исследований действия холодового фактора на организм человека, вопрос действия гипотермии на костную ткань изучены недостаточно.

Общие представления о гипотермии и ее влияние на организм.

Гипотермия (*от греч. – hуро «внизу», therme «тепло»*) – состояние организма человека, при котором внутренняя температура тела достигает 35 °С и ниже (а у животных – ниже 37 °С), в результате чего нарушается обмен веществ и функционирования систем организма.

В литературе существует несколько классификаций гипотермии. По данным Н.Е. Мищук (2006) и Marx John (2006) гипотермию, в зависимости от уровня температуры тела, классифицируют как легкую 32-35 °С, умеренную (28-32 °С), тяжелую (28-20 °С) и глубокую (< 20 °С) [40, 129]. М.С. Безух (1982) выделяет поверхностную (35-32 °С), умеренную (32-27 °С) и глубокую (ниже 27 °С) гипотермию [8]. К.Р. Lee (2002) разделяет гипотермию на 5 типов: слабую (33-36 °С), умеренную (28-32 °С), глубокую (10-20 °С), абсолютную (5-10 °С) и ультраабсолютную (0-5 °С) гипотермию [98]. М. Mallet (2002) классифицирует гипотермию как легкую (32-35 °С) и тяжелую < 27-28 °С [127]. Несколько иные температурные параметры при классификации гипотермии у животных представил J.S. Tuli (2009), основываясь на температуре тела животных: слабая (30-32 °С), умеренная (22-25 °С) и тяжелая (ниже 22 °С) [154]. В некоторых исследованиях авторы классифицируют гипотермию по-другому [116, 132, 152].

Различают первичную и вторичную гипотермию [90]. Первичная гипотермия развивается у здоровых людей под влиянием неблагоприятных внешних условий (достаточных по интенсивности для снижения внутренней температуры тела). Вторичная гипотермия возникает как осложнение в результате заболевания [40, 127]. На развитие гипотермии у человека влияет множество факторов, в том числе – социально-экономические, фармакологические, внешней среды, наличие заболеваний и старение. Проблема гипотермии особенно актуальна для пожилых людей. В проведенном M. Mallet (2002) исследовании пациентов с различными заболеваниями у 85 % из них наблюдалась легкая гипотермия (температура до 35 °С). Эти пациенты были старше 60 лет [127]. По данным J.J. Patell (2012) у 10 % людей из популяции практически здоровых англичан старше 60 лет зафиксировано снижение температуры тела до 35,5 °С [116].

С возрастом температура тела снижается в связи с уменьшением способности организма вырабатывать тепло (по разным причинам), снижением активности термогенеза в бурой жировой ткани, сужением периферических сосудов [92, 116]. В исследовании M.D. Aisha (2013) также показано, что способность поддерживать внутреннюю температуру тела в физиологических пределах снижается с возрастом [132]. Замедляются с возрастом и метаболические процессы в организме, что было зафиксировано N. Meunier (2005) при исследовании показателей метаболизма у пожилых людей [82]. Старение характеризуется неравномерным изменением обмена веществ и энергии, что приводит к снижению адаптационных возможностей организма. В первую очередь это обусловлено изменениями в процессе синтеза белков [111]. При этом уменьшается количество метаболически активных белков и возрастает масса метаболически инертных белков. Определяются также специфические изменения в обмене углеводов и липидного обмена, что обусловлено снижением активности отдельных ферментов, нарушением окислительных процессов в обмене липидов, накоплением в тканях перекисей липидов. Обмен веществ снижается и в результате переохлаждения.

В частности, в работе К. Wong (1983) было установлено, что снижение температуры тела на 1°C сопровождается уменьшением общего метаболизма на 6 % (определено по данным снижение потребления кислорода) [157]. Снижаются белковый, углеводный и другие виды обмена. Отмечается также замедление и основного (базального) метаболизма [95, 127]. В условиях гипотермии нарушается дыхательная функция крови и окислительные процессы. Меняется кислотно-щелочное равновесие. Сочетание этих двух факторов – замедление процессов метаболизма с возрастом и хроническая гипотермия может быть причиной различных нарушений в органах и тканях, в том числе и тканях опорно-двигательной системы.

Известно, что с возрастом замедляются и процессы ремоделирования костной ткани, что было установлено при изучении остеометрических показателей скелета у крыс старческого возраста (20 месяцев) [69]. С возрастом у людей, как и у животных, наблюдается замедление процессов ремоделирования костной ткани и преобладание процессов резорбции над костеобразованием, что сопровождается развитием остеопенических и остеопоротических нарушений [51, 54].

Общая глубокая гипотермия приводит к выраженным структурно-метаболическим изменениям в суставном хряще. В условиях действия гипотермии наблюдается пикноз ядер хондроцитов, лизис отдельных участков цитоплазмы, редукция ЭПС и аппарата Гольджи, разрушение крист митохондрий, деструкция органелл цитоплазмы. Отмечаются деструктивные изменения и в коллагеновых волокнах – отек и демаскирование [21, 42, 125, 153]. Есть работы, где сообщается о действии локальной гипотермии на состояние костной ткани [16, 37, 152]. Однако работ, в которых бы освещались результаты исследований влияния общей гипотермии на морфо-функциональные характеристики костной ткани, мало.

Влияние гипотермии на культивируемые клетки. В культуре клеток можно смоделировать действие температурных параметров, которые соответствуют условиям гипотермии, что наблюдается у людей и животных.

Действие гипотермии (на протяжении 14-16 суток культивирования) при температуре 35,5 и 34 °С (автор относит такие температурные параметры к легкой и умеренной гипотермии), было изучено в культуре остеобластов (полученные из свода черепа новорожденных крысят) и остеокластов (полученных в культуре с остеокласт-формирующих нуклеарных клеток костного мозга мышей 6-8-недельного возраста) [116]. Установлено, что холодное воздействие указанных температур тормозит пролиферацию и дифференциацию остеобластов. Количество остеобластов в культуре после 14 суток культивирования и действия умеренной гипотермии (34 °С) снизилось на 30 %.

В литературе имеются данные, что под влиянием гипотермии (32 °С) в культуре фибробластов нарушается митотический цикл за счет удлинения фазы G1 [142]. J. Patel и соавт. [116] предполагают, что другим механизмом подавления пролиферативной активности остеобластов может быть нарушение функции рецепторов TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid) каналов, так как именно остеобласты экспрессируют различные рецепторы этих каналов (TRPV2 и TRPV4). TRPV каналы выступают как температурные сенсоры клеток [132]. Однако это предположение требует доказательных исследований. Известно, что уменьшение пула остеобластов может приводить к редукции формирования кости. Так, при 35,5 °С формирование остеобластами костных узелков (при культивировании в течение 16 суток) уменьшалось на 75 %, а при температуре 34 °С – на 95 %. В культивируемых остеобластах наблюдалось также снижение биосинтеза щелочной фосфатазы, остеокальцина и коллагена I типа.

При культивировании мононуклеарных предшественников остеокластов на дисках из слоновой кости с добавлением M-CSF (колониестимулирующий фактор макрофагов) и RANK – специфический стимулирующий фактор процесса дифференцировки остеокластов, установлено [116], что количество остеокластов была значительно больше в культурах после действия как легкой (35 °С), так и умеренной (34 °С) гипотермии при сравнении с контрольной

культурой. Увеличенной была и площадь резорбции дисков, на которых культивировали моноклеарные предшественники остеокластов, что свидетельствует о дифференцировке и активации остеокластов. Более выраженные изменения в культурах наблюдались при использовании температуры 34 °С. Количество остеокластов и лакун резорбции увеличилось в 1,5 и 2,0 раза. Авторы подчеркивают, что полученные результаты свидетельствуют о том, что гипотермия может негативно влиять на ремоделирование кости у пожилых людей за счет активации процесса резорбции.

В отличие от приведенных данных, по активизации в условиях гипотермии остеокластогенеза, S. Meghji и соавт. [131] установили, что в условиях культивирования остеобластов (клеточная линия остеобластов MG63) в течение суток (при температуре 33 °С) отмечено повышение биосинтеза остеопротегерина, в то время как экспрессия рецепторов RANKL оставалась на том же уровне, то есть создавались условия для подавления активации остеокластов.

Влияние короткой (12 и 24 часов) и пролонгированной (в течение 3 и 5 суток) гипотермии (27 °С) на культуру остеобластов человека было исследовано по таким показателям, как: пролиферация клеток, экспрессия мРНК, кодирующей остеоонектин (SPARC – белок) и биосинтез клетками остеоонектина [77]. Авторы установили, что при действии короткой (до 24 часов) гипотермии остеобласты в культуре были метаболически активными и сохраняли пролиферативную активность. Увеличение времени действия гипотермии до 5 суток значительно снижало экспрессию мРНК остеоонектина, содержание самого белка и подавляло пролиферацию клеток.

В культуре остеобластов человека (линии NHObst) исследовали действие легкой (35 °С) и тяжелой (27 °С) гипотермии на клетки и важный компонент цитоплазмы – цитоскелет [132]. Определяли также активность щелочной фосфатазы, содержание остеокальцина и белков. Авторы установили, что при действии гипотермии 35 °С в течение 12 часов остеобласты оставались

жизнеспособными и биосинтетически активными, хотя отмечалось слабое повышение интенсивности флуоресценции актиновых волокон цитоскелета клеток, принимающих участие в двигательной активности клеток и клеточных органелл. После действия на клетки остеобластического дифферона тяжелой (27 °С) гипотермии в течение 72 часов наблюдались более выраженные (по сравнению с действием легкой гипотермии) изменения в структуре цитоскелета. Актиновые волокна, которые характеризовались интенсивной флуоресценцией, были локализованы вокруг ядра, в то время как в норме они располагаются равномерно по цитоплазме и проявляют слабую флуоресценцию. Тубулиновые структуры (микротрубочки) реагировали на гипотермию в меньшей степени. Кроме того, наблюдалось снижение активности щелочной фосфатазы и остеокальцина, а также экспрессии CD44 (поверхностного клеточного гликопротеина, который играет важную роль в адгезии и миграции клеток).

В другом исследовании этих же авторов было установлено, что при холодовом воздействии (температура 35 °С) в течение 24 часов на культивируемые остеобласты, наблюдали незначительное увеличение (на 3,54 %) количества апоптозных клеток [135]. В условиях холодового воздействия (температура 27 °С) в течение этого же времени отмечено снижение на 56,7 % биосинтеза остеобластами белков и увеличение на 13,2 % количества апоптозных клеток.

Апоптоз – контролируемый процесс самоуничтожения клетки. Морфологическими проявлениями апоптоза является конденсация ядерного гетерохроматина и сморщивание клетки с сохранением целостности органелл. Клетка распадается на апоптозные тельца, представляющие собой мембранные структуры с остатками органелл и частицами ядра. В дальнейшем апоптозные тельца фагоцитируются и разрушаются путем лизиса макрофагами [103]. Большинство молекулярных механизмов апоптоза на сегодняшний день не раскрыты. Однако установлено, что в зависимости от стимулов, инициирующих апоптоз, выделяют два главных внутриклеточных апоптозных сигнальных

каскадов: путь через «рецепторы смерти» и митохондриальный путь. Митохондрии являются ключевым звеном в передаче сигнала при апоптозе, связанного с повреждением ДНК при действии на клетку различного рода факторов, в том числе и при гипотермии [78, 124]. При нарушении целостности мембраны из митохондрий выходит ряд белков. Цитохром С в комбинации с фактором Араф-1 (apoptotic protease-activating factor-1) и прокаспазой 9 образует каспазу 9, которая активирует каспазу 3. В митохондриях существует и некаспазный путь, который приводит к апоптозу.

На внешней мембране митохондрий локализовано большое количество белков семейства Bcl-2, в состав которого входят промоторы (Bax, Bid и Bik) и ингибиторы (собственно Bcl-2 и Bcl-XL) апоптоза. От соотношения активности этих белков зависит состоится апоптоз или нет. Особую роль играет белок Bcl-2 как фактор антиапоптотического действия. В норме он закрывает митохондриальные поры, препятствуя высвобождению цитохрома С. Один из белков семейства Bcl-2, промотор апоптоза Bid, может связывать рецепторный и митохондриальный пути [126].

При исследовании кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток [115, 137] было установлено, что непродолжительная гипотермия ингибирует начальные процессы апоптоза, подавляя активацию каспаз и активируя антиапоптотические белки, такие как Bcl-2. Это положительно влияет на сохранение структурной организации и функций митохондрий. При этом снижается перегрузка возбуждающих трансмиттеров (transmitters). В то же время длительная тяжелая гипотермия приводит к гибели клеток. Можно предположить, что подобный механизм апоптоза присущ и клеткам костной ткани при действии легкой гипотермии. В исследовании Stefanovich et al. (1995) установлено, что тяжелая гипотермия приводит к выраженному нарушению клеточного гомеостаза ионов и, в дальнейшем, влияет на изменение текучести клеточных мембран [99]. При этом происходит нарушение взаимосвязи между активными и пассивными процессами мембранного транспорта (в первую очередь ионов Na^+ и K^+), что приводит к повышению содержания цитозольного $[\text{Na}^+]$ и деполяризации

мембран, открытию вольтаж-зависимых Ca^{2+} каналов, быстрому накоплению Ca^{2+} и начала фосфолипидного гидролиза мембран, что приводит к необратимому повреждению клеток [87].

В связи с тем, что в исследованиях, выполненных в культуре клеток, были получены данные о влиянии гипотермии различной интенсивности на клетки, участвующие в ее ремоделировании (остеобласты и остеокласты), представляется целесообразным рассмотреть действие гипотермии на состояние клеток (их пролиферативную активность, ультраструктурную организацию, особенности метаболизма) кости на уровне организма, а также на структурную организацию матрикса костной ткани.

Исследование влияния гипотермии на кость. Механизм действия гипотермии на костную ткань до сих пор не раскрыт. Существуют лишь предположения на этот счет. Показано, что при низкотемпературном воздействии на организм происходит активация свободно-радикального окисления липидов [28, 39, 74]. Авторы считают, что именно их избыток в организме при холодовом стрессе, приводит к нарушениям гормональной регуляции, увеличению жесткости мембран клеток, уменьшению их подвижности. Избыток продуктов перекисного окисления липидов, как утверждает В.П. Казначеев (1993), усиливает лабильзацию лизосомальных мембран, что усугубляет воздействие стрессорного повреждения [3]. Вышеуказанные механизмы могут приводить к деструктивным изменениям в клетках кости и самой костной ткани (расширение просветов сосудистых каналов и центральных каналов остеонов, появление значительного количества пустых лакун остеоцитов, увеличение количества резорбционных полостей, заполненных остеокластами) [16, 66, 49].

Состояние костной ткани анализировали как в условиях холодового действия – без определения температуры тела, так и в условиях гипотермии различных режимов, с определением температуры тела.

Незначительное количество исследований влияния гипотермии на кость касаются, в основном, изучения макро- и микроэлементного состава кости,

нарушений структуры ее отдельных компонентов и определения некоторых метаболических показателей, характеризующих биосинтетическую активность остеобластов. Так, изучали влияние длительного холодого действия (крысы в течение 14 и 30 суток находились в климатокамере при температуре 15 °С по 3 часа ежедневно) на содержание Са, Fe и Mg в костной ткани черепа крыс [30]. Температуру тела животных не измеряли. По нашему мнению, использование такого режима холодого действия безусловно приводит к состоянию гипотермии. Концентрацию микроэлементов определяли на 14 и 30 сутки. Установлено, что влияние длительного холодого действия значительно увеличивает концентрацию микроэлементов (железо, кальций, магний) в ткани подопытных животных по сравнению с интактной группой. Так, на 14 сутки концентрация железа была выше исходного уровня на 164,4 %, а на 30 сутки – она несколько снизилась и составила 72,81 % от показателей у интактных крыс. Концентрация магния на 14 сутки была на 34,54 % выше исходного, однако на 30 сутки наблюдалось снижение его содержания на 10,28 % ниже начального. На 14 сутки отмечено некоторое повышение концентрации кальция на 12,45 % от исходного, а на 30 сутки уровень кальция в костной ткани достоверно снижался на 13,02 % по сравнению с исходными показателями.

Действие холодого стресса исследовали в динамике (через 7, 15, 21, 50 и 90 суток) при оценке состояния бедренной кости хомяков, находившихся в холодной камере при 5 °С [148]. Контрольных животных содержали при температуре 27 °С. После 90 дней холодого стресса было обнаружено значительное количество резорбционных полостей заполненных остеокластами, а также расширение просвета центральных каналов остеонов.

В экспериментах, выполненных Р. Patterson-Buckendahl (1995) на крысах при их охлаждении (холодовая камера –8 °С в течение 1,5 часа (ежедневно) в течение 3 недель, наблюдалось снижение на 21,8 % уровня остеокальцина в плазме крови по сравнению с контролем, что указывает на подавление

биосинтетической активности остеобластов и снижение темпа перестройки матрикса кости, поскольку остеокальцин накапливается в матриксе [142].

Статистически достоверное снижение активности щелочной фосфатазы и содержания аннексина V выявлено в пульпе зуба крыс, которые были подвержены холодовому воздействию путем ежедневного (10 мин.) погружения в холодную воду (4 °C) в течение 30 дней, по сравнению с контрольными животными [13]. Авторы предполагают, что уменьшение содержания аннексина V в пульпе зуба может быть причиной угнетения транспорта ионов Ca^{2+} , что влечет за собой снижение уровня минерализации. В другом исследовании также установлено, что процессы минерализации происходят при участии аннексина V и щелочной фосфатазы [53].

В экспериментальном исследовании A. Riesenfeld (2005) авторы изучали воздействие гипотермии, которая была индуцирована путем плавания крыс в холодной воде (температура 8 °C) по 10 минут в течение 10 дней [144]. После окончания эксперимента через 7 суток зафиксировано достоверное уменьшение толщины кортикального слоя длинных костей крыс.

Наряду с исследованиями, которые выполнялись на животных без патологии, известны работы, в которых оценивали действия гипотермии в условиях индуцированного нарушения метаболизма костной ткани, а именно остеопороза. У животных с экспериментальным остеопорозом (путем овариоэктомии, как модели постменопаузальных нарушений у женщин) изучали холодовое действие (принудительное плавание крыс в холодной воде (8 °C) по 5 мин. в течение 7 дней), на обмен кальция и его выведение из кости [91]. Авторы установили, что у крыс с остеопорозом, подвергшихся холодовому действию, значительно повышается содержание в плазме крови кортикостероидов, тироксина и тиреотропного гормона по сравнению, как с контрольными крысами, так и животными с овариоэктомией, но без холодового действия. Выявлено снижение (в среднем на 31,8 % по сравнению с крысами с овариоэктомией, но без холодового действия) транспорта Ca^{2+} через слизистую оболочку кишечника, статистически значимое снижение активности щелочной

фосфатазы и кальций зависимой АТФ-азы (Ca^{2+} -АТФазы). В плазме крови опытных крыс (после холодого действия) показатели активности щелочной фосфатазы и концентрация Ca^{2+} были значительно выше при сравнении с контрольными крысами и с овариоэктомированными крысами, но без холодого действия. Авторы [91] делают вывод о негативном влиянии холодого действия на костную ткань в условиях дефицита эстрогенов.

Структурную организацию кости и ее метаболизм, а также транспорт кальция и ферментов слизистой оболочки кишечника (ЩФ и Ca^{2+} -АТФаза), изучали у крыс с смоделированным остеопорозом (как указано в [91]) в условиях холодого действия различной интенсивности: умеренной 15 °С и тяжелой 4 °С (по определению автора), смоделированной принудительным плаванием крыс в холодной воде по 5 мин в течение 7 дней [122]. Установлено, что умеренное холодое действие существенно не влияло на указанные метаболические показатели экспериментальных животных. В условиях тяжелого холодого действия наблюдали значительное уменьшение активности щелочной фосфатазы и Ca^{2+} -АТФазы по сравнению с контролем (крысы с смоделированной овариоэктомией, но без холодого действия) и опытными крысами после умеренного холодого действия. Отмечено также активацию резорбтивных процессов в костной ткани и уменьшение минеральной плотности кости. На активацию резорбции кости указывает значительное повышение в моче показателей экскреции фосфора и кальция, а также отношение кальция к креатинину по сравнению с контрольными животными.

Итак, под влиянием гипотермии (в результате холодого действия, развиваются не только морфологические и метаболические нарушения в клетках и матриксе кости, но и целый ряд негативных изменений в параосальных тканях, что может влиять на состояние костной ткани. Так, изучению микроциркуляторного русла мышечной ткани у крыс посвящена работа А.С. Дмитренко (2003). Исследовали действие гипотермии, которую моделировали путем однократного содержания крыс в холодной камере до

снижения ректальной температуры до 15 °С [20]. Через 1, 3 и 7 суток после действия гипотермии было установлено, что в эти сроки наблюдается уменьшение просветов микрососудов и гемокапилляров мышечной ткани вследствие отека и выраженной деструкции эндотелиальных клеток. Определялось также расширение венул. Авторы предполагают, что обнаруженные изменения в микроциркуляторном русле могут влиять на состояние костной ткани, в связи с развитием в ней гипоксии. В норме микроциркуляторное русло кости обеспечивает метаболическое равновесие в костной ткани, в условиях которого синхронно протекают процессы костеобразования и резорбции. Это способствует физиологическому ремоделированию костной ткани без изменения ее количества. Микроциркуляторное русло кости поддерживает парциальное давление кислорода в тканевой жидкости и выполняет функцию доставки питательных и регуляторных веществ к клеткам. Известно, что костеобразование может происходить только при наличии кислорода, то есть деструктивные изменения в микроциркуляторном русле кости сопровождаются нарушением процесса дифференциации клеток-предшественников в остеогенном направлении, угнетением метаболизма клеток кости (остеоцитов, остеобластов), задержкой процессов регенерации кости и нарушением процесса ремоделирования.

T. Sunagawa (2005) в эксперименте на 5-недельных крысах установил, что после 6-часовой умеренной гипотермии в микроциркуляторном русле эпифизов длинных костей наблюдаются значительные ишемические нарушения, сопровождающиеся выраженными дистрофическими изменениями в хондроцитах всех зон эпифизарного хряща [145]. Отмечается пикноз ядер хондроцитов, уменьшение количества хондроцитов в колонках, расслоение хрящевого матрикса между колонками хондроцитов.

Гипотермия может быть вызвана не только холодовым действием окружающей среды, но и действием некоторых медикаментозных препаратов. При гипотермии (33,5 °С) вызванной у мышей внутрибрюшным введением резерпина течение 4-х суток, было зафиксировано увеличение количества

микронуклеарных (диаметр ядра $< \frac{1}{4}$ диаметра цитоплазмы) клеток в костном мозге. Авторы связывают указанное явление с нарушением механизмов митотического аппарата клетки [79]. Отмеченные изменения в клетках костного мозга могут быть причиной уменьшения количества клеток предшественников остеобластов, что в свою очередь, может приводить к снижению костеобразования.

Таким образом, в представленных исследованиях относительно действия гипотермии на костную ткань, выполненных, как в культуре клеток, так и на уровне организма, установлено, что механизм действия гипотермии сложный. Гипотермия влияет как непосредственно на кость, нарушая ее структурно-метаболические характеристики, изменяя микроэлементный состав, минеральную плотность, так и опосредованно, провоцируя системные нарушения в организме: антиоксидантной системы, баланса гормонов, кровоснабжения и др.

Под действием гипотермии в костной ткани зафиксированы значительные нарушения ультраструктурной организации остеобластов. Отмечено повышение остеокластогенеза и снижение остеобластогенеза, что способствует активизации резорбции кости. Снижение остеобластогенеза может быть связано как с уменьшением количества стромальных клеток костного мозга, которые могут дифференцироваться в остеогенном направлении, так и нарушением фаз митоза в остеобластах.

В клетках кости нарушаются также и метаболические процессы. В остеобластах снижается биосинтез щелочной фосфатазы и остеокальцина, который является составной частью органического матрикса кости. Меняется уровень мембранных гликопротеидов, ответственных за адгезию клеток, снижается содержание Ca^{2+} -АТФазы, что приводит к накоплению кальция в клетках, и способствует их гибели. Доказано четкая связь между снижением биосинтеза клетками остеопротогерина и повышением активности остеокластов.

Однако в литературе практически не представлена информация об особенностях структурных изменений компактной и губчатой кости, перестройке костного матрикса, ультраструктурной организации остеоцитов и остеокластов, микроциркуляторного русла кости, клеток костного мозга. Не исследовано влияние гипотермии на структуру костной ткани животных разного возраста, а также на ее ремоделирование.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины» (сертифицированная лицензия от 28.12.2011г. до 28.12.2014г., № 009445, серия МЗ Министерства здравоохранения Украины).

2.1. Экспериментальная часть

Экспериментальные, морфологические и морфометрические исследования выполнены в лабораториях: экспериментального моделирования (заведующая – к.б.н. Малышкина С.В., свидетельство об аттестации № 100-3699/2010 от 19 июля 2010 до 18 июля 2014 г.) и морфологии соединительной ткани (заведующая – д.б.н., проф. Дедух Н.В., свидетельство об аттестации № 101-3699/2010 от 19 июля 2010 до 18 июля 2014 г.).

Работа выполнена на 101 6-месячной нелинейной белой крысе – самцах популяции экспериментально-биологической клиники (ЭБК) ГУ «ИПХС им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины» и 101 24-месячной крысе по возрастной классификации В.И. Западнюка [33].

Животные всех серий в начале исследования находились на стандартном пищевом рационе и содержании, то есть в соответствии с «Санитарными правилами создания, оборудования и содержания экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 06.04.1973 г. и дополнений от 04.12.1978 г. в приказ МЗ «О нормах питания животных и продуценты». В период акклиматизации (неделю) и во время эксперимента (кроме периода моделирования гипотермии) животные находились в ЭБК при температуре 18-22 °С, влажности 50-60 % , при естественном световом режиме «день-ночь» [44]. Подбор животных и формирование групп проводили по методу «случайных чисел» [35, 72].

Целью экспериментальных исследований (*in vivo*) было изучение процессов ремоделирования костной ткани крыс после действия гипотермии.

Моделирование легкой гипотермии выполняли путем содержания крыс в течение 5 суток в холодильной камере ($t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) по 5 часов ежедневно (начиная с 10 часов утра). Крысы находились в отсеках камеры по одной. Эксперимент проводили в осенний период. Ректальную температуру в процессе отработки методики моделирования гипотермии измеряли каждые сутки в начале эксперимента и каждый час, в течение 5 часов холодого воздействия.

После отработки методики моделирования гипотермии температуру тела у животных измеряли перед началом эксперимента (утром) и в конце (после 5 часов пребывания крыс в холодильной камере), а также в течение 7 суток после холодого воздействия. Использовали медицинский электронный термометр (МТ-3001), который позволяет измерять температуру тела от 32 до $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ с точностью до $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. В норме у крыс температура тела равна $38,5\text{-}39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ [33]. Контрольные животные в процессе моделирования гипотермии содержались в одиночку в аналогичных (опытным крысам) отсеках, но при комнатной температуре. Температуру тела у контрольных животных измеряли аналогично опытным. После окончания эксперимента контрольные и опытные крысы находились в обычных (которые описаны выше) условиях ЭБК на стандартном рационе питания.

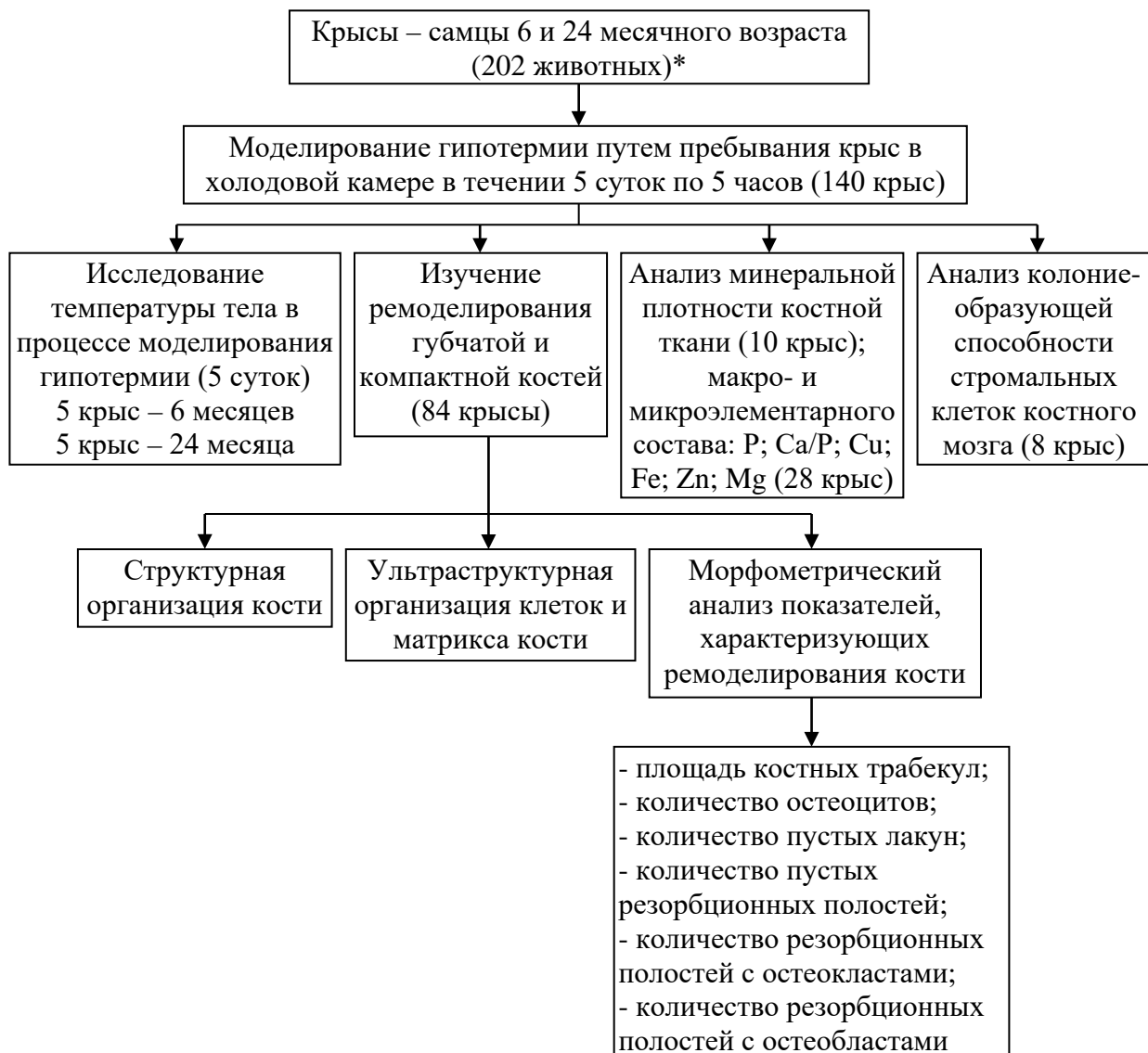
Дизайн эксперимента представлен на рис. 2.1.

По окончании срока наблюдения животных с использованием тиопентала натрия выводили из эксперимента на различные сроки (1, 3, 5, 7, 14 и 28 суток в зависимости от поставленной задачи эксперимента) после последнего сеанса холодого воздействия.

Исследования (*in vitro*) выполнены в культуре клеток костного мозга крыс после гипотермии (на 7-е и 28-е сутки), с целью изучения особенностей выживания стромальных клеток костного мозга (СККМ) и возможности образовывать ими клеточные колонии. Морфологически СККМ – это фибробластоподобные веретеновидные клетки, находящиеся в фазе G_0

клеточного цикла и составляющие митотический резерв соединительной ткани, мобилизуемый для физиологической и репаративной регенерации.

Дизайн эксперимента



*В состав указанных животных входит 62 контрольных крыс, которые не подвергались холодovому воздействию. Бедренные кости контрольных животных анализировали по представленной схеме.

Рис. 2.1. Схема дизайна эксперимента.

Для выполнения данного исследования в условиях стерильности отделяли эпифизы бедренной и большеберцовой костей крыс (контрольные и опытные – после действия гипотермии) и с помощью шприца раствором Хенкса вымывали содержание костномозговой полости. Клетки КМ осаждали путем центрифугирования (1000 об/мин., 10 мин), затем осадок отмывали в растворе Хенкса с повторным центрифугированием и ресуспендированием в среде ДМЕМ (Sigma) с добавлением 20 % сыворотки крови эмбрионов телят (Sigma) до получения клеточной суспензии. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева [38].

Высевали клетки в пластиковые флаконы для культивирования адгезивных культур (Falcon) из расчета $1,5 \times 10^6$ клеток на 1 см^2 и культивировали в одинаковых условиях (температура $37 \text{ }^\circ\text{C}$, газовая смесь из 5 % содержанием CO_2 , влажность 95 %) с добавлением в питательную среду (ДМЕМ (Sigma) культур 2 мМ L-глутамин, 20 % фетальной бычьей сыворотки, а также 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина. Через 24 часа культивирования среду с не прикрепившимися клетками сливали и промывали культуральный флакон трижды раствором Хенкса. К флакону с прикрепившимися клетками добавляли свежую культуральную среду и продолжали культивировать до 12 суток. Питательную среду меняли каждые последующие 3 суток.

В процессе культивирования клетки стромы костного мозга образуют колонии, число и размеры которых зависят от исходного состояния клеток.

На 12-е сутки питательную среду сливали, клетки промывали фосфатным буфером, фиксировали фиксатором Май-Грюнвальда и окрашивали азур – эозином по Романовскому. Культуры клеток исследовали в микроскопе MICROS (Austria).

В культуре клеток определяли такие показатели:

1) количество образованных клеточных колоний в препарате (об. $\times 4$).
Анализировали пять препаратов с культурой клеток. Подсчитывали крупные колонии (не менее 15-20 клеток в колонии);

- 2) площадь колоний (мкм²) (об. ×20);
- 3) состояние клеток в колониях.

Биоэтика. Эксперименты на крысах проводили с соблюдением требований гуманного отношения к подопытным животным, регламентированных Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» и Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [22, 57]. Протокол экспериментов на животных и соответствие проведенных научных исследований требованиям биоэтики утверждены Комитетом по биоэтике ГУ «ИПХС им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины» (протокол № 88 от 30.05.2011 г.).

2.2. Методы исследования

Денситометрический – для исследования минеральной плотности костной ткани бедренных костей крыс. Минеральную плотность определяли на костном денситометре Explorer QDR (Hologic). Денситограмма проведенного исследования представлена на рис. 2.2. Область измерения включала диафизарные и эпизарные отделы бедренной кости. Минеральная плотность выражалась в г/см². Сравнительный анализ контрольных животных и животных после холодового воздействия проводили на 28-е сутки.

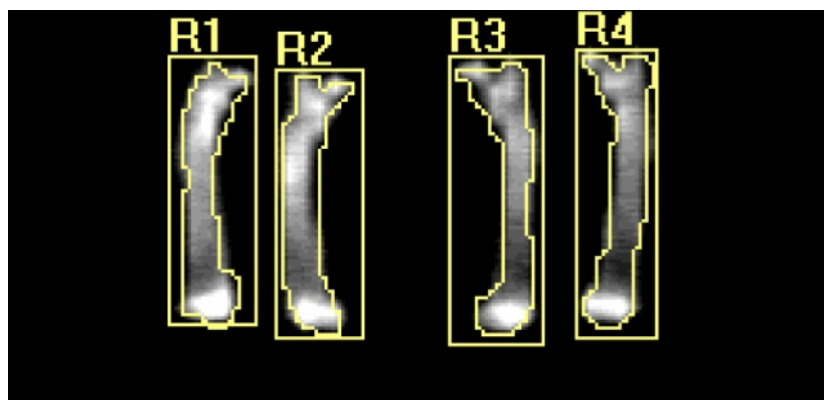


Рис. 2.2. Денситограмма бедренных костей крыс.

Рентгеноспектральный флуоресцентный анализ – для определения макро- и микроэлементов в диафизах бедренной кости крыс, Для этого фрагменты диафиза бедренных костей 6- и 24-месячных крыс были тщательно очищены от мышечной ткани, промыты в этиловом спирте и высушены до постоянного веса при температуре 105 °С. Рентгеновские спектры с фрагментов диафиза снимали на энергодисперсионном спектрометре «Спрут» (пр-ва ООО «Укррентген, Украина) с SDD-детектором X-123 (пр-ва Amptek, США). Для возбуждения рентгеновской флуоресценции атомов пробы и наблюдения комптоновского рассеяния [93] применялся многослойный излучатель Ti/Mo [56]. Флуоресценцию переизлучателя возбуждали первичным спектром трубки БС-22 с анодом прострельного типа. Такая рентгенооптическая схема позволяла полностью устранить фон рассеянного сплошного спектра и обеспечивала пределы обнаружения на уровне $0,0001 \div 0,001$ % мас ($1 \div 10$ ppm) для химических элементов с номером $Z \geq 12$ (Mg). Время накопления спектра от 600 до 1200 сек.

Массовую долю химических элементов определяли по интенсивности их флуоресцентного излучения методом градуировочной функции [59]. Стандартными образцами служили: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – гидроксиапатит, а также многокомпонентные пробы с аттестованными значениями концентраций MgO, P_2O_5 , Fe, Cu, Zn.

Исследования проведены на 28 крысах 6- и 24-месячного возраста в контроле и опыте на 28-е сутки после гипотермии (по 7 животных в группах).

Гистологические методы. Для гистологического и морфометрического исследований выделяли бедренные кости крыс (опытных и контрольных) и отделяли диафизы и метафизы, а для электронно-микроскопического исследования – фрагменты диафиза и метафиза.

Обработку фрагментов бедренных костей для гистологического исследования проводили по стандартным методам, руководствуясь рекомендациями Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перовой – фиксация в 10 % растворе нейтрального формалина, декальцинация – в 5 % растворе азотной кислоты,

обезвоживание – в растворах этилового спирта возрастающей крепости (от 60 ° до 96 °) и в растворе смеси этилового спирта с диэтиловым эфиром (1:1), с последующим уплотнением в жидком и густом целлоидине парами хлороформа и заключением в целлоидин [65].

Поперечные срезы диафиза и продольные срезы метафизов (6-10 мкм) изготавливали на санном микротоме "Reichert", окрашивали гематоксилином Вейгерта и эозином, а также пикрофуксином по Ван-Гизон. Исследование гистологических срезов проводили в световом микроскопе Axiostar Plus (Austria), (ок. 10, об. 10; 20 и 100), а фотографирование – с помощью цифрового фотоаппарата «EOS 300 D».

Морфометрические методы. Морфометрический анализ проводили с помощью светового микроскопа «Axiostar Plus (Austria), (ок. 10, об. 4; 10; 20 и 100) с окулярным винтовым микрометром МОВ-1-16× и квадратно-сетчатой окулярной вставкой Г.Г. Автандилова (289 точек – пересечений квадратов, общей площадью 64 мм²). Анализировали 3 центральных поперечных среза диафиза и 3 продольных среза дистального метафиза бедренных костей от каждого животного. При выполнении работы руководствовались рекомендациями Г.Г. Автандилова [2], В.Г. Ковешникова и соавт. [29] и П.А. Ревелл [58]. В костной ткани крыс оценивали следующие параметры:

- объем костной ткани (костные трабекулы и костный мозг) оценивали на площади 25 мм² (ок. 10, об. 10) в пяти полях зрения микроскопа («Axiostar Plus») на трех препаратах (n = 15);
- объем трабекулярной кости (отношение объема костных трабекул к объему костной ткани умноженное на 100%);
- количество лакун с остеоцитами и пустых лакун в поле зрения микроскопа («Axiostar Plus») (ок. 10, об. 40);
- площадь лакун остеоцитов (при измерении окуляр-микрометром МОВ-16× малой и большой оси лакуны).
- количество пустых резорбционных полостей на костных трабекулах на площади 25 мм² (ок.10, об.10);

- количество резорбционных полостей на костных трабекулах, содержащих остеокласты на площади 25 мм² (ок.10, об.10);

- количество резорбционных полостей на костных трабекулах, содержащих остеобласты и макрофагами на площади 25 мм² (ок.10, об.10).

В каждом отдельном случае анализировали пять полей зрения на каждом срезе.

Морфологические, морфометрические и электронно-микроскопические исследования выполнены на 114 крысах-самцах: 30 контрольных (по 15 животных – 6- и 24-месячного возраста) и 84 опытных крысах-самках (по 42 животных 6- и 24-месячного возраста).

Электронномикроскопический метод. Для ультраструктурного исследования губчатой и компактной костей выделяли дистальный метафиз и участок диафиза бедренной кости. Изъятый фрагмент кости разрезали на кусочки размером ≈ 1 мм³ и обрабатывали по стандартному методу электронной микроскопии в соответствии с рекомендациями Б. Уикли (1975) [71]: префиксация в 5 % фиксаторе Карновского, декальцинация (для минерализованных тканей) в 3,7 % растворе трилона Б, дополнительная фиксация в 1 % растворе оксида осмия (OsO₄), обезвоживание в растворах этилового спирта возрастающей крепости (от 50° до 96°) и в ацетоне, заключение в смесь эпоксидных смол эпона и аралдита.

Полутонкие (1-2 мкм) и ультратонкие срезы (0,05-0,09 мкм) изготавливали с помощью стеклянных ножей на ультрамикротоме УМПТ-3М. Дифференциальное окрашивание полутонких срезов проводили 1% раствором метиленового синего и 1% раствором основного фуксина. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом по методу E.S. Reynolds (1963) [143]. Ультраструктурные анализ проводили в трансмиссионном электронном микроскопе ЭМВ-100БР (ув. 3000-35 000).

Статистический анализ. Результаты подвергали статистической обработке с проверкой равенства рядов и исключением случайных значений с последующей статистической обработкой рядов по Фишеру-Стьюденту с

вычислением среднеарифметических значений и среднеквадратических ошибок с применением программного пакета Microsoft Excel. В дальнейшем, значение рядов и их средне квадратичные ошибки сравнивали между собой с определением коэффициента Стьюдента и коэффициента достоверности различий Р. Различия между рядами признавались достоверными при $P < 0,05$ [34].

РАЗДЕЛ 3

АНАЛИЗ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА В ПРОЦЕССЕ ОТРАБОТКИ МЕТОДИКИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЛЕГКОЙ ГИПОТЕРМИИ

Для изучения влияния гипотермии на костную ткань мы моделировали состояние легкой гипотермии у крыс, путем их содержания в холодильной камере. В литературе мы не встретили работ по изучению изменения температуры тела в динамике у животных при моделировании состояния гипотермии.

Цель данного раздела – изучить температуру тела у крыс 6- и 24-месячного возраста в процессе моделирования состояния гипотермии.

Анализировали следующие температурные показатели контрольных и опытных крыс:

- *начальную* температуру тела животных в контроле и опыте на протяжении эксперимента (утром, по суткам);
- температуру тела опытных животных *в течение эксперимента* (1, 2, 3, 4, 5 сутки) и *по часам* (начало, через 1, 3 и 5 часов);
- температуру тела опытных животных обеих возрастных групп в течение *7 суток после окончания эксперимента*.

3.1. Анализ показателей температуры тела животных в начале эксперимента (утро) в течение 5 суток

В результате анализа **показателей температуры** тела животных в начале эксперимента было установлено, что у 6-месячных животных температура тела составляла $38,09 \pm 0,31$ °С и была достоверно ($p < 0,001$) выше на 2,0 °С чем у животных 24-месячного возраста ($36,09 \pm 0,29$ °С).

У *6-месячных животных* в контроле показатели температуры тела в начале эксперимента (по утрам, 1-5 сутки) статистически достоверно не изменялись (рис. 3.1). Средние показатели температуры тела составили в

контроле – $37,75 \pm 0,25$ °С. У опытных животных наблюдалось достоверное снижение температуры тела в начале эксперимента (утром) на 4-е и 5-е сутки. По сравнению с первыми сутками снижение температуры составило 1,26 и 1,53 °С (рис. 3.1). Средние показатели температуры тела 6-месячных опытных крыс – $37,33 \pm 0,21$ °С.

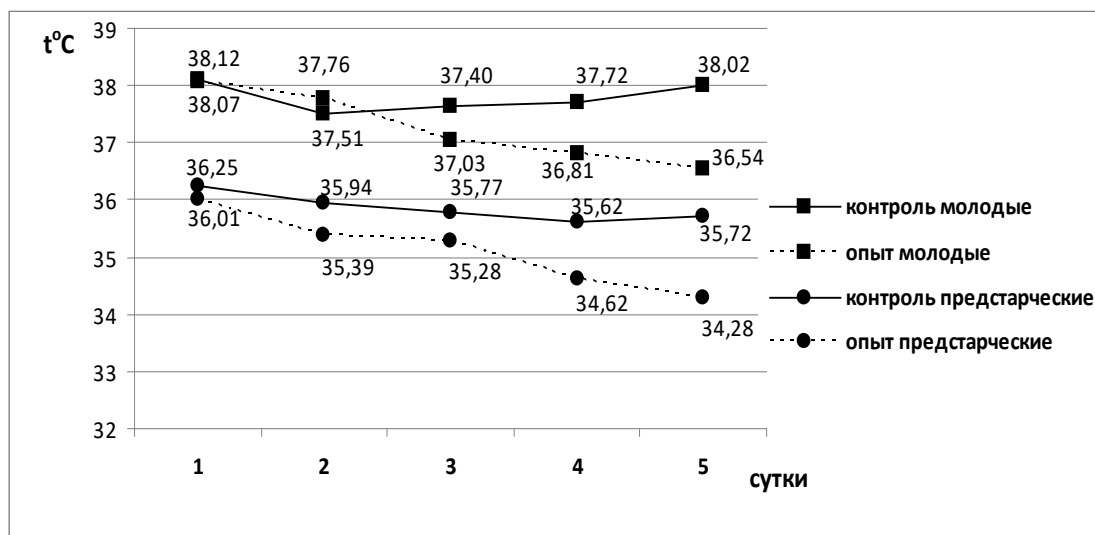


Рис. 3.1. График показателей температуры тела у 6- и 24-месячных животных в начале эксперимента по суткам (1-5 сутки).

У животных 24-месячного возраста контрольной группы температура тела в начале эксперимента составляла $36,25 \pm 0,32$ °С, а на 5 сутки – $35,72 \pm 0,24$ °С, т.е. температура тела в течение эксперимента достоверно не изменилась.

При анализе показателей температуры тела в начале эксперимента (утром) у 24-месячных *опытных животных*, были обнаружены статистически достоверные отличия от контрольных животных и от 6-месячных опытных крыс на 1-е и 5-е сутки. Так, в отличие от контрольных и опытных 6-месячных животных, температура тела 24-месячных животных в опыте достоверно значимо ($p < 0,01$) снизилась от $36,01 \pm 0,22$ °С до $34,28 \pm 0,25$ °С.

Средние показатели температуры тела 24-месячных животных в контроле составили – $35,86 \pm 0,11$ °С, а в опыте – $35,11 \pm 0,28$ °С. Снижение начальной

температуры тела отмечено у 24-месячных животных, в отличие от 6-месячных, на 3 сутки и оно составило – 0,73; 1,39 и 1,73 °С, соответственно в начале 3-х, 4-х и 5-х суток.

Результаты исследований указывают на то, что как у 6-месячных крыс (с 4-х суток), так и у крыс 24-месячного возраста (после 3-х суток) холодого воздействия не происходит полного восстановления температуры тела за время отсутствия холодого воздействия.

3.2. Анализ температуры тела животных по суткам (1-5 сутки) и часам (начало, 1, 3, 5 часов) в течение эксперимента

Анализ показателей температуры тела у крыс 6-месячного возраста по суткам, а также через 1 и 3 часа (после холодого воздействия) не выявил достоверных изменений (табл. 3.1).

Лишь после 5 часового холодого воздействия, начиная со 2-х суток, зафиксировано постепенное снижение температуры тела, которое было достоверным по сравнению с начальными показателями температуры тела на соответствующие сутки. Так, температура тела через 5 часов на 2-е, 3-и, 4-е и 5-е сутки снизилась на 1,25; 1,47; 0,93 и 0,76 °С, соответственно.

Таблица 3.1

Показатели температуры тела ($M \pm m$, °С) 6-месячных крыс опытной группы

Сутки	Длительность холодого воздействия			
	Начало эксперимента	1 час	3 часа	5 часов
1	38,07 ± 0,17	37,75 ± 0,34	37,93 ± 0,31	37,62 ± 0,22
2	37,76 ± 0,27	37,21 ± 0,29	36,78 ± 0,33	36,51 ± 0,28 P < 0,05
3	37,03 ± 0,31	37,03 ± 0,32	36,41 ± 0,23	35,56 ± 0,29 P < 0,05

Сутки	Длительность холодого воздействия			
	Начало эксперимента	1 час	3 часа	5 часов
4	36,81 ± 0,22 P2 < 0,05	36,95 ± 0,38	36,51 ± 0,24	35,88 ± 0,23 P < 0,05
5	36,54 ± 0,23 P2 < 0,01	36,41 ± 0,43	36,04 ± 0,25	35,78 ± 0,21 P < 0,01 P1 < 0,05

Примечания:

1. P – статистически значимое различие с началом эксперимента в соответствующие сутки исследования.
2. P1 – статистически значимое различие с показателями температуры тела крыс на начало эксперимента (первые сутки).
3. P2 – статистически значимое различие с началом эксперимента в первые сутки.

Показатели температуры тела через 5 часов после начала холодого воздействия на 5 сутки были достоверно ниже на 1,84 °C (P < 0,05) показателей температуры тела через 5 часов на 1 сутки.

Снижение температуры тела на 5 сутки, относительно показателей температуры тела на начало эксперимента, составило 2,29 °C, что указывает на развитие легкой гипотермии у 6-месячных крыс.

Анализ показателей температуры животных 24-месячного возраста в опытной группе, проведенный *по суткам*, показал, что в отличие от 6-месячных животных, с увеличением времени холодого воздействия (от первых до пятых суток) наблюдается достоверное снижение (см. табл. 3.2) температуры тела уже через 1 час после начала эксперимента.

Показатели температуры тела ($M \pm m$, °C) 24-месячных крыс опытной группы

Сутки	Длительность холодого воздействия			
	Начало эксперимента	1 час	3 часа	5 часов
1	$36,01 \pm 0,22$	$34,59 \pm 0,55$ P < 0,05	$33,23 \pm 0,26$ P < 0,001	$32,47 \pm 0,18$ P < 0,001
2	$35,39 \pm 0,28$	$34,24 \pm 0,40$ P < 0,05	$33,56 \pm 0,36$ P < 0,001	$33,28 \pm 0,29$ P < 0,01
3	$35,28 \pm 0,32$	$33,87 \pm 0,33$ P < 0,05	$33,01 \pm 0,23$ P < 0,001	$33,04 \pm 0,24$ P < 0,001
4	$34,62 \pm 0,29$	$33,82 \pm 0,27$ P < 0,05	$33,21 \pm 0,24$ P < 0,01	$32,76 \pm 0,18$ P < 0,001
5	$34,28 \pm 0,31$ P1 < 0,05	$33,57 \pm 0,23$ P < 0,05	$32,73 \pm 0,31$ P < 0,05	$31,97 \pm 0,29$ P < 0,001

Примечания:

1. P – статистически значимое различие между показателями начальной температуры тела с показателями через 1, 3 и 5 часов;
2. P1 – статистически значимое различие между показателями температуры тела первых и пятых суток.

Через 3 и 5 часов снижение температуры тела у животных продолжалось. Так, температура тела животных 24-месячного возраста через 1, 2, 3 и 4 суток снизилась на 3,54; 2,11; 2,24 и 1,86 °C, соответственно. Через 5 суток снижение показателей температуры тела по сравнению с начальной температурой на 5 сутки составило 2,07 °C, а по сравнению с началом эксперимента (1 сутки) температура снизилась на 4,04 °C, что было в 1,84 раза больше, чем у 6-месячных животных.

3.3. Анализ показателей температуры тела животных в течение 7 суток после окончания холодого действия

Ежедневное измерение температуры тела опытных 6-месячных животных опытной группы в течение 7-и суток после окончания эксперимента показало, что температура тела нормализуется, т.е. достигает первоначальных показателей уже на третьи сутки после окончания эксперимента – $37,58 \pm 0,31$ °C (рис. 3.2). Через 7 суток после окончания эксперимента она составила – $38,21 \pm 0,34$ °C, что указывает на отсутствие достоверных отличий от показателей начальных температур на первые и последние сутки эксперимента.

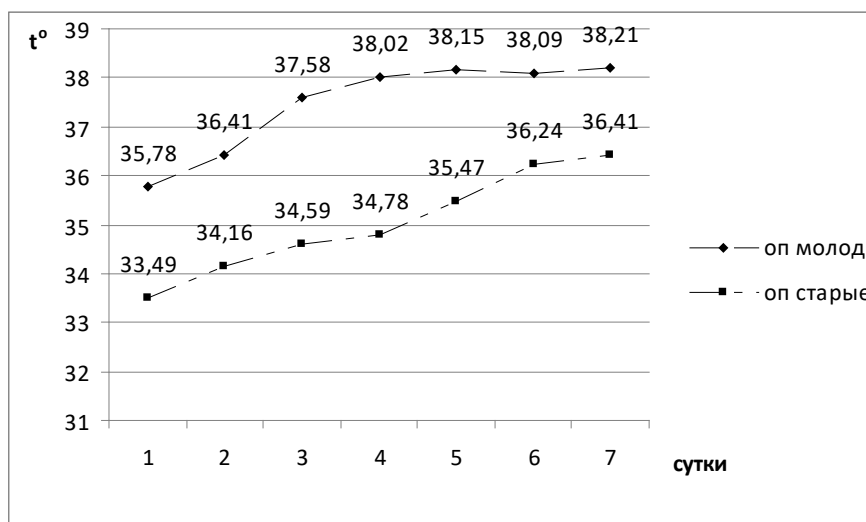


Рис. 3.2. График изменений температуры тела 6- и 24-месячных животных после окончания холодого действия.

В отличие от этого, у 24-мес. животных восстановительный период продолжался до 6 суток. На первые сутки после окончания эксперимента температура тела опытных крыс составила $33,49 \pm 0,31$ °C и затем постепенно повышалась ($36,24 \pm 0,35$ °C), достигнув показателей на начало эксперимента лишь на 6-е сутки (рис. 3.2).

Полученные данные по показателям температуры тела у опытных животных 24-месячного возраста после окончания холодого воздействия

указывает на то, что состояние терморегуляции у данных животных отличается от 6-месячных и, в отличие от 6-месячных животных, не обеспечивает быстрого восстановления температуры тела.

Итак, в процессе эксперимента установлено, что температура тела животных 24-месячного возраста на начало эксперимента была достоверно ниже, по сравнению с 6-месячными на 2,0 °С. Холодовое воздействие в течение 5 часов на протяжении пяти суток вызывает у крыс, как у 6-и, так и у 24-месячного возраста, состояние гипотермии. Более выраженное действие холода проявляется на организм 24-месячного возраста, о чем свидетельствует статистически достоверное снижение (на 4,04 °С) температуры по сравнению с начальной температурой тела у 24-месячных крыс, чем у 6-месячных, у которых снижение температуры тела составило – 2,29 °С. Установленные отличия у 6-месячных крыс и крыс 24-месячного возраста, очевидно, связаны с изменением процесса терморегуляции у 24-месячных животных. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы по изучению влияния гипотермии на человека. Так, было показано, что способность поддерживать внутреннюю температуру тела в физиологических пределах снижается с возрастом [132]. M. Mallet (2002) при исследовании пациентов с гипотермией (легкая гипотермия – температура до 35 °С) выявил, что у 85 % человек был возраст старше 60 лет [127]. С возрастом температура тела снижается в связи с уменьшением способности организма вырабатывать тепло (по разным причинам), снижением активности термогенеза в бурой жировой ткани, сужением периферических сосудов [92, 116].

Таким образом, пребывание крыс в холодной камере (–20 °С) в течение 5 суток по 5 часов ежедневно приводит к развитию у них состояния гипотермии. Тяжесть гипотермии у животных 6- и 24-месячного возраста различная. Температура тела 6-месячных животных снижается на 2,29 °С, а у крыс 24-месячного возраста на 4,04 °С. Восстановление температуры тела у 6-месячных животных происходит гораздо быстрее, чем у крыс 24-месячного возраста: у 6-месячных – на третьи сутки после окончания эксперимента, а у 24-месячных крыс – через 6 суток после окончания холодого воздействия.

РАЗДЕЛ 4

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ ГУБЧАТОЙ КОСТИ ПОСЛЕ ГИПОТЕРМИИ

Одной из актуальных проблем биологии и медицины является изучение влияния гипотермии на организм. Это связано с тем, что индуцированная гипотермия используется в клинических условиях, чтобы сохранить функционирование клеток. Кроме того, действие некоторых фармакологических препаратов (резерпин, оксалат натрия, аденозин-5-монофосат и др.) также может привести к состоянию гипотермии, что требует детального исследования влияния этого фактора на системы организма. В основном массиве научной литературы описываются физиологические изменения, которые происходят в организме в условиях гипотермии, детально исследовано состояние нервной, эндокринной и кровеносной систем. Однако на тканевом уровне, практически, отсутствуют данные об особенностях перестройки костной ткани в условиях гипотермии. Нами в качестве объекта исследования использована губчатая кость. Известно, что губчатая кость принимает активное участие в минеральном гомеостазе организма путем ремоделирования.

В связи с этим, *целью* настоящего раздела исследования явилось изучение влияния индуцированной легкой гипотермии на губчатую кость 6- и 24-месячных крыс.

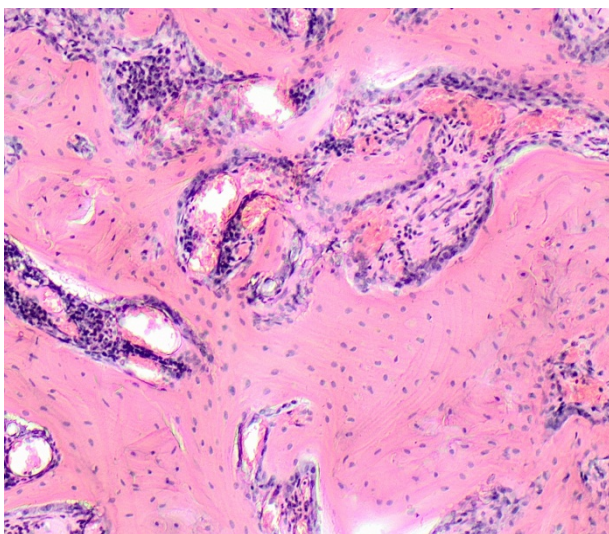
4.1. Влияние гипотермии на губчатую кость 6-месячных животных

4.1.1. Контрольные животные (животные, не подвергавшиеся холодовому воздействию)

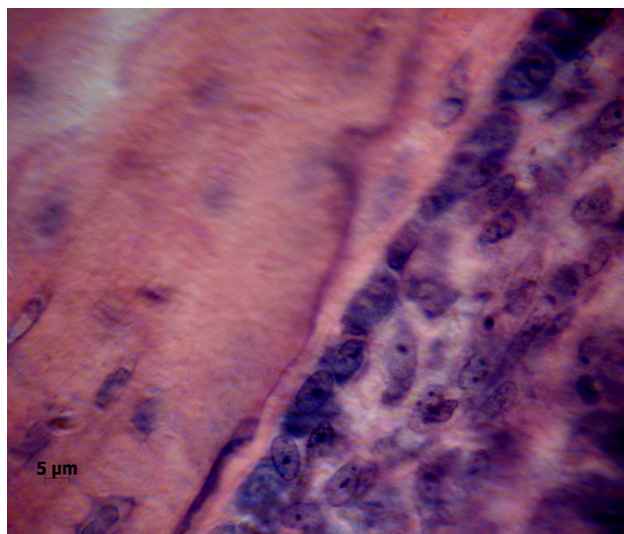
Микроскопический анализ препаратов дистального метафиза бедренной кости показал, что губчатая кость, расположенная между зоной роста и

областью диафиза, была представлена сетью костных трабекул с высокой плотностью остеобластов на их поверхности и остеоцитов в толще трабекул (рис. 4.1 А, Б). В минерализованном матриксе в лакунах продолговатой формы располагались остеоциты, имеющие базофильные ядра и цитоплазму в виде ободка со слабобазофильной окраской (рис. 4.1 А). В популяции остеоцитов обнаружены лишь единичные клетки с признаками деструкции.

Остеобласты, находящиеся на краевой поверхности костных трабекул, различаются метаболической активностью. На отдельных костных трабекулах располагаются крупные остеобласты полигональной формы с гипохромным ядром (рис. 4.1.Б), что свидетельствует об их метаболической активности, связанной с биосинтезом макромолекул, принимающих участие в формировании остеоида.



А



Б

Рис. 4.1. (А, Б). А) Сеть костных трабекул с высокой плотностью остеобластов на поверхности и остеоцитов в толще трабекул. Б) Высокая плотность остеобластов по краевой поверхности костной тркабекулы. Контроль, 6-месячные животные. Гематоксилин и эозин. А) Ув. 100. Б) Ув. 1000.

Электронно-микроскопический анализ показал, что функционально активные остеобласты имеют крупное эксцентричное ядро, представленное, преимущественно, эухроматином (рис. 4.2). Гетерохроматин в виде узкой каймы в основном был локализован на внутренней поверхности ядерной мембраны, а в центральной области ядра располагался рыхлый эухроматин. В кариолемме присутствует значительное количество поровых комплексов, что указывает на активный транспорт макромолекул, осуществляющийся между ядром и цитоплазмой. В цитоплазме остеобластов обнаружена развитая гранулярная эндоплазматическая сеть (гЭПС) в виде параллельно ориентированных узких каналцев с рибосомами на поверхности (рис. 4.2).

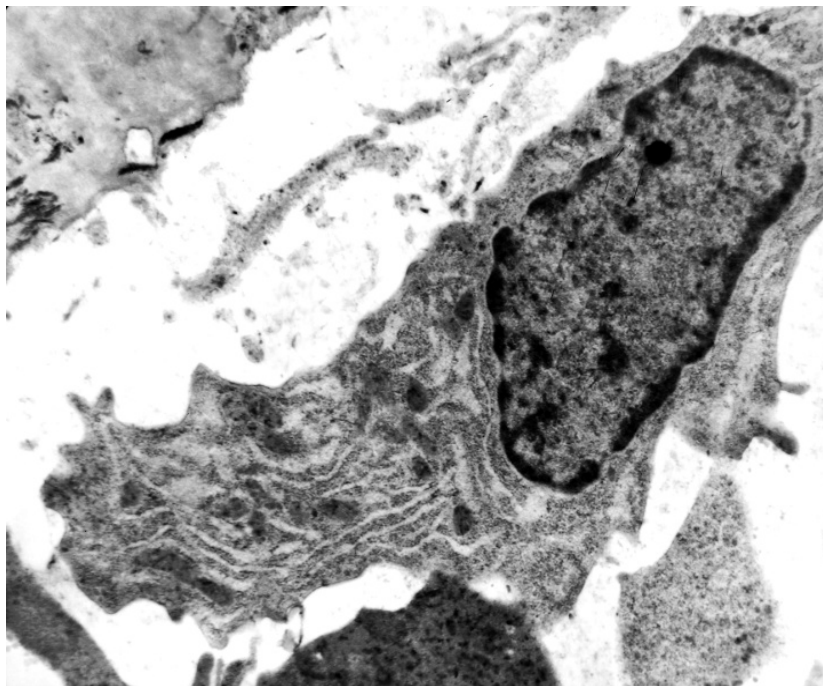


Рис. 4.2. Функционально активный остеобласт с крупным эксцентрично расположенным ядром и цитоплазмой с развитой гранулярной ЭПС. Контроль. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

На других костных трабекулах располагаются покоящиеся остеобласты, клетки уплощенной формы, покрывающие краевую поверхность костных трабекул (рис. 4.3).

Покоящиеся остеобласты имеют вытянутую форму, в ядре повышена плотность гетерохроматина, а цитоплазма характеризуется низкой плотностью мембранных органелл.

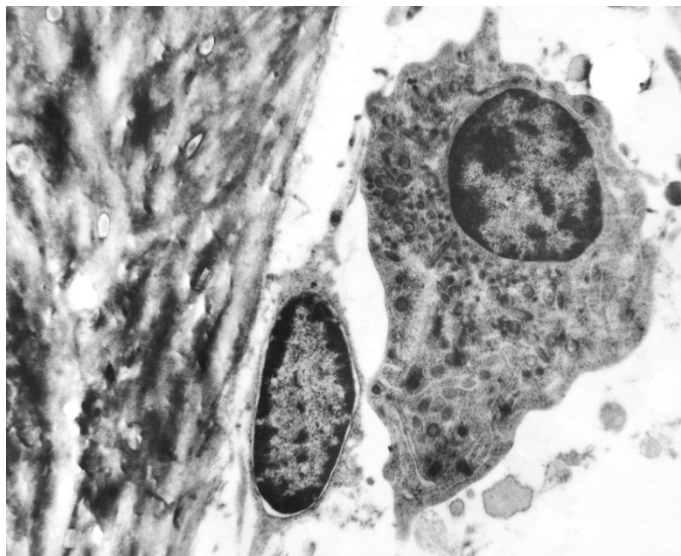


Рис. 4.3. Покоящийся остеобласт на поверхности костной трабекулы. Контроль. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Местами на краевой поверхности костных трабекул отмечены лакуны резорбции, «базисные мультиклеточные единицы», различающиеся стадией ремоделирования костной ткани. На начальной стадии ремоделирования – активации, в очагах резорбции в лакунах располагаются остеокласты, имеющие 3 и более ядер (рис. 4.4).

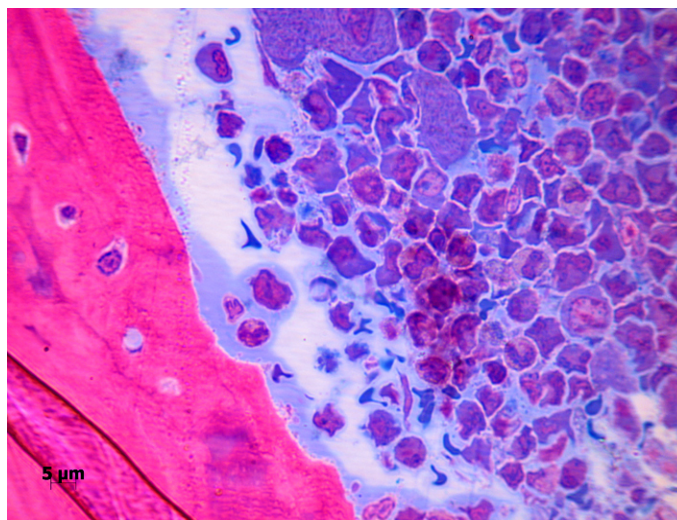


Рис. 4.4. Очаг ремоделирования костной ткани. Остеокласт в области резорбции. Лакуны без остеоцитов. Контроль. Полутонкий срез. Окраска по Арагизю. Ув. 1000.

Обычно области остеокластической резорбции присутствуют в отделах кости с гибнущими остеоцитами, сигнал от которых служит начальным проявлением активации остеокластов.

Остеокласты обнаруживались также в костном мозге вблизи поверхностей костных трабекул. Количество ядер в клетках варьировало (рис. 4.5).

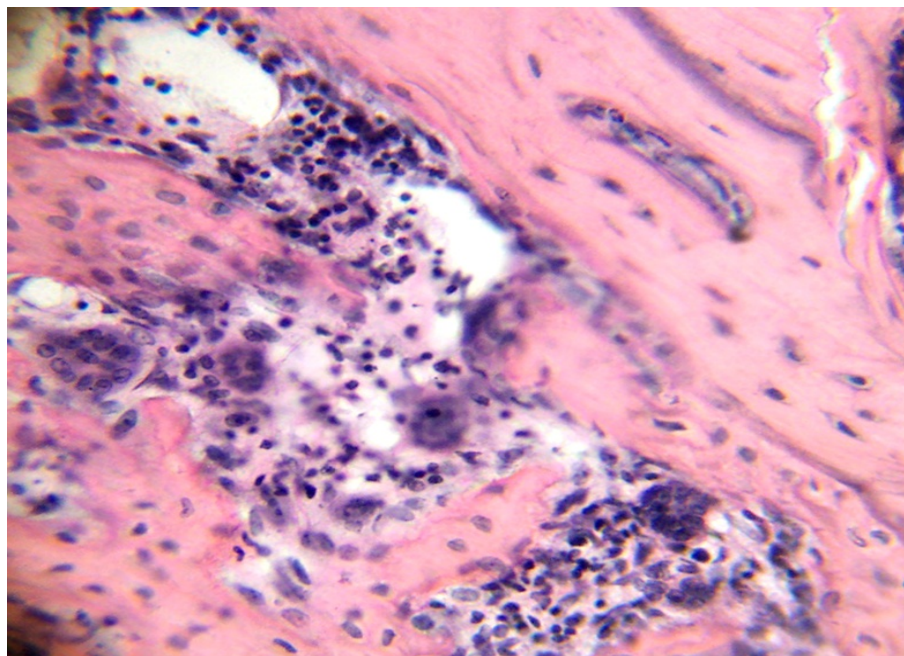


Рис. 4.5. Остеокласты в костном мозге. Контроль. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

Характерной особенностью остеокластов было присутствие в цитоплазме большого количества лизосом и крупных митохондрий, что выявлено при электронно-микроскопическом исследовании.

Местами обнаружены резорбционные полости, заполненные остеобластами, что свидетельствует о переходе процесса ремоделирования от стадии активации к стадии формирования.

На костных трабекулах располагались очаги новообразованной костной ткани, заполняющие области резорбции, что свидетельствует о завершении процесса ремоделирования.

4.1.2. Влияние гипотермии на губчатую кость 6-месячных животных

Через 3 суток после гипотермии при светооптическом исследовании выявлено, что в костных трабекулах присутствуют остециты с различной окраской ядер – от слабо базофильной до базофильной (рис. 4.6). Кроме того, обнаружены пустые лакуны без остецитов, трещины и щели. Матрикс костных трабекул имел неравномерную окраску – от однородной фуксинофильной до слабо оксифильной. Четко прослеживались базофильные линии склеивания. В красном костном мозге располагались клетки различной степени деструкции. Большинство из них были лизированы или пикнотично изменены. Ядра мегакариоцитов не имели четких контуров.

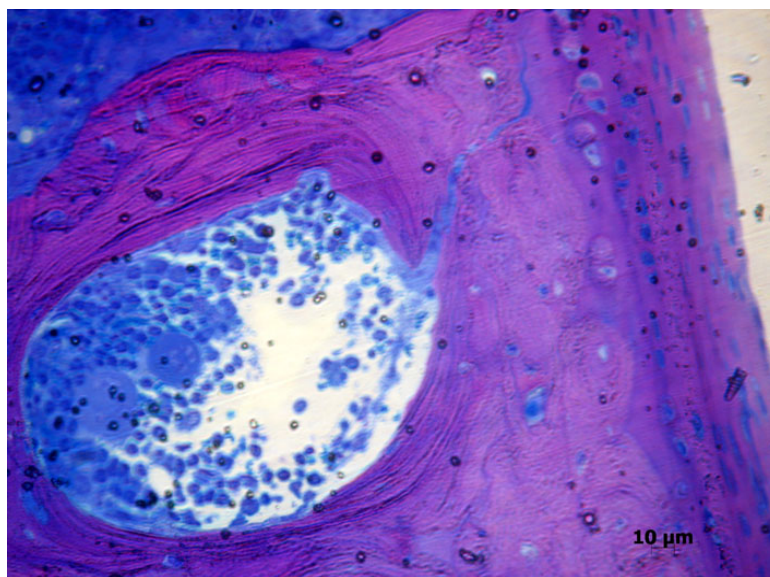


Рис. 4.6. Фрагмент кортекса с прилежащими костными трабекулами. Костные лакуны с остеocyтами. Пустые лакуны. Лизис мегакариоцитов в красном костном мозге. Опыт. Полутонкий срез. Окраска по Арагисіо. Ув. 400.

При электронно-микроскопическом анализе выявлено, что в минерализованном костном матриксе, наряду с присутствием пустых лакун

находились лакуны с остеоцитами. У большинства из них имела место деструкция плазматической мембраны (рис. 4. 7). В цитоплазме таких клеток обнаружены набухшие просветленные митохондрии и лизосоноподобные структуры.



Рис. 4.7. Лизис цитолеммы остеоцита. Набухшая митохондрия. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

Нередко остеоциты располагались в расширенных костных лакунах с неровными зазубренными краями, что свидетельствует об их резорбционном типе. Остеоциты имели электронноплотные фрагментированные ядра, что указывает на их гибель путем апоптоза (рис. 4.8).

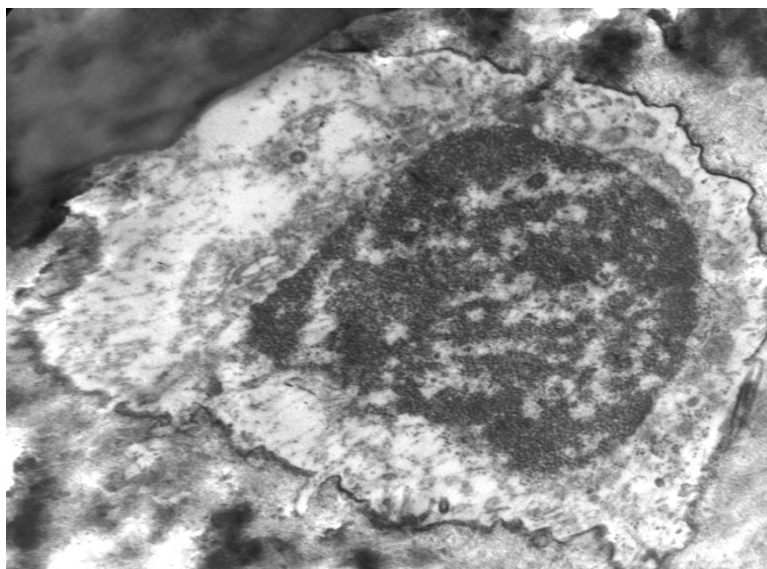


Рис. 4.8. Деструкция остеоцита. Фрагментация клеточного ядра. Расширенная резорбционная лакуна вокруг остеоцита. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

На краевой поверхности костных трабекул обнаружены остеобласты в состоянии различной метаболической активности. Большинство остеобластов имело пикнотичные ядра и деструктурированную цитоплазму. В единичных остеобластах в гЭПС цитоплазмы присутствовало множество канальцев, что свидетельствует об активно протекающем биосинтезе белков. Над остеобластами нередко располагались удлиненные преостеобласты. Однако в цитоплазме, как остеобластов, так и клеток-предшественников остеобластов, обнаружено значительное количество вторичных лизосом, что, по-видимому, связано с активизацией в клетках ферментативного гидролиза продуктов деструкции, образованных под влиянием гипотермии (рис. 4.9).

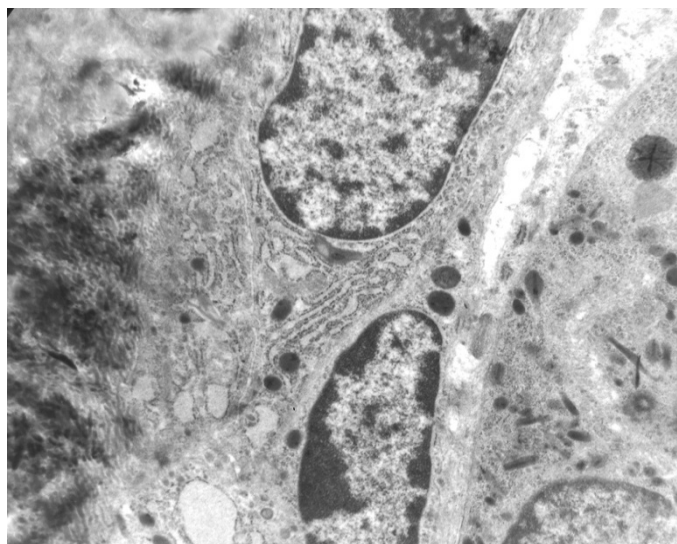


Рис. 4.9. Остеобласт и преостеобласт на поверхности костной трабекулы. Вторичные лизосомы в цитоплазме клеток. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

В цитоплазме остеобластов выявлены набухшие митохондрии с признаками деструкции, их двойная мембрана и кристы имели признаки очагового лизиса (рис. 4.10). Нередко встречались митохондрии нетипичных крупных размеров, имеющие удлиненную форму (рис. 4.11). Формирование таких митохондрий может отображать нарушение энергетического потенциала клетки и ее адаптационно-компенсаторное приспособление к новым условиям, возникающим в костной ткани в результате гипотермии.

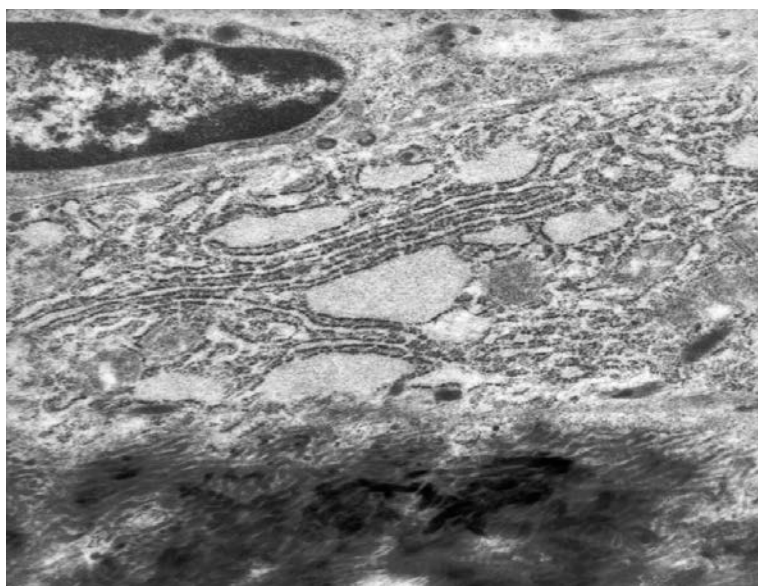


Рис. 4.10. Фрагмент функционально активного остеобласта на поверхности костной трабекулы. Деструкция митохондрий. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 15600.

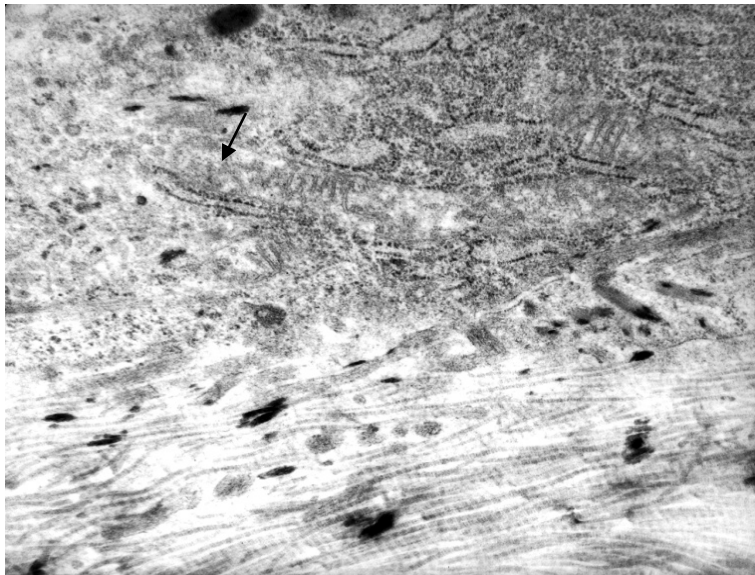


Рис. 4.11. Фрагмент остеобласта. Удлиненная крупная набухшая митохондрия. Деструкция крист. Лизис цитолеммы остеобласта. Коллагеновые волокна не минерализованного остеоида. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 16800.

Нередко вблизи деструктивно измененных остеобластов на костной поверхности присутствовали остециты с признаками некроза (рис. 4.12).



Рис. 4.12. Некроз остеоицита. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

Матрикс костных трабекул имел неравномерную окраску – наряду с однородной фуксинофильной (оксифильной) окраской присутствовали выражено базофильные линии склеивания (рис. 4.13).

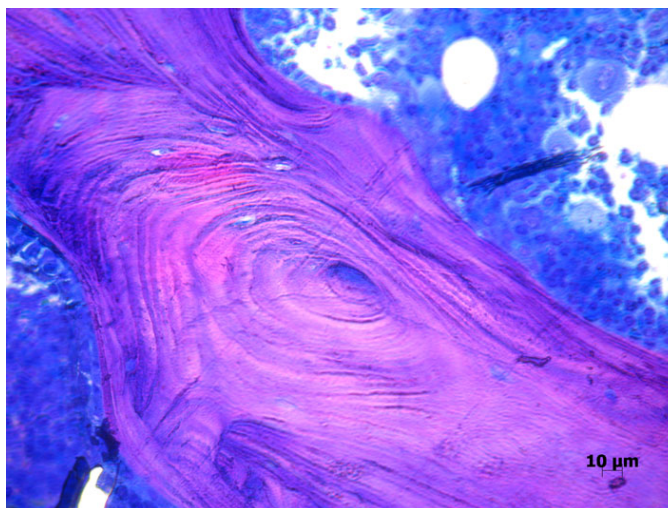


Рис. 4.13. Визуализация и расщепление пучков коллагеновых волокон в матрице костной трабекулы. Лизис клеток красного костного мозга. Опыт. Полутонкий срез. Окраска по Арагисіо. Ув. 400.

В межтрабекулярных пространствах выявлялись клетки красного костного мозга с признаками лизиса (рис. 4.13). У мегакариоцитов ядра либо отсутствовали, либо они представлены плотными микроядрами. Часть лимфоцитов содержит лизированные ядра, однако большинство лимфоцитов сохраняют характерную форму ядра и цитоплазмы.

Через 5 суток после индуцирования у крыс гипотермии в костных трабекулах губчатой кости обнаружены, как расширенные лакуны без остеоицитов, так и лакуны с остеоицитами (рис. 4.14). Остеоициты, присутствующие в лакунах, характеризовались различным структурно-функциональным состоянием. В отдельных лакунах выявлены остеоициты со слабо контурируемым слабобазофильным ядром, что может быть отражением либо нарушения сорбции красителя, либо протекания литических процессов. В

других лакунах присутствовали остеоциты с небольшими базофильными ядрами, которые условно могут быть отнесены к типичным.

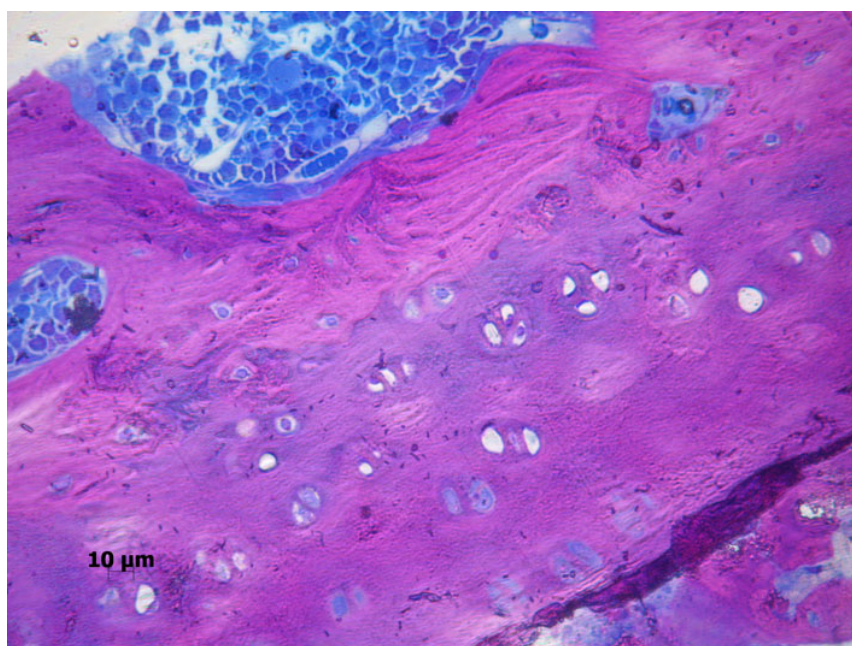


Рис. 4.14. Расширенные лакуны без остеоцитов, остеоциты с тенеподобными ядрами и единичные остеоциты, имеющие характерную окраску. Опыт. Полутонкий срез. Окраска по Арагісіо. Ув. 400.

Ремоделирование костной ткани нарушено. Резорбционные полости не заполнены клетками (рис. 4.15). По всей вероятности, эти полости существовали до начала гипотермии, а в связи гибелью остеогенных клеток и их предшественников остались незаполненными. В костном мозге в большом количестве присутствовали клетки с лизированными ядрами, либо с базофильными пикнотичными ядрами (рис. 4.15).

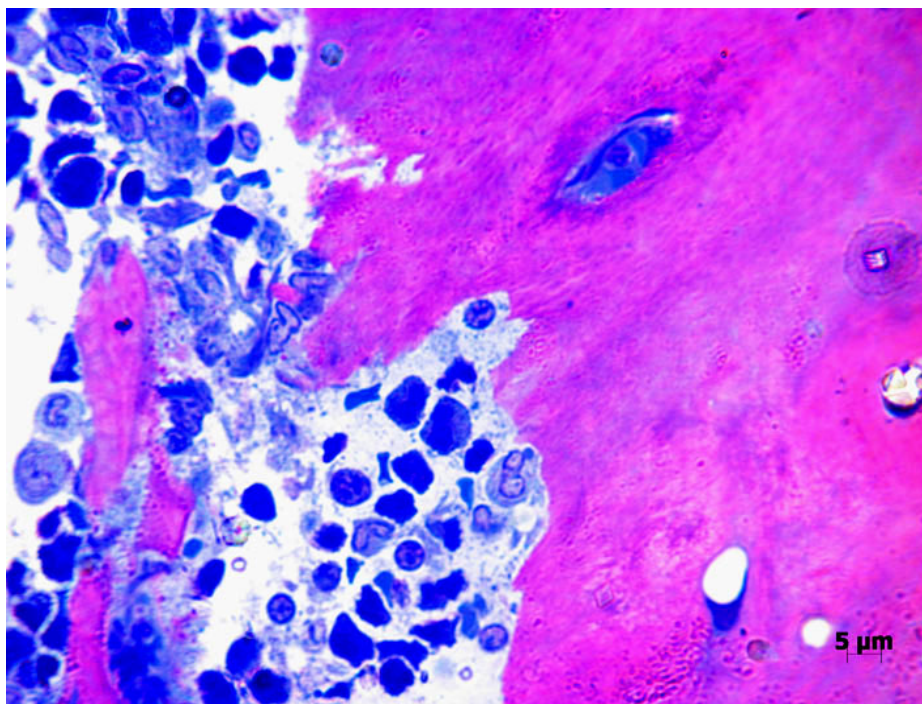


Рис. 4.15. Резорбционные полости по краевой поверхности костной трабекулы. Опыт. Полутонкий срез. Окраска по Араписио. Ув. 1000.

На поверхности костных трабекул большинство остеобластов имело гомогенную структуру без дифференцировки на ядро и цитоплазму, лишь на участках располагались единичные остеобласты, сохраняющие характерное строение.

Матрикс костной ткани местами утрачивал типичное строение, при этом отмечены очаги визуализации и расщепления пучков коллагеновых волокон (рис. 4.16), что свидетельствует о протекающих процессах деминерализации

На 7 сутки в костных трабекулах обнаруживались остециты, располагающиеся в лакунах различной формы (рис. 4.17 А). В клетках четкой дифференцировки на ядро и цитоплазму не выявлено. Наряду с такими участками, определялись также пустые лакуны без остецитов (рис. 4.17 Б).

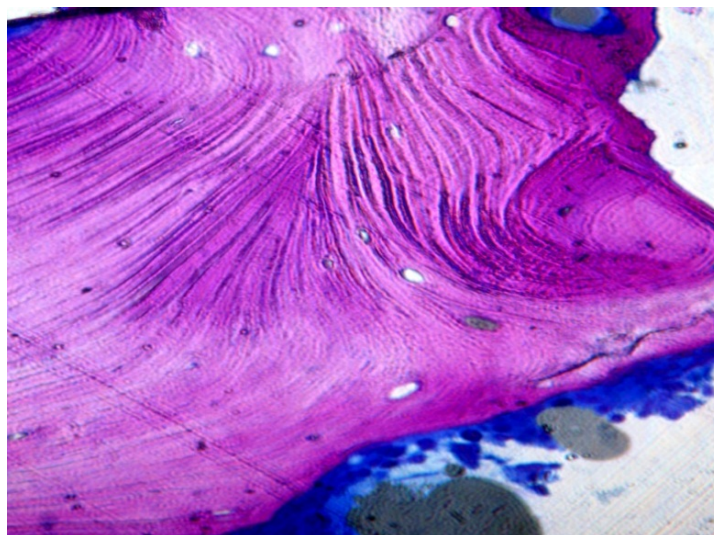
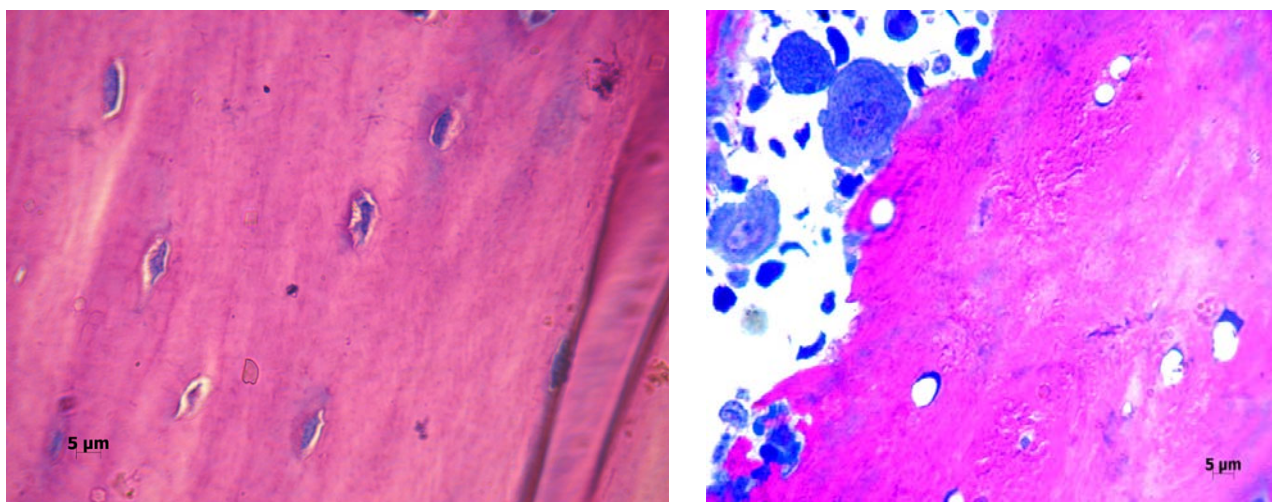


Рис. 4.16. Визуализация и расщепление пучков коллагеновых волокон в матриксе костной трабекулы. Опыт. Полутонкий срез. Окраска по Арагісіо. Ув. 400.



А

Б

Рис. 4.17 (А,Б). А) Остеоциты с нарушенной структурной организацией в минерализованном матриксе. Гематоксилин и эозин. Ув.1000. Б) Пустые лакуны без остеоцитов. Лизис матрикса кости. Полихроматофильные мегакариоциты, нейтрофилы в костном мозге межтрабекулярных пространств. Опыт. Окраска по Арагісіо. Ув.1000.

В матриксе зафиксированы очаги лизиса костной ткани, локализованные, в основном, вокруг лакун без остеоцитов, а также небольшие микротрещины. Между пустыми лакунами выявлены участки гомогенизации костного

матрикса, представленные глыбчатым веществом (рис. 4.17 Б). На поверхности костных трабекул отмечены также лизированные покаящиеся остеобласты, не имеющие четких контуров ядра.

В сосудах красного костного мозга обнаружены монетные столбики склеенных эритроцитов – имел место сладж-синдром. Кроме того, присутствовали расширенные по типу синусоидов гемокапилляры с низкой плотностью форменных элементов крови (рис. 4.18). Между отростками эндотелиоцитов отсутствовали плотные контакты, вследствие чего имел место диapedез.

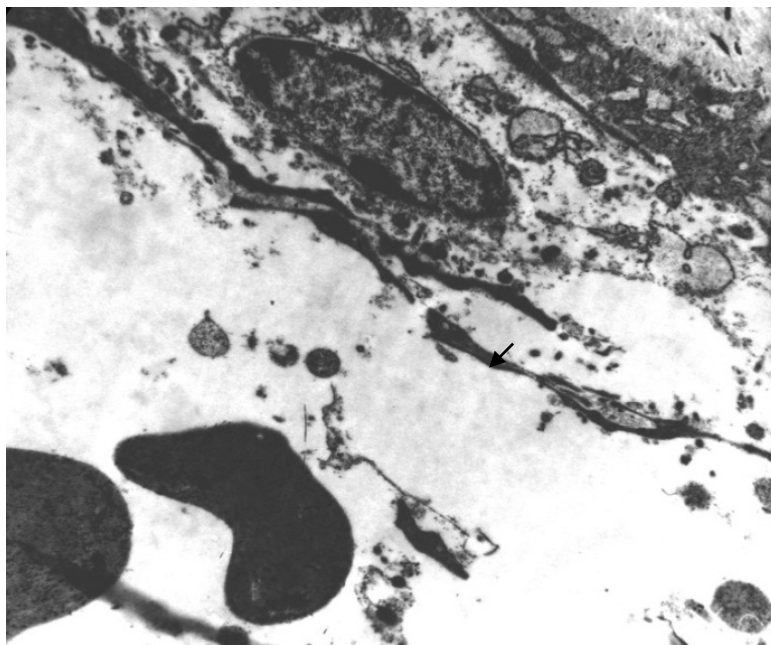


Рис. 4.18. Деструкция гемокапилляра. Промежутки между отростками эндотелиоцитов. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Часть клеток красного костного мозга была деструктурирована. Наряду с деструктивными изменениями отмечены также репаративные проявления, связанные с формированием полихроматофильных мегакариоцитов – крупных клеток с лопастным ядром и цитоплазмой, заполненной зернистым содержимым – мелкими гранулами. Характерное строение имели нейтрофилы – округлую форму и сегментированное ядро. На участках красного костного

мозга четко дифференцировались лимфоциты. Отдельные клетки идентифицировать не удалось вследствие некротических изменений.

На поверхностях костных трабекул присутствовали остеобласты с выраженной деструкцией цитоплазматической мембраны. Остеобласты нередко располагались вблизи капилляров синусоидного типа (рис. 4.19).

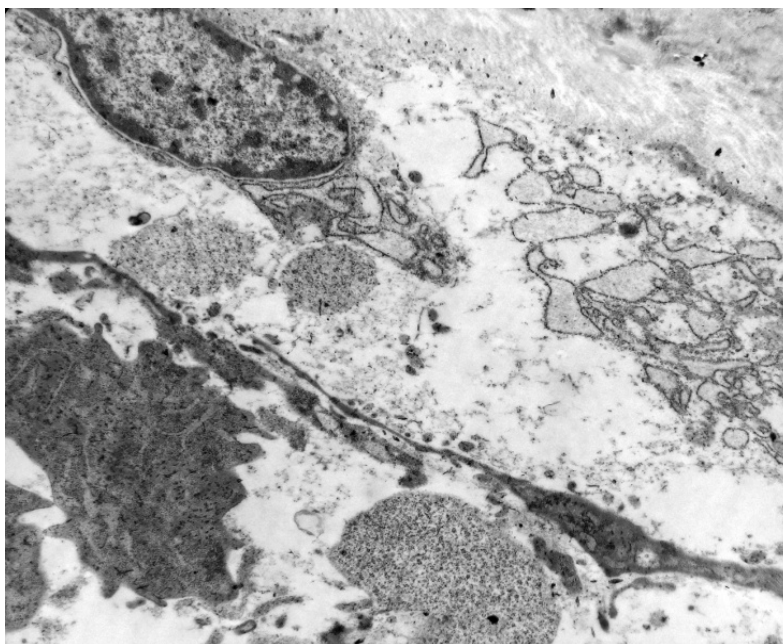


Рис. 4.19. Деструкция цитолеммы остеобласта. Слой остеоида на поверхности кости. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

В цитоплазме остеобластов, отмеченных на поверхности не минерализованного остеоида, нередко обнаруживали набухание канальцев гЭПС, что свидетельствует о нарастании отечных явлений (рис. 4.20 А). Полости таких канальцев характеризовались низкой электронной плотностью. Они были заполнены отечной жидкостью.

В редких случаях мы наблюдали нарушение митоза преостеобластов (рис. 4.20 А, Б). Такие клетки не содержали ядра, но при этом в них идентифицировались хромосомы в виде конденсированного спирализованного гетерохроматина.

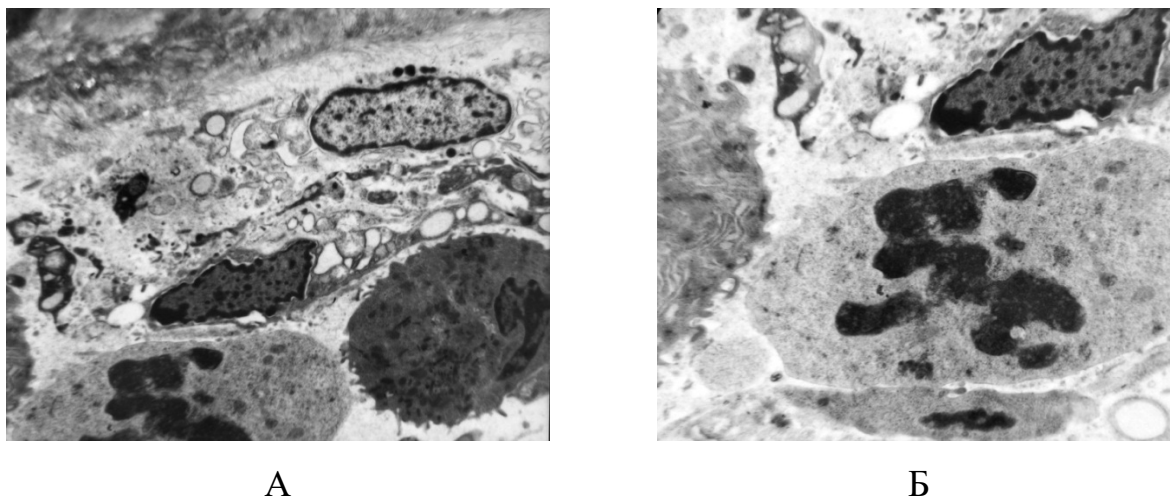


Рис. 4.20. (А, Б). А) Остеобласт на поверхности костной трабекулы. Набухание канальцев гЭПС в цитоплазме остеобласта. Б) Фрагмент рис. А. Митоз преостеобласта. Визуализация спирализованных хромосом. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. А) Ув. 4000. Б) Ув. 6000.

В минерализованном костном матриксе присутствовали остеоциты, значительная часть которых находилась на разных стадиях апоптоза. Такие остеоциты содержали ядро с высокой долей гетерохроматина (рис. 4.21 А) или же оно было уменьшено в размере и полностью гетерохроматизировано (рис. 4.21 Б). Отмечены обширные очаги лизиса кариолеммы и плазматической мембраны.

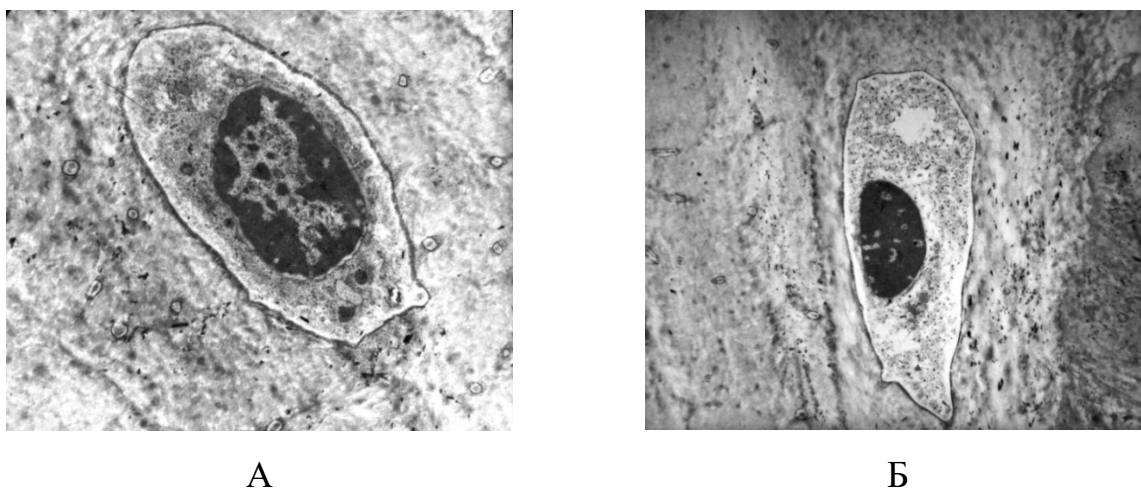


Рис. 4.21. (А, Б). А) Гетерохроматизация ядра остеоцита. Набухание митохондрий. Б) Апоптоз остеоцита. Высокая электронная плотность клеточного ядра. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. А) Ув. 8000. Б) Ув. 4000.

14 сутки после гипотермии. На данный срок исследования в губчатой кости сохранялись деструктивные нарушения, однако были выявлены и репаративные проявления.

В лакунах обнаружены остеоциты с крупными ядрами, однако в части лакун остеоциты отсутствовали или были с признаками лизиса (рис. 4.22 А, Б).

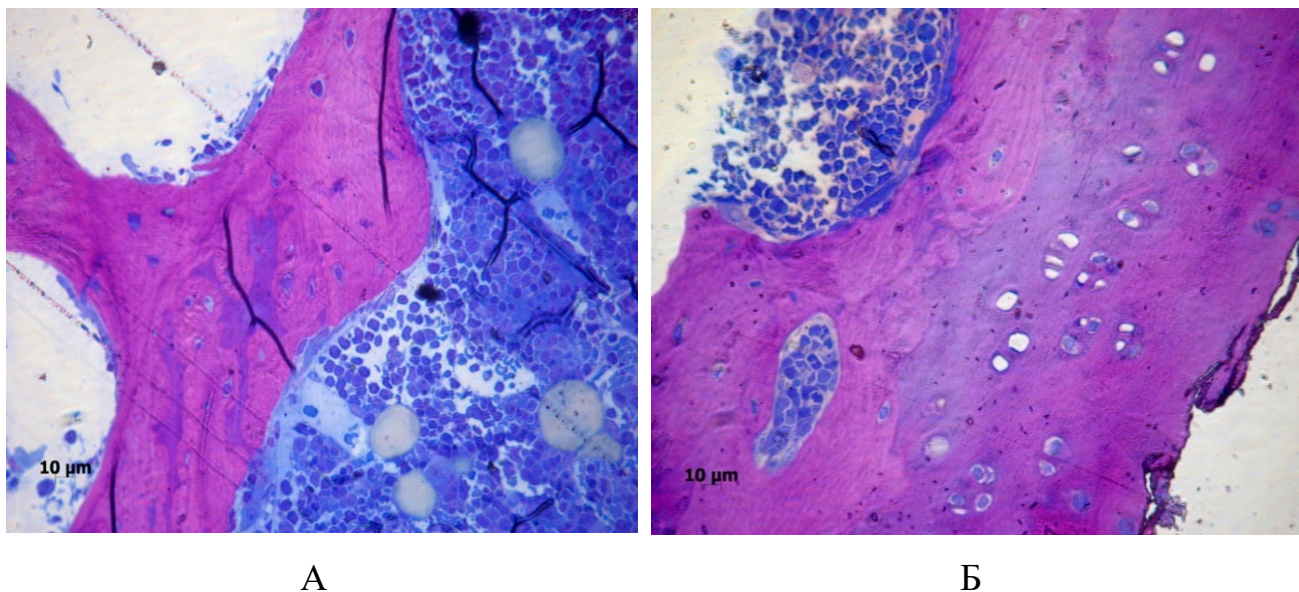


Рис. 4.22 (А, Б). А) Губчатая кость. Остеоциты с различной интенсивностью окраски ядер. Участки поверхности костных трабекул, не покрытые остеобластами. Б) Пустые лакуны. Деструкция остеобластов по краевой поверхности костной трабекулы. Опыт. Окраска по Арагісіо. А) Ув. 400; Б) Ув. 400.

В других лакунах находились остеоциты с крупными слабо окрашенными ядрами.

На поверхности костных трабекул, нередко покрытых слоем неминерализованного остеоида, располагались единичные остеобласты, в цитоплазме которых присутствовала развитая гЭПС в виде параллельно ориентированных канальцев с рибосомами на поверхности (рис. 4.23).

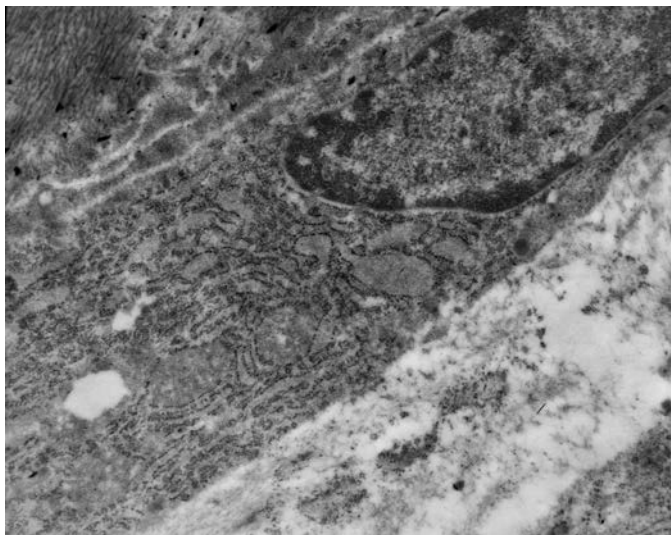


Рис. 4.23. Остеобласт с профилями гЭПС. Небольшие очаги деструкции цитоплазмы. Расширенные полости гЭПС. Опыт. Контрастировано по Рейнольдсу. Ув. 10000.

В отдельных остеобластах гЭПС была фрагментирована, содержала расширенные каналцы в виде полостей, переполненных продуктами биосинтеза, что свидетельствует о нарушении цитоплазматического транспорта. Встречались остеобласты, содержащие в цитоплазме миелиновые фигуры, являющиеся результатом деструкции фосфолипидов мембран, а также остеобласты, имеющие небольшие очаги деструкции цитоплазмы.

На значительном протяжении поверхность костных трабекул была покрыта слоем покоящихся остеобластов, имеющих сплюсненную форму, небольшое гетерохроматизированное ядро и узкий ободок слабо организованной цитоплазмы.

Встречались обширные участки костной поверхности, не содержащие остеобластов – «оголенная» кость, что, по-видимому, связано с гибелью остеобластов путем апоптоза.

В красном костном мозге преобладали расширенные по типу синусоидов кровеносные капилляры (рис. 4.24). Часть капилляров содержала признаки деструкции эндотелия – нарушение целостности плазматической мембраны и мембранных органелл.

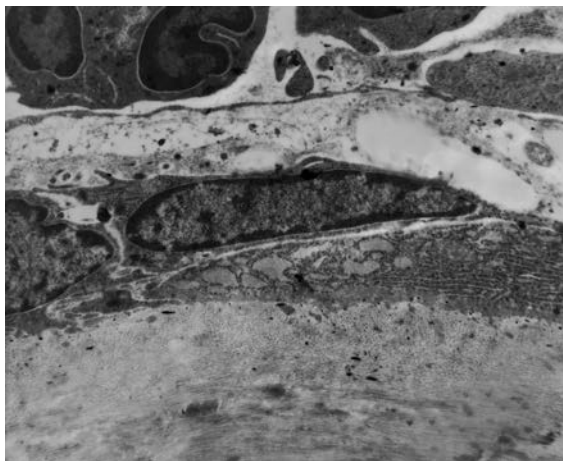


Рис. 4.24. Фрагмент капилляра в красном костном мозге с пристеночно расположенным нейтрофилом. Вблизи гемокапилляра – преosteобласт. Опыт. Контрастировано по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Вблизи таких капилляров отмечен выход форменных элементов крови за пределы капилляра – диапедезные кровоизлияния. Встречались также запустевшие капилляры. Наличие расширенных капилляров, по-видимому, связано с усилением трофики костной ткани, снижение которой имеет место в условиях действия гипотермии. Нередко возле гемокапилляров обнаружены формирующиеся остеокласты, содержащие 2 и более ядер (рис. 4.25).

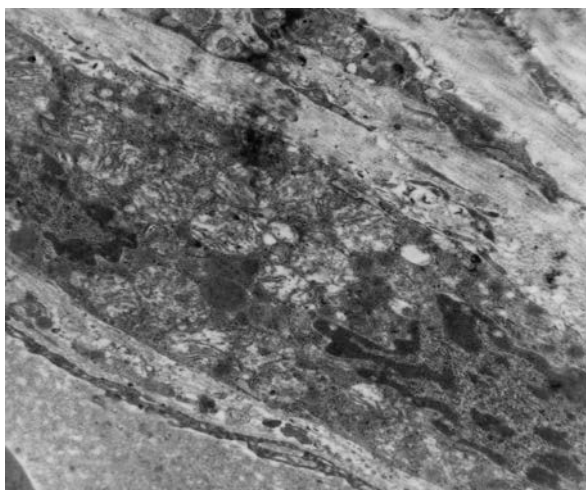


Рис. 4.25. Остеокласт с двумя лопастными ядрами, расположенный вблизи гемокапилляра. Множество округлых и овальных митохондрий с частично просветленным матриксом. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

Остеокласты были обнаружены также и на поверхности костных трабекул (рис. 4.26). Они находились в состоянии функциональной активности, о чем свидетельствует наличие в клетках нескольких ядер (3-5) с преобладанием эухроматина в центральных отделах, а по периферии – гетерохроматина. В цитоплазме остеокластов выявлено большое количество вакуолей, фагосом и вторичных лизосом.

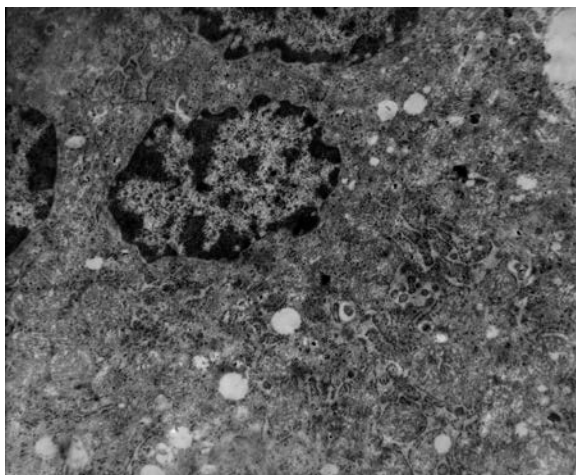
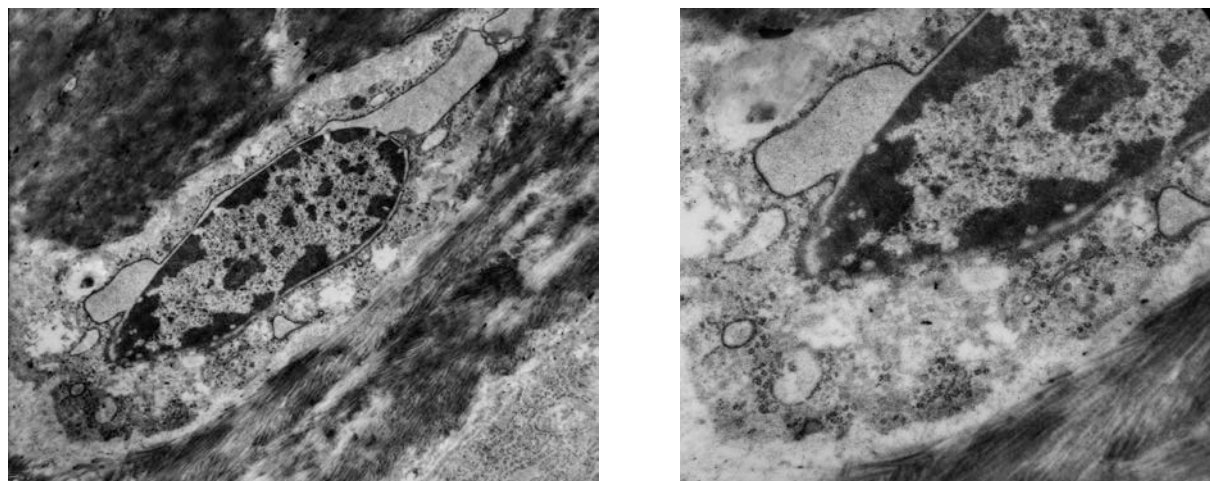


Рис. 4.26. Фрагмент остеокласта с тремя ядрами. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Некоторые остеокласты имели сформированную гофрированную каемку, псевдоподии которой непосредственно контактировали с минерализованной костью, формируя лакуны резорбции. В цитоплазме остеокластов содержалось большое количество округлых и овальных митохондрий.

В красном костном мозге вблизи костных трабекул также встречались остеокласты, которые находились на стадии формирования. Такие клетки содержали множество вакуолей и фагосом в цитоплазме, однако они не имели непосредственного контакта с костной поверхностью.

Выраженные изменения ультраструктурной организации были зафиксированы и в остеоцитах. В них отмечено формирование расширенных перинуклеарных пространств, заполненных тканевой жидкостью (рис. 4.27 А, Б).



А

Б

Рис. 4. 27 (А, Б). А) Остеоцит в лакуне. Расширенное перинуклеарное пространство. Б) Фрагмент рис. А. Локальный лизис кариолеммы и плазматической мембраны. Область дилатации перинуклеарного пространства. Опыт. Контрастировано по Рейнольдсу. А) Ув. 6000. Б) Ув. 15600.

В остеоцитах наблюдалась гетерохроматизация ядра с нарушением целостности ядерной мембраны (рис. 4.28). В цитоплазме остеоцитов была отмечена низкая плотность мембранных органелл, присутствовали очаги деструкции в виде гомогенных масс.



Рис. 4.28. Остеоцит с гетерохроматизированным ядром и деструкцией цитоплазмы. Лизис цитоплазматической мембраны. Расширенная резорбционная лакуна и костный каналцец остеоцита. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

У большинства остеоцитов на значительном протяжении выявлялся локальный лизис цитоплазматической мембраны, вплоть до ее полного отсутствия (рис. 4.29).

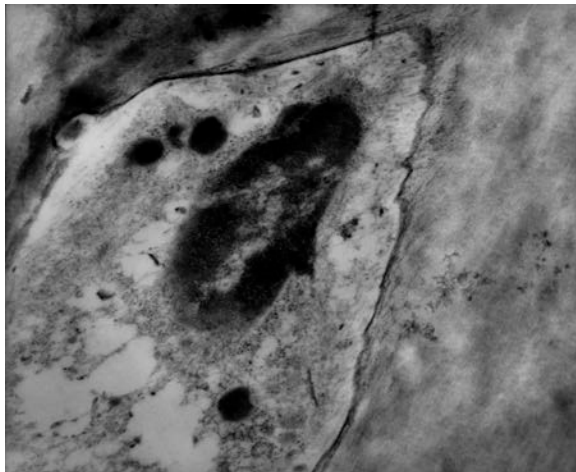
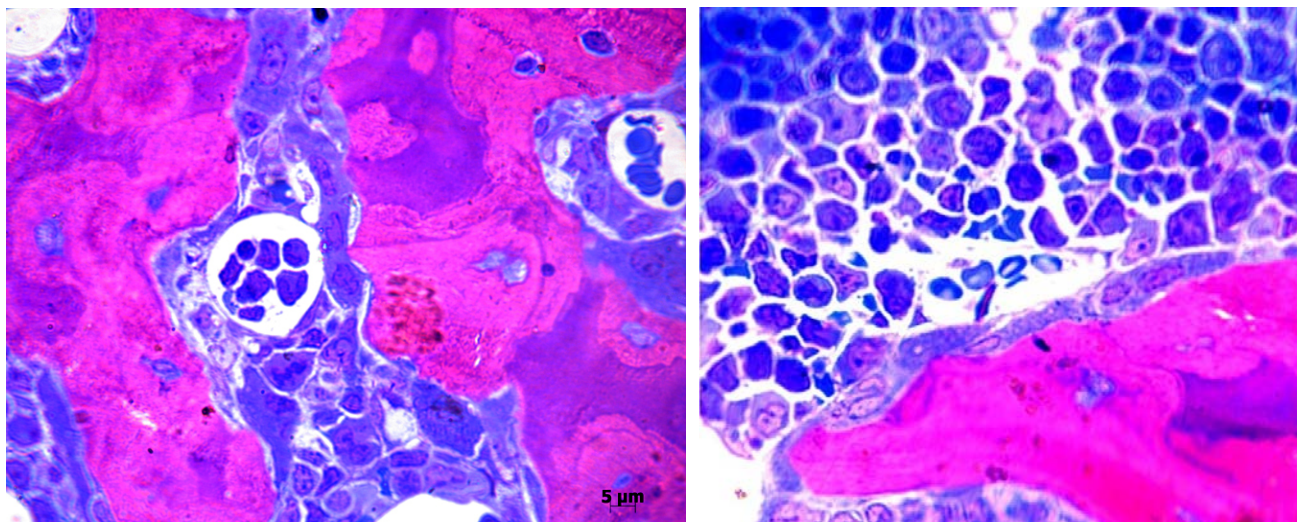


Рис. 4. 29. Остеоцит с выраженными деструктивными изменениями в лакуне резорбционного типа. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 16800.

Присутствовали остеоциты, расположенные в расширенных резорбционных лакунах, имеющих неровные зазубренные края. Это является отражением активизации остеоцитарного лизиса, который, по-видимому, имеет место в условиях гипотермии.

28 сутки после гипотермии. При исследовании полутонких срезов на костных трабекулах обнаружено повышение плотности резорбционных полостей, в которых располагались остеокласты, содержащие 2-3 ядра. Плотность остеобластов на участках костных трабекул была повышена, остеобласты были узкие удлиненной формы, содержали ядра с рыхлым хроматином (рис. 4.30 и рис. 4.31), что свидетельствует о восстановительных процессах. В красном костном мозге также зафиксированы репаративные проявления. Мегакариоциты имели четкие ядра, были заполнены гранулярным содержимым (рис. 4.31).



А

Б

Рис. 3.30 (А, Б). Остеокласты на поверхности костных трабекул. Остеобласты. Полутонкий срез. Окраска по Арагісіо. А, Б) Ув. 1000.

Однако и на этот срок в костных трабекулах сохранялись пустые лакуны без остеоцитов, трещины и щели, неравномерная окраска матрикса (рис. 4.31).

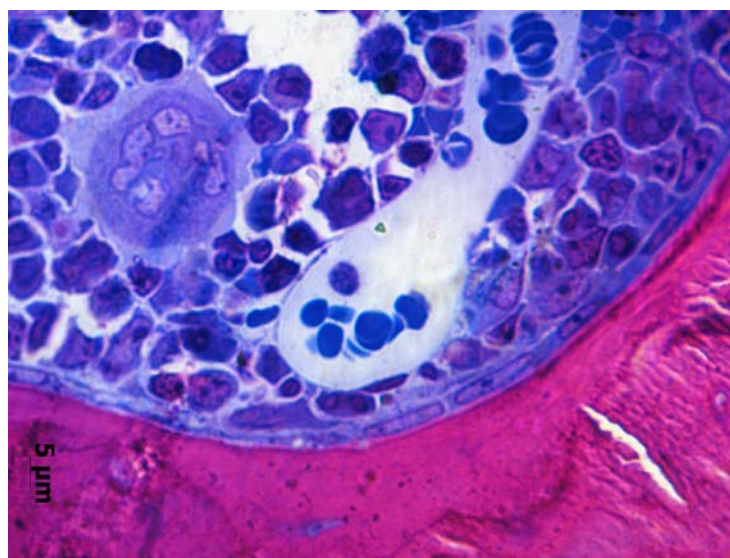


Рис. 4.31. Слой остеобластов на поверхности костной трабекулы. Трещины в костном матриксе. Гемокапилляр синусоидного типа и мегакариоцит в красном костном мозге. Полутонкий срез. Окраска по Арагізіо. Ув. 400.

В гемокапиллярах красного костного мозга имеются признаки нарушения микроциркуляции – в сосудах отмечено прилипание эритроцитов друг к другу (рис. 4.32), что приводит к повышению вязкости крови и затрудняет ее перфузию через микрососуды.

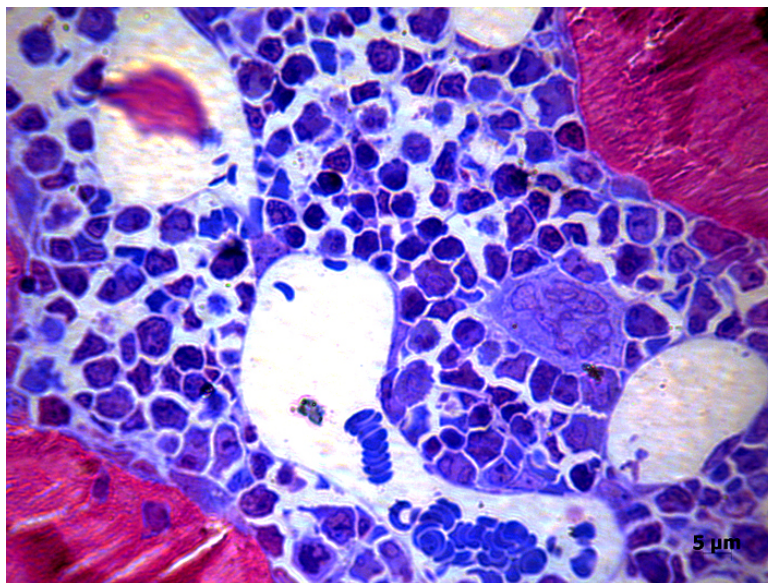


Рис. 4.32. Нарушение микроциркуляции в гемокапиллярах красного костного мозга – сладж эритроцитов и запустевшие капилляры. Регенерация клеток красного костного мозга. Полутонкий срез. Окраска по Арагизьо. Ув. 400.

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 и обморожениях. Прогрессирование таких нарушений приводит к запустению капилляров (рис. 4.32).

Для оценки характера ремоделирования кости были проведены морфометрические исследования (табл. 4.1). Данные табл. 4.1 свидетельствуют о том, что на 28-е сутки после гипотермии у животных 6-месячного возраста в дистальном метафизе бедренной кости объем кости на исследованной площади статистически не отличался от контрольных животных, однако объем трабекулярной кости был снижен на 16,0 %.

Показатели ремоделирования губчатой кости у крыс (28-е сутки после гипотермии)

Определяемые показатели	Контрольные животные	Опытные животные	P
Объем губчатой кости (костные трабекулы и костный мозг – ус. ед.), n=15	123,93 ± 4,06	119,53 ± 5,57	НД
Объем трабекулярной кости (%), n=15	63,8 ± 3,41	53,64 ± 2,57	< 0,05
Количество лакун с остеоцитами в поле зрения микроскопа, n=15	53,31 ± 3,37	44,32 ± 2,15	< 0,05
Пустые лакуны остеоцитов в поле зрения микроскопа, n=15	2,23 ± 0,36	16,68 ± 0,73	< 0,001
Количество пустых резорбционных полостей	6,94 ± 0,59	15,38 ± 1,01	< 0,01
Количество резорбционных полостей с остеокластами	3,43 ± 0,41	10,25 ± 0,96	< 0,01
Количество резорбционных полостей, заполненных макрофагами или остеобластами	5,09 ± 0,45	3,61 ± 0,44	< 0,05

Примечание.

P – достоверные отличия от показателей контрольных животных.

У животных опытной серии количество остеоцитов на костных трабекулах была ниже, чем в контроле на 16,9 %, а численность пустых лакун без остеоцитов, наоборот, больше в 7,5 раза. Зафиксировано также повышение относительно показателей контроля пустых полостей резорбции (в 2,2 раза), которые располагаются по краевой поверхности костных трабекул, а также полостей резорбции, заполненных остеокластами (в 2,99 раза), что свидетельствует об

усилении остеокластической резорбции. В литературе также имеются данные о стимулирующем действии гипотермии на остеокластогенез [116]. Костеобразование было снижено, о чем свидетельствует низкая плотность полостей резорбции, заполненных макрофагами или остеобластами. Их количество было ниже, чем в контроле на 29,1 %.

Таким образом, в эксперименте на крысах 6-месячного возраста изучено влияние легкой гипотермии (возникшую в результате пребывания крыс в холодной камере в течение 5 дней по 5 часов ежедневно) на губчатую кость. Выявлено, что даже небольшое снижение температуры тела животных оказывает выраженное воздействие на структурно-метаболические показатели костной ткани. Наиболее выраженные изменения в костной ткани и красном костном мозге были зафиксированы на 3-5 сутки после окончания гипотермии. Большинство остеоцитов, располагающихся в лакунах, имели слабо окрашенную цитоплазму и ядро, часть клеток была лизирована, присутствовали пустые лакуны без остеоцитов. В матриксе костных трабекул обнаруживались трещины, расслоение межклеточного вещества с визуализацией коллагеновых волокон. На краевых поверхностях костных трабекул плотность остеобластов была низкая. При детальном электронно-микроскопическом анализе выявлено, что среди популяции остеобластов присутствовали некротические клетки, а также клетки с низкой функциональной активностью. В отдельных остеобластах обнаружены компенсаторные проявления в виде слияния митохондрий и формирования крупных структур, направленные на восстановление энергетического потенциала клеток после гипотермии. Клеточное ремоделирование (с участием остеокластов, макрофагов и остеоцитов) костной ткани на этот срок отсутствовало.

Имел место остеоцитарный остеолитизис, что проявлялось расширением костных лакун. Остеоциты также находились в различном функциональном состоянии, у большинства остеоцитов в ядрах повышена доля гетерохроматина, в цитоплазме присутствовали слабо развитые мембранные органеллы. Обнаруживались пустые лакуны без остеоцитов, что свидетельствует о гибели клеток. В красном костном мозге, наряду с запустевшими кровеносными сосудами,

присутствовали клетки с разрушенным ядром и цитоплазмой, что затрудняло их идентификацию. Выраженные изменения обнаруживались и в крупных клетках красного костного мозга – мегакариоцитах, ядра в которых были лизированы и определялись в виде слабых контуров.

На 7-е сутки, наряду с наличием в клетках деструктивных нарушений, присутствовали как остециты, так и остеобласты, с нормальной структурной организацией, что связано с адаптивными возможностями этих клеток. В матриксе кости также как и на ранний срок, присутствовали расширенные лакуны с остеоцитами, что свидетельствует о течении процесса остеоцитарной резорбции. В красном костном мозге вблизи кровеносных сосудов зафиксировано формирование остеокластов, однако плотность клеток, прикрепленных к кости, была низкой.

На 14-е и 28-е сутки процессы ремоделирования костной ткани проходили по классическому типу: на поверхности костных трабекул обнаружены резорбционные полости, заполненные остеокластами. Такие полости располагались в участках гибели остеоцитов. По сравнению с контрольными животными плотность полостей резорбции с остеокластами была повышена. В отдельных полостях, наряду с остеокластами, присутствовали макрофаги – остеомаксы. Небольшой процент резорбционных полостей был заполнен остеобластами. Нередко в глубине таких костных полостей обнаруживали остеоид с начальными признаками минерализации.

4.2. Изучение структурной организации губчатой кости 24-месячных животных после гипотермии

4.2.1. Контрольные животные (не подвергавшиеся холодovому воздействию).

При микроскопическом исследовании у животных в дистальном метафизе бедренной кости присутствовала сеть костных трабекул (рис. 4.33). Преобладали в основном костные трабекулы, располагающиеся вертикально. Обнаружены одиночные трабекулы, не формирующие сеть. Матрикс трабекул был неоднородный, определялись участки просветления, свидетельствующие о

демнерализации. В межтрабекулярных пространствах располагался желтый костный мозг, перемежающийся с очагами красного костного мозга.

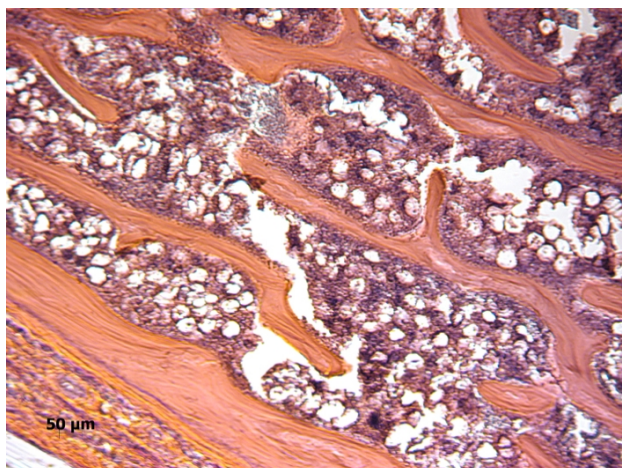


Рис. 4.33. Костные трабекулы с неравномерной минерализацией матрикса. Гематоксилин и эозин. Ув. 100.

Электронно-микроскопический анализ костных трабекул животных контрольной серии показал, что их поверхность покрыта слоем неминерализованного остеоида, представленного разнонаправленными слоями коллагеновых волокон, в которых находятся функционально активные остеобласты (рис. 4.34; 4.35).



Рис. 4.34. Функционально активный остеобласт с эухромным ядром и множественными ядерными порами. Преостеобласт на апикальной поверхности остеобласта. Контроль. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

Над слоем функционально активных остеобластов располагались их предшественники – преостеобласты, имеющие эухромное ядро округлой или продолговатой формы и цитоплазму со слабо развитыми мембранными органеллами (см. рис. 4.34; 4.35).

Остеобласты на небольших участках образуют слой контактирующих между собой клеток и формируют структуру, подобную симпласту (см. рис. 4.35). В остеобластах содержится овальное ядро с преобладанием эухроматина. Гетерохроматин в виде узкой каймы локализуется на внутренней поверхности ядерной мембраны, а также довольно равномерно распределяется по всей территории ядра в виде мелкодисперсных глыбок (см. рис. 4.34; 4.35). В ядре содержится большое количество поровых комплексов, что отражает активность ядерно-цитоплазматического транспорта макромолекул. В цитоплазме остеобластов присутствует значительное количество канальцев гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС) с четкими электронно-плотными гранулами рибосом на поверхности мембран (см. рис. 4.34; 4.35). Часть канальцев гЭПС расширена в цистерны, которые заполнены продуктами биосинтеза клетки, имеющими низкую электронную плотность.

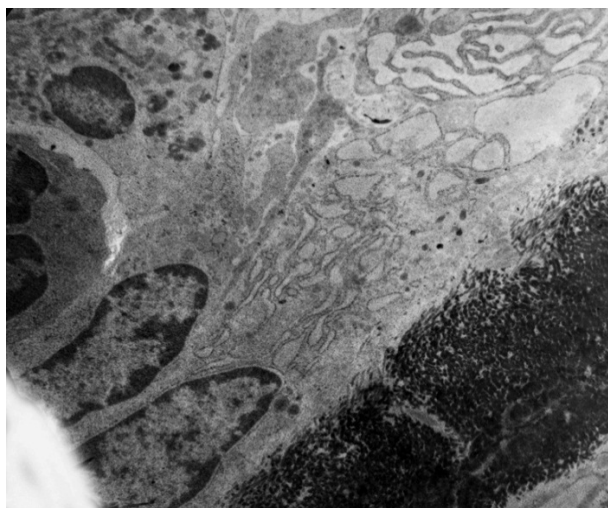


Рис. 4.35. Слой функционально активных остеобластов (в виде симпласта) на поверхности неминерализованного остеоида. Множество канальцев и цистерн гЭПС в цитоплазме остеобласта. Ув. 10000. Контрастирование по Рейнольдсу.

Такая ультраструктурная организация остеобластов свидетельствует об их высокой биосинтетической активности в отношении продукции компонентов экстрацеллюлярного матрикса костной ткани, преимущественно, коллагена I типа. Вблизи ядра локализован комплекс Гольджи в виде различных по размерам секреторных пузырьков, заполненных аморфным материалом низкой электронной плотности. В цитоплазме остеобластов присутствует множество свободных рибосом и полисом.

Остеоциты, присутствующие в костных трабекулах, представлены гетероморфной популяцией клеток. В поверхностных слоях костных трабекул присутствуют остеопластические остеоциты, которые практически полностью заполняют полость лакуны. В ядре таких остеоцитов преобладает эухроматин, хотя удельный вес гетерохроматина в них, по сравнению с остеобластами, повышен. В цитоплазме остеоцитов выявляются отдельные поперечно срезанные каналцы гЭПС и единичные лизосомы (рис. 4.36).



Рис. 4.36. Функционально активный остеоцит в лакуне. Поперечно срезанные каналцы гЭПС. Перилакунарно расположенные коллагеновые волокна. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

Со стороны остеócита, обращенной к поверхности костной трабекулы, в перилакунарном костном матриксе выявляются продольно ориентированные коллагеновые волокна с характерной поперечной исчерченностью (см. рис. 4.36), что указывает на сравнительно непродолжительное время образования лакуны и неполную ее минерализацию.

В более глубоких отделах костных трабекул содержатся остеócиты, в ядрах которых преобладает гетерохроматин, что свидетельствует о снижении их функциональной активности. Ядерные поры в таких клетках единичные, при этом в цитоплазме присутствуют лизосомы, что указывает на завершение остеопластической функции таких клеток и активизацию в них литических процессов (рис. 4.37).

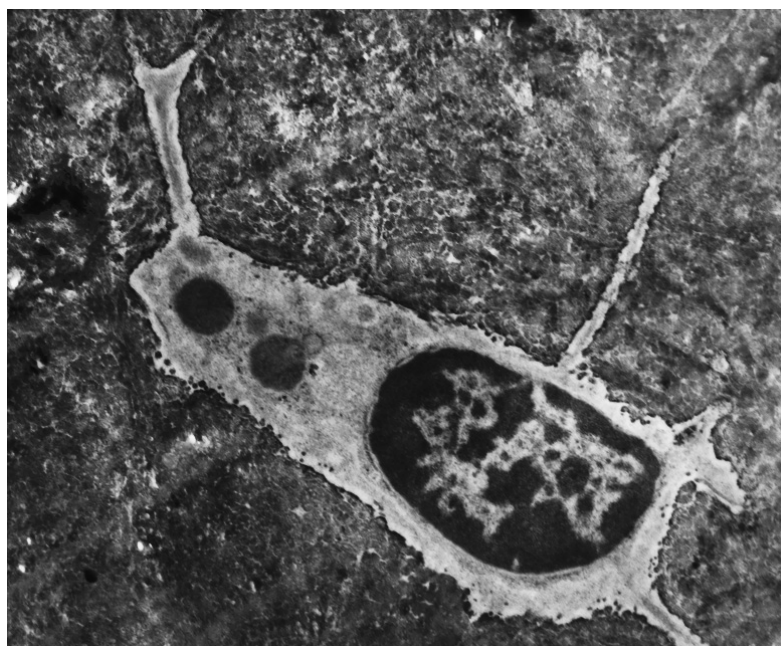


Рис. 4.37. Остеócит с множеством костных канальцев в костной лакуне. Гетерохроматизация клеточного ядра. Единичные ядерные поры. Крупные лизосомы в цитоплазме остеócита. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 15600.

Вблизи поверхности костных трабекул зафиксировано наличие небольших единичных остеокластов с четкой гофрированной каемкой, что указывает на их участие в процессе костной резорбции.

4.2.2. Организации губчатой кости 24-месячных крыс после гипотермии

1 сутки после гипотермии. При микроскопическом исследовании полутонких срезов 24-месячных животных выявлено, что гипотермия оказывает такое же влияние на костную ткань и костный мозг, как и у 6-месячных животных. В костной ткани располагаются пустые лакуны без остеоцитов, костный матрикс трабекул неравномерно окрашен (рис. 4.38). В области кровеносных сосудов в костных каналах обнаруживаются гомогенные базофильные массы.

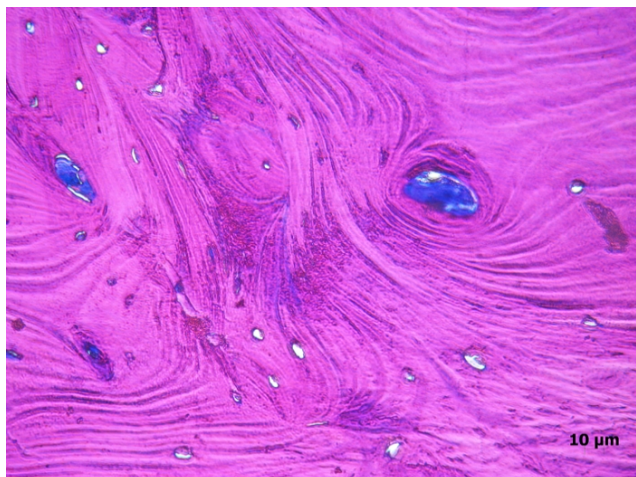


Рис. 4.38. Пустые лакуны в костной трабекуле. Детрит в области костных каналов. Расслоение матрикса. Опытные животные. Полутонкий срез. Окраска по Арагисю. Ув. 1000.

В костном мозге обнаруживаются остеокласты, прилежащие к краевой поверхности костных трабекул с лизированными ядрами и гомогенной цитоплазмой (рис. 4.39), что свидетельствует об их деструкции. Определяется деструкция мегакариоцитов, пикноз и лизис нейтрофилов и лимфоцитов (см. рис. 4.39). Остеокласты, прилежащие к поверхности костных трабекул содержат ядра-тени. Остеобласты, вытянутой формы, располагались по краевой поверхности костных трабекул. Они имели гомогенную цитоплазму и лизированные ядра.

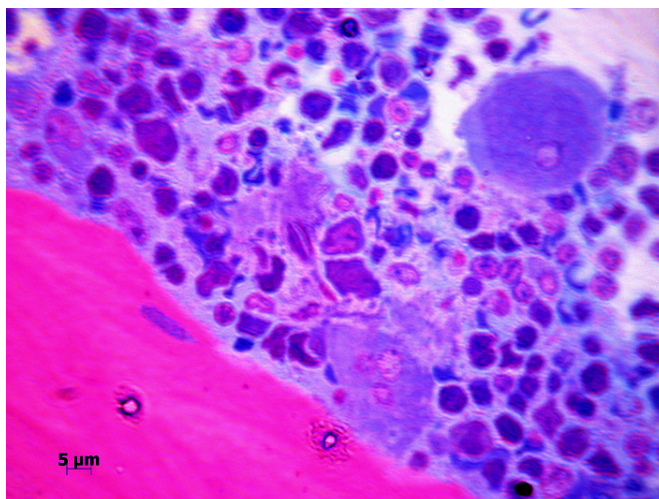


Рис. 4.39. Красный костный мозг. Лизис остеокластов. Мегакариоцит с гомогенной цитоплазмой. Пикноз лимфоцитов и нейтрофилов. Деструкция клеток. Полутонкий срез. Окраска по Арагисіо. Ув. 1000.

3 суток после гипотермии. Через 3 суток после гипотермии в губчатой кости на поверхности костных трабекул выявлялись остеобласты, содержащие очаги деструкции канальцев гЭПС и митохондрий, вторичные лизосомы и остаточные тельца в цитоплазме (рис. 4.40).

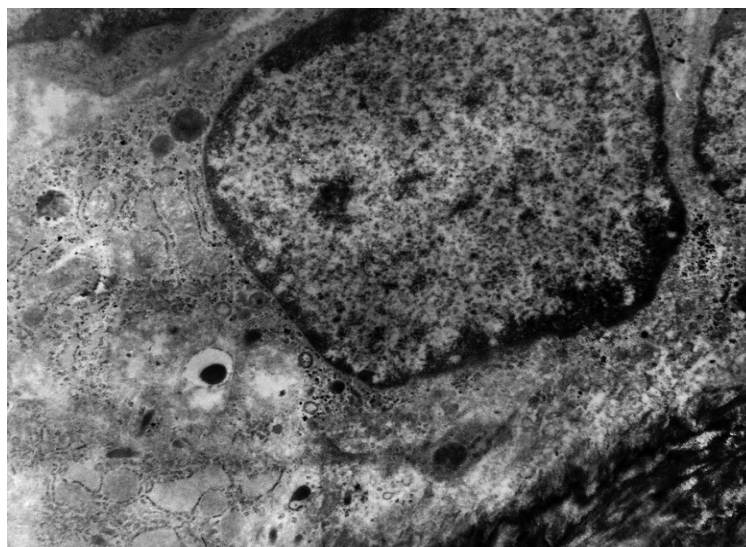


Рис. 4. 40. Остеобласт на поверхности костной трабекулы. Цитоплазма остеобласта с вторичными лизосомами и остаточными тельцами. Очаги деструкции канальцев гЭПС и митохондрий. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

Местами отмечены клетки, имеющие характерную для нормы ультраструктурную организацию (в состоянии функциональной активности с параллельно и concentрически ориентированными канальцами гЭПС) (рис. 4.41).



Рис. 4.41. Функционально активный остеобласт на поверхности костной трабекулы. Удлиненное ядро с преобладанием эухроматина. Concentрически расположенные канальцы гЭПС. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

В остеоцитах выявляются участки деструкции цитолеммы, в цитоплазме присутствуют электронно-плотные включения (рис. 4.42).



Рис. 4.42. Остеоцит с электронноплотным включением в цитоплазме. Деструкция цитолеммы. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув.15600.

Встречаются остеоциты с деструктивными полостями в цитоплазме, при этом по периметру полостей имеет место скопление электронно-плотного материала, возможно солей кальция (рис. 4.43).



Рис. 4.43. Остеоцит с крупным овальным ядром. Очаги деструкции цитоплазмы. Электронноплотные массы по периметру полостей деструкции. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 15600.

Нередко в расширенных лакунах резорбционного типа с неровными зазубренными краями выявляются остеоциты с узким ободком цитоплазмы, локализованные (рис. 4.44).

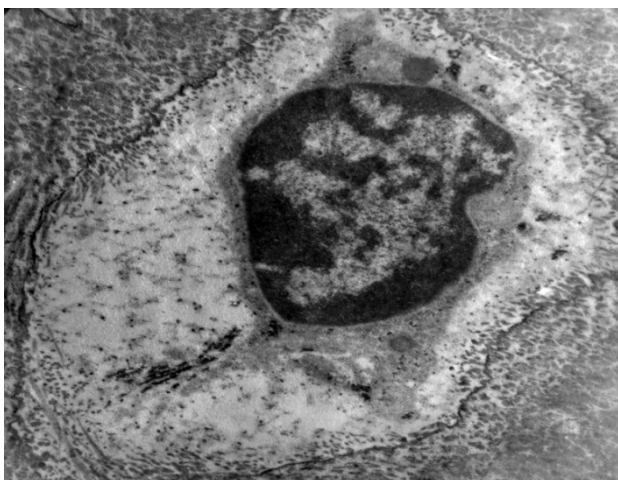


Рис. 4.44. Остеоцит с узким ободком цитоплазмы в расширенной лакуне резорбционного типа. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 20400.

Присутствие таких остеоцитов свидетельствует об активизации в костной ткани остеоцитарного остеолиза. Часть лакун не содержит остеоцитов (рис. 4.45), либо же в них выявляется клеточный детрит. На участках в перилакунарных областях имеет место пятнистая кальцификация матрикса (см. рис. 4.45).

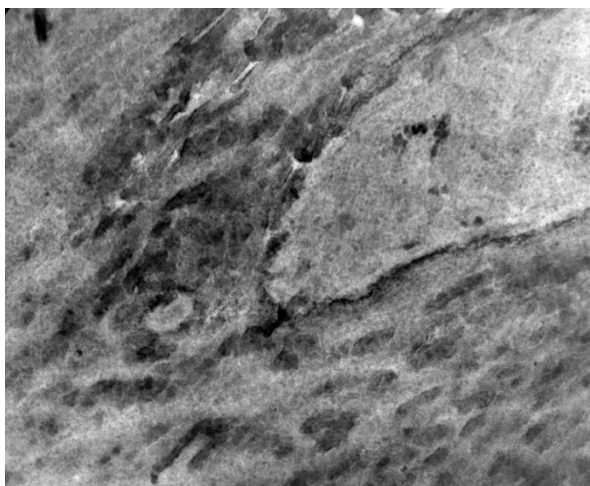


Рис. 4.45. Пустая лакуна без остеоцита. Пятнистая кальцификация матрикса. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 25200

На поверхности костных трабекул выявляются многоядерные остеокласты, количество ядер в которых достигает 5-ти и более (рис. 4.46).

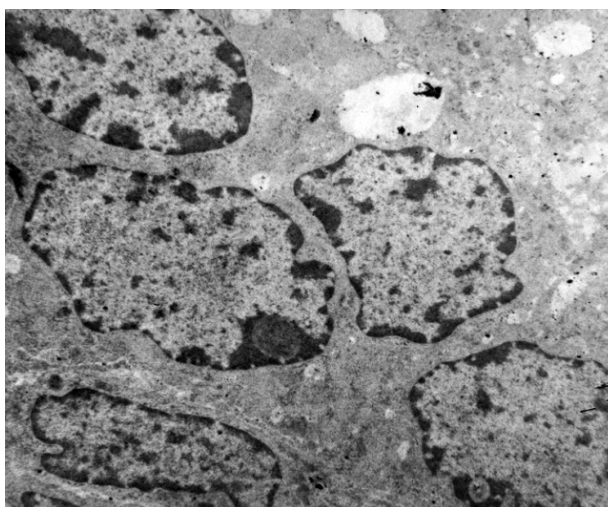


Рис. 4.46. Функционально активный остеокласт с 5^ю ядрами на поверхности костной трабекулы. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Такие клетки непосредственно задействованы в процессе резорбции кости, на что указывает наличие в них гофрированной каемки, обилия лизосом и вакуолей.

В цитоплазме функционально активных остеокластов содержится большое количество мультивезикулярных и остаточных телец (рис. 4.47). Такие остеокласты локализуются вблизи гемокapилляров, в структуре эндотелия которых имеются выраженные нарушения – отростки эндотелиальных клеток не контактируют между собой и расположены на значительном расстоянии друг от друга (см. рис. 4.47), что указывает на нарушение проницаемости капилляров. Вблизи таких капилляров отмечены явления плазморрагии.

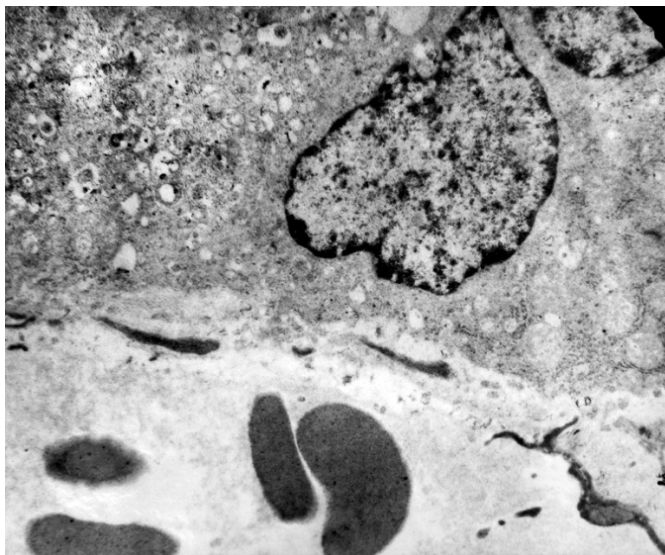


Рис. 4.47. Остеокласт с двумя ядрами и множеством мультивезикулярных и остаточных телец в цитоплазме, расположенный на эндостальной поверхности кости. Вблизи остеокласта – гемокapилляр синусоидного типа с деструкцией эндотелия. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Вблизи резорбционной полости на поверхности кости присутствуют также остеокласты с многочисленными вакуолями, мультивезикулярными и остаточными тельцами, митохондриями в цитоплазме (рис. 4.48). Однако такие остеокласты не контактируют с поверхностью кости и не содержат гофрированной каемки, что свидетельствует о том, что они уже завершили

процесс резорбции и удаляются от костной поверхности, т.е., имеет место следующая стадия костного ремоделирования, именуемая инверсией.



Рис. 4.48. Остеокласт с многочисленными мультивезикулярными и остаточными тельцами, митохондриями в цитоплазме вблизи костной поверхности. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

5 сутки после гипотермии. В костной ткани сохранялись деструктивные нарушения, характерные для предыдущего срока исследования – лакуны без остеоцитов или с детритом, трещины и щели (рис. 4.49).

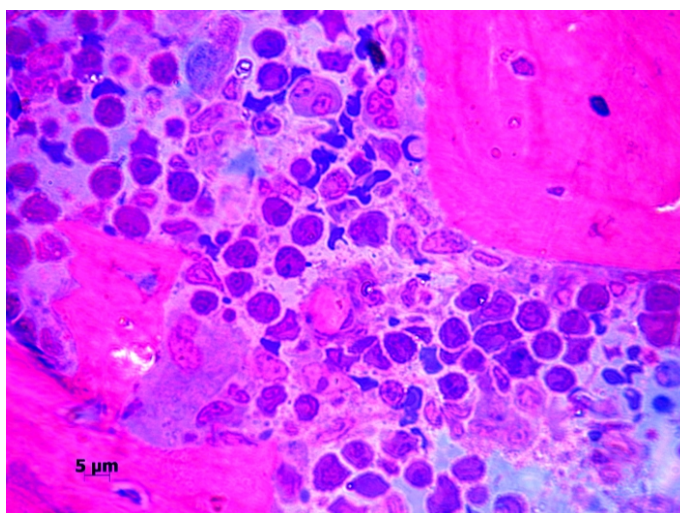


Рис. 4.49. Полутонкий срез. Красный костный мозг. Костные трабекулы. Остеокласт с гомогенной цитоплазмой. Лимфоциты и нейтрофилы. Деструкция клеток. Окраска по Арагисіо. Ув. 1000.

Крупные остеокласты располагались вблизи очагов деструкции костной ткани. В костном мозге среди деструктивно разрушенных клеток (рис. 4.50) обнаружены нейтрофилы и лимфоциты, которые возможно было идентифицировать. На краевой поверхности костных трабекул находились остеобласты, некоторые из них были лизированы.

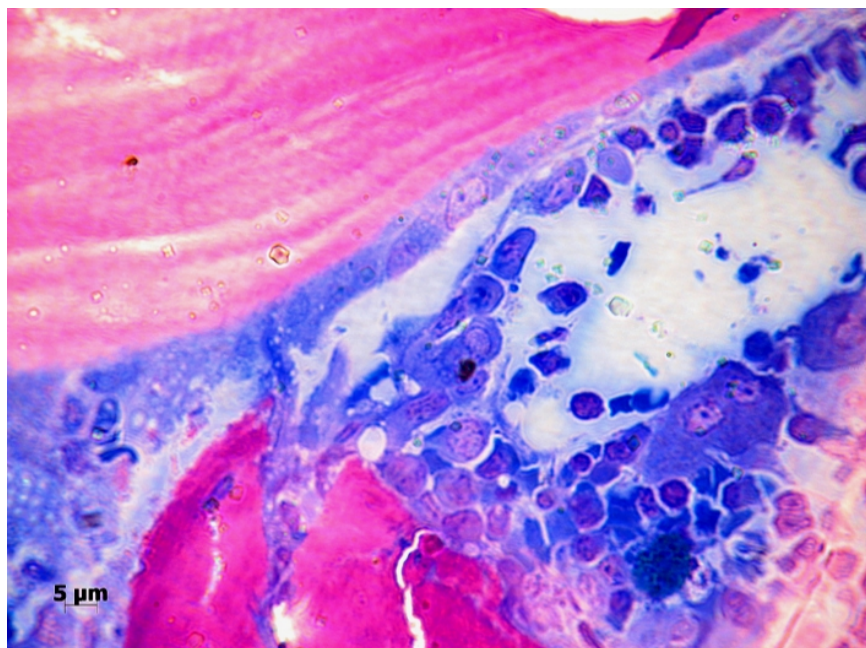


Рис. 4.50. Полутонкий срез. Красный костный мозг. Фрагменты костных трабекул. Скопления остеобластов в области резорбции. Остеокласт. Окраска по Арагисію. Ув. 1000.

При электронно-микроскопическом исследовании в губчатой кости дистального метафиза бедренной кости крыс на поверхности костных трабекул обнаружены остеобласты, в цитоплазме которых повышена плотность вторичных лизосом. Митохондрии выполнены аморфным гомогенным веществом умеренной электронной плотности, дифференциация на кристы отсутствует (рис. 4.51).

Известно, что митохондрии являются наиболее чувствительными структурами в клетке, раньше других органоидов реагирующими на неблагоприятные воздействия, какими в данном случае является гипотермия. Нарушение энергетического снабжения в остеобластах сказывается на течении

процессов биосинтеза, а также инициирует структурные повреждения других мембранных органелл.



Рис. 4.51. Остеобласты на поверхности остеоида. Аморфная структура митохондрий, вторичные лизосомы в цитоплазме. Остеоцит остеоида. Неминерализованные стенки лакуны остеоцита. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Под слоем остеобластов выявляется не минерализованный остеоид. На границе минерализованной и не минерализованной кости в формирующемся остеоиде обнаруживаются остеоциты, имеющие частично сформированную стенку лакуны (см. рис. 4.51). В отдельных остеоцитах определяются участки нарушения целостности ядерной мембраны и незначительное расширение перинуклеарного пространства. Полость лакуны таких остеоцитов на участках расширена и заполнена тканевой жидкостью.

В некоторых остеобластах имеются очаги гомогенизации цитоплазмы (рис. 4.52).

7 сутки после гипотермии. В костной ткани и в красном костном мозге присутствовали деструктивные и репаративные проявления.

Деструктивные проявления заключались в формировании расширенных пустых лакун, в которых отсутствовали остеоциты (рис. 4.53).

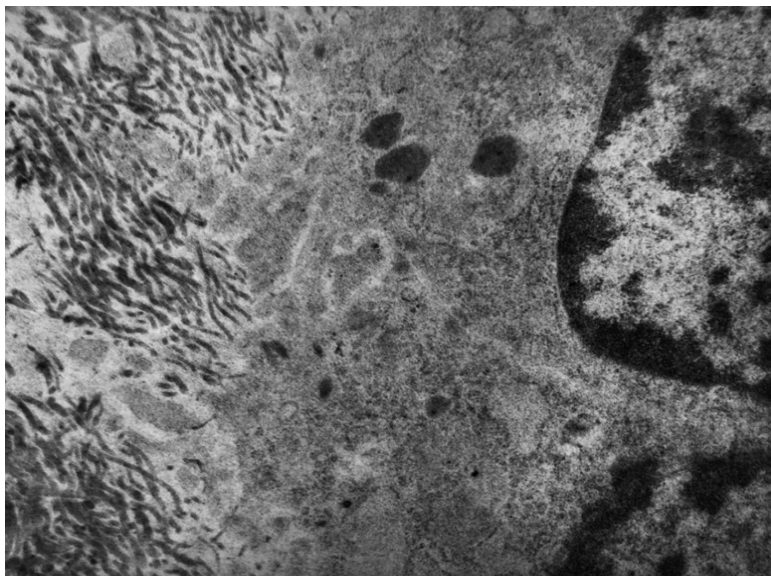


Рис. 4.52. Фрагмент остеобласта со вторичными лизосомами в цитоплазме. Очаги гомогенизации цитоплазмы остеобласта. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 15600.

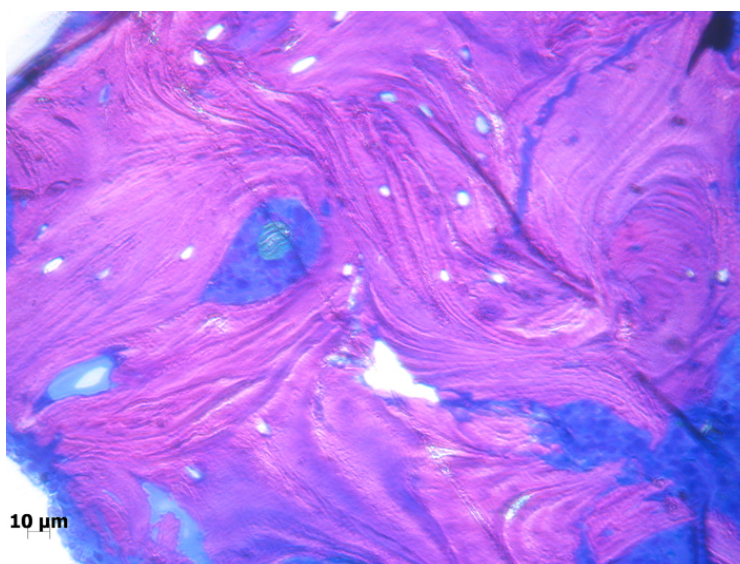


Рис. 4.53. Расширенные пустые лакуны. Окраска по Апаризию. Ув. 400.

Наряду с такими лакунами, выявлены лакуны, в которых находились остеоциты с округлыми слабо базофильными ядрами, четкой цитоплазмой с низкой плотностью мембранных органелл. Подобные остеоциты отмечены и в

матриксе животных контрольной группы, что свидетельствует об их жизнеспособности, но низкой метаболической активности.

Поверхность костных трабекул на значительном протяжении покрыта слоем функционально активных остеобластов с овальным ядром, представленным преимущественно, гетерохроматином, локализованным на внутренней поверхности ядерной мембраны и распределенным в виде мелкодисперсных глыбок по всей территории ядра. В ядре выявлено большое количество ядерных пор.

Цитоплазма остеобластов содержит множество расширенных цистерн гЭПС, заполненных мелкозернистым материалом умеренной электронной плотности (рис. 4.54). Такая ультраструктурная организация гЭПС свидетельствует о ее гипертрофии, что, вероятно, обусловлено нахождением клетки в состоянии функционального перенапряжения, приводящего к истощению ее резервов и дальнейшей дегенерации.

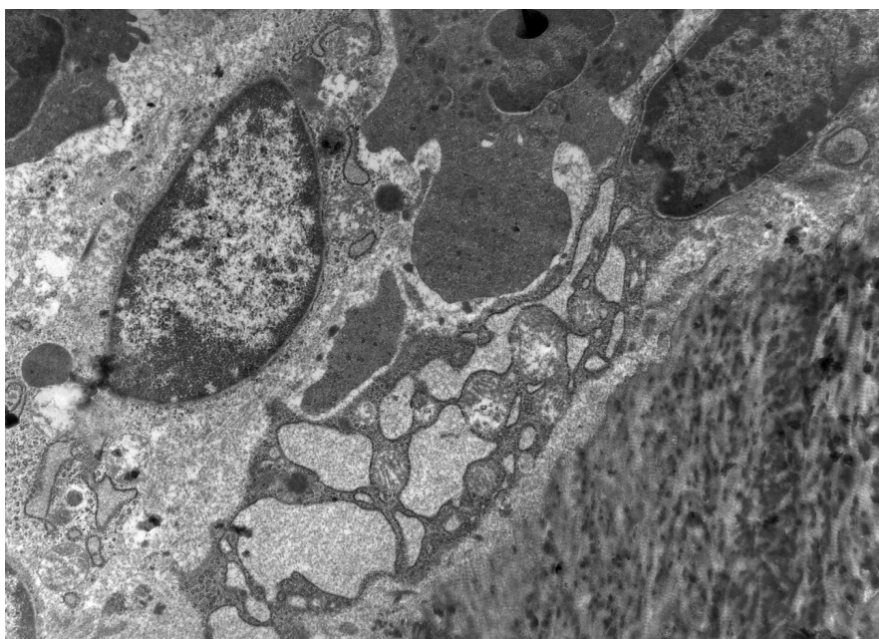


Рис. 4.54. Остеобласт на поверхности костной трабекулы. Гипертрофия канальцев гЭПС и митохондрий. Цистерны гЭПС с мелкозернистым содержимым. Преостеобласт с эухромным ядром, расположенный над функционально активным остеобластом. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

Между цистернами гЭПС локализованы крупные овальные митохондрии с частично просветленным матриксом. В областях просветления матрикса кристы не определяются, что, по-видимому, свидетельствует о нарушении проницаемости митохондриальной мембраны, приводящей к отеку митохондрии и ее дальнейшей деструкции. В других остеобластах кроме гиперплазии (множественные каналцы) и гипертрофии (расширенные цистерны) гЭПС присутствует хорошо развитый комплекс Гольджи в виде многочисленных секреторных пузырьков (рис. 4.55).

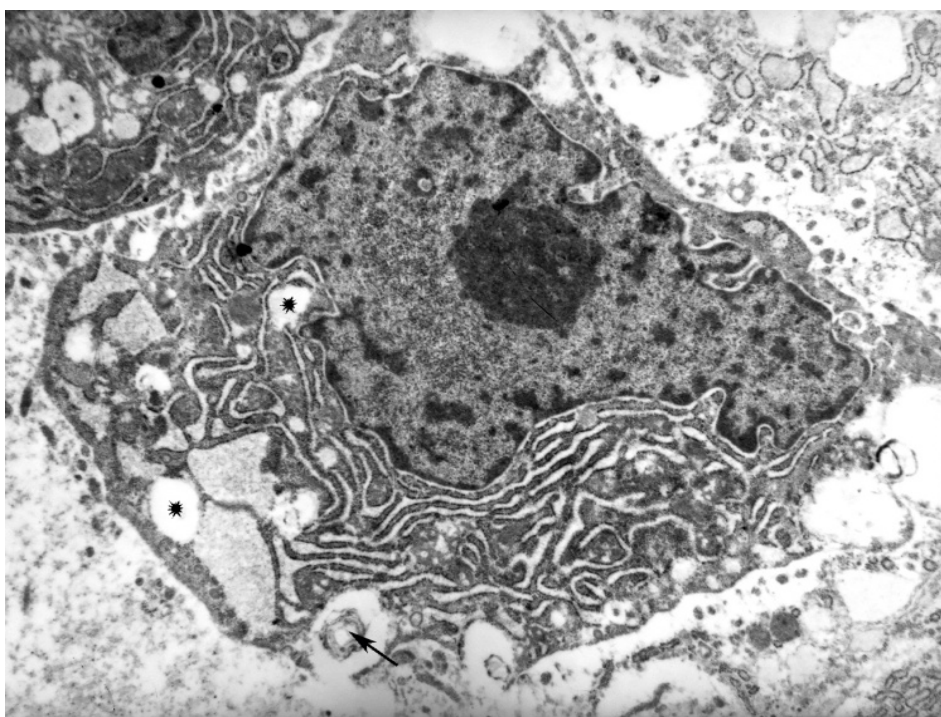


Рис. 4.55. Остеобласт с эухромным ядром и крупным ядрышком. Гиперплазия и гипертрофия гЭПС остеобласта. Гиперплазия комплекса Гольджи. Небольшие очаги деструкции цитоплазмы. Экзоцитоз продуктов деструкции. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

В отдельных остеобластах выявляются очаги деструкции цитоплазмы (рис. 4.56).

Кроме того, обнаружен локальный лизис цитоплазматической мембраны. Вблизи таких участков имеет место экзоцитоз продуктов деструкции (см. рис. 4.55).

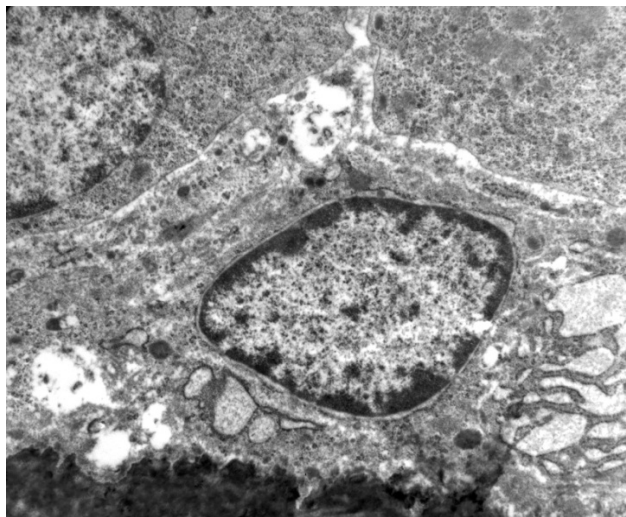


Рис. 4.56. Остеобласт с полостями деструкции в цитоплазме, расположенный на минерализованной поверхности кости. Участки лизиса в цитоплазме. Преостеобласты с крупным эухромным ядром и скоплением рибосом в цитоплазме. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

В минерализованном костном матриксе располагаются остеоциты, содержащие ядро с преобладанием гетерохроматина, что указывает на низкую функциональную активность клетки. В цитоплазме таких остеоцитов определяется низкая плотность мембранных органоидов (рис. 4.57), небольшое количество рибосом и лизосомы.

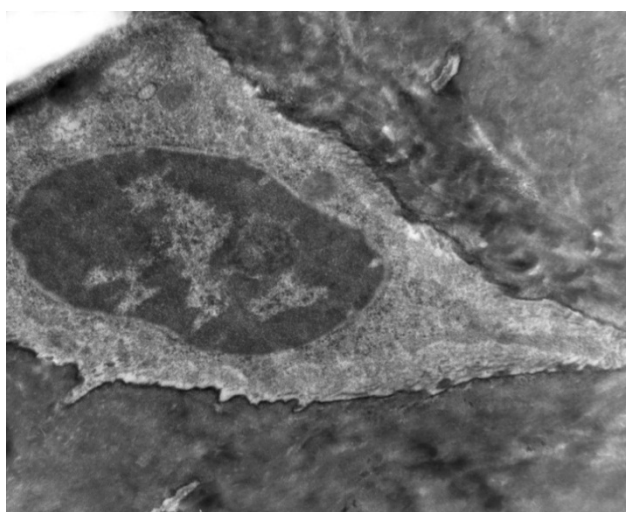


Рис. 4.57. Остеоцит в лакуне. Ядро с преобладанием гетерохроматина. Низкая плотность мембранных органоидов. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 16800.

На минерализованной поверхности костных трабекул выявляются остеокласты в состоянии высокой функциональной активности, содержащие множество митохондрий с частично просветленным матриксом и очагами деструкции крист, вакуолями, мультивезикулярными тельцами и хорошо сформированной гофрированной каемкой (рис. 4.58).

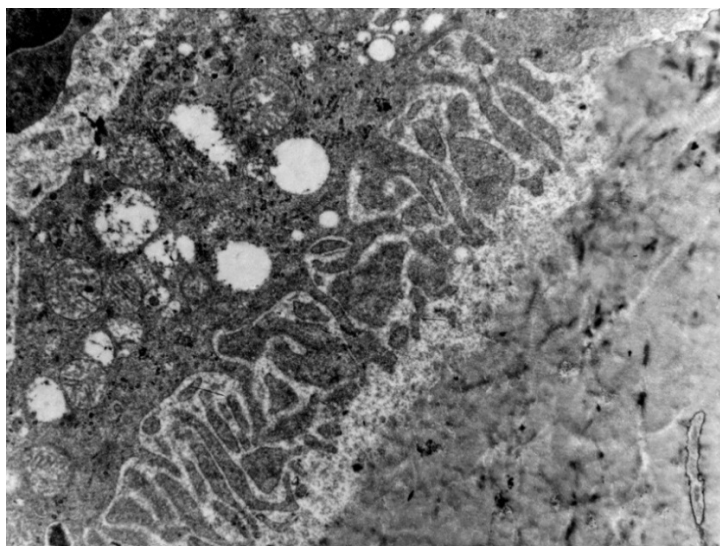


Рис. 4.58. Фрагмент остеокласта с хорошо сформированной гофрированной каемкой. Ядро с преобладанием гетерохроматина. Деструкция митохондрий. Частичное и полное исчезновение крист. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000

В межтрабекулярных пространствах, заполненных красным костным мозгом, выявляются запустевшие синусоиды (рис. 4.59 А, Б). Такое состояние синусоидов указывает на нарушения внутрикостной микроциркуляции после воздействия гипотермии.

14 сутки после гипотермии. На этот срок исследования отмечено повышение остеокластической резорбции на костных трабекулах по сравнению с предыдущим сроком и с аналогичным сроком у 6-месячных животных.

На костных трабекулах имела место высокая плотность крупных остеокластов, расположенных непосредственно на поверхности кости и формирующих полости резорбции.

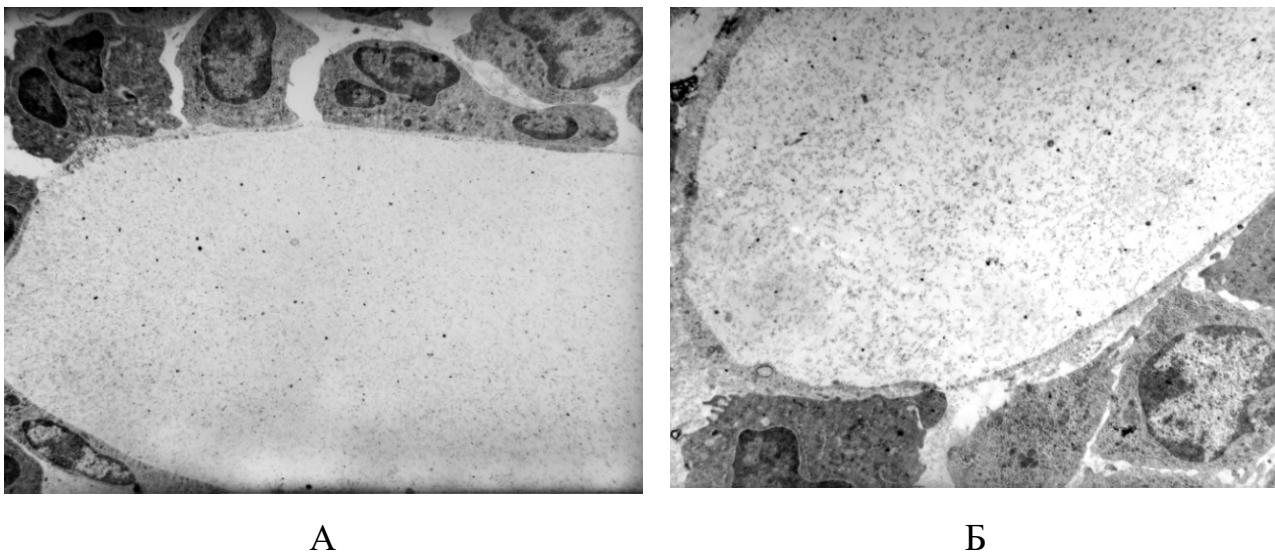


Рис. 4.59. (А, Б). Запустевшие гемокapилляры. Контрастирование по Рейнольдсу. А). Ув. 4000. Б). Ув. 6000.

Только над единичными полостями с остеокластами находились макрофаги, функция которых заключается в очищении поверхности полости и подготовки ее к заполнению остеобластами. Плотность резорбционных полостей, заполненных остеобластами, была низкой. Костеобразование отмечено лишь на единичных костных трабекулах (рис. 4.60).

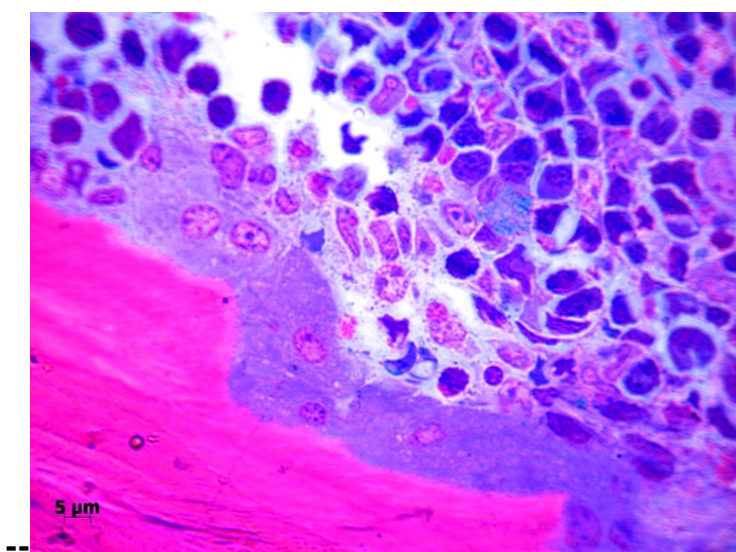


Рис. 4.60. Остеокласты на поверхности костных трабекул. Окраска по Апаризю. Ув. 1000.

На отдельных костных трабекулах по краевой поверхности располагались остеобласты. Как и на предыдущие сроки исследования сохранялись пустые лакуны в матриксе костных трабекул (рис. 4.61).

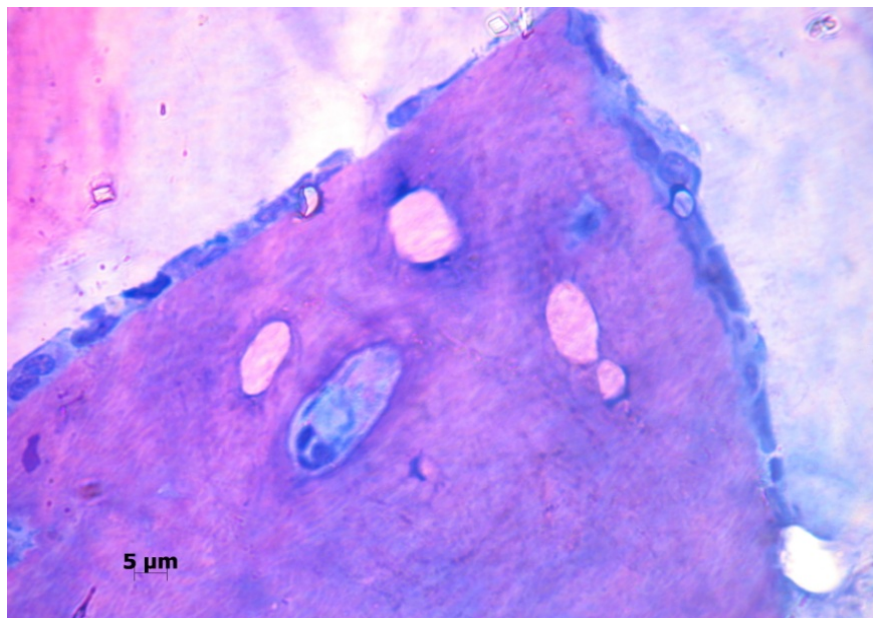


Рис. 4.61. Остеобласты на поверхности костных трабекул. Пустые лакуны в толще матрикса. Опыт. Окраска по Апаризо. Ув. 1000.

28 сутки после гипотермии. На поверхности костных трабекул располагались лакуны с остеоцитами и пустые лакуны. Плотность пустых лакун была высокой. В лакунах, в которых присутствовали остеоциты, обнаруживали клетки с различной окраской ядер: клетки-тени, с признаками пикноза и апоптоза. Также отмечались остеоциты с гипохромным ядром и четкой цитоплазмой. Плотность остеобластов на поверхности костных трабекул была низкой, полости резорбции были с клетками, отражающими различные стадии ремоделирования. При оценке стадий ремоделирования выявлено преобладание лакун резорбции лакун с остеокластами, а также пустых полостей не заполненных остеобластами. В костном мозге имело место восстановление клеток красного костного мозга: располагались нейтрофилы, лимфоциты, мегакариоциты. Однако количество малодифференцированных клеток было низким.

Данные морфометрического исследования ремоделирования губчатой кости 24-месячных животных представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Показатели ремоделирования губчатой кости у крыс 24-месячного возраста на 28-е сутки после гипотермии

Определяемые показатели	Контрольные животные	Опытные животные	P
Объем губчатой кости (костные трабекулы и костный мозг, ус. ед.), n=15	127,07 ± 5,31	121,93 ± 5,65	НД
Объем костных трабекул (%), n=15	54,27 ± 2,95	45,26 ± 2,15	< 0,05
Количество лакун с остеоцитами в поле зрения микроскопа, n=15	41,69 ± 2,05	34,81 ± 2,09	< 0,05
Пустые лакуны остеоцитов в поле зрения микроскопа, n=15	3,77 ± 0,36	19,98 ± 1,02	< 0,001
Количество пустых резорбционных полостей	10,82 ± 0,89	18,84 ± 1,07	< 0,01
Количество резорбционных полостей с остеокластами	7,12 ± 0,65	13,64 ± 1,02	< 0,01
Количество резорбционных полостей, заполненных макрофагами или остеобластами	3,72 ± 0,39	1,95 ± 0,42	< 0,05

Примечание.

P – достоверность различия с контрольной группой.

Как свидетельствуют данные табл. 4.2, объем костных трабекул через 28 суток после гипотермии была снижена на 16,6 % по сравнению с контрольными животными. Кроме того, также было на 16,5 % уменьшено количество лакун с остеоцитами, но повысилась в 5,3 раза плотность лакун без остеоцитов. Количество пустых резорбционных полостей на костных

трабекулах у животных после гипотермии было повышено на 74,1 %, а полостей, заполненных остеокластами – было выше на 91,1 % по сравнению с контролем. Процессы костеобразования были снижены, о чем свидетельствует низкая плотность резорбционных полостей, заполненных макрофагами и остеобластами. По сравнению с контрольными животными этот показатель был снижен на 47,4 %.

Следующим этапом было проведение сравнительного анализа ремоделирования кости у животных 24-месячного возраста с 6-месячными животными (см. табл. 4.1 и 4.2).

Выявлено, что объем костных трабекул у животных 24-месячного возраста после гипотермии была снижена на 15,6 %, количество лакун с остеоцитами также было снижено – на 21,5 %, а количество пустых лакун – было выше на 19,8 % по сравнению с 6-месячными крысами. Выше на 22,5 % у 24-месячных животных были показатели пустых резорбционных полостей. Количество резорбционных полостей, заполненных остеокластами повышено на 33,1 %, а полостей заполненных макрофагами и остеобластами снижено на 46 % по сравнению с 6-месячными опытными животными, что свидетельствует о повышении резорбции кости у 24-месячных животных, а также замедлении процесса костеобразования.

Таким образом, при исследовании действия гипотермии на губчатую кость 24-месячных животных выявлено, что, как и у 6-месячных животных, характерными особенностями проявления действия гипотермии на губчатую костную ткань было: гибель остеоцитов, снижение метаболического потенциала как остеобластов, так и остеоцитов. Как и у 6-месячных животных на 14-е и 28-е сутки после гипотермии, процессы ремоделирования костной ткани у животных 24-месячного возраста активизируются. Однако плотность остеобластов в полостях резорбции и на поверхности кости значительно ниже, чем у 6-месячных животных. С одной стороны, это может быть связано с низкой плотностью полипотентных стромальных клеток в костном мозге, являющихся клетками-предшественниками остеобластов, а с другой стороны,

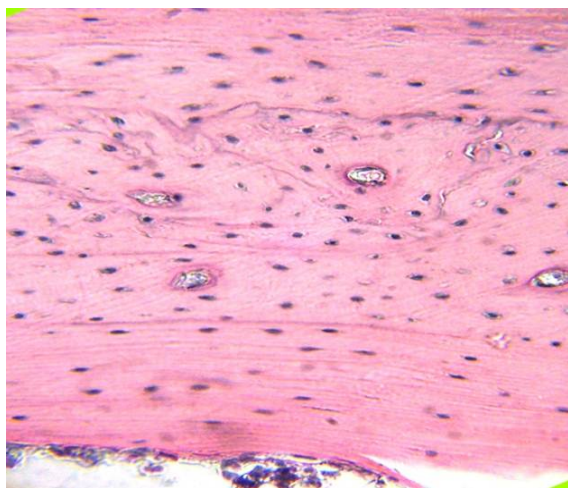
повышением уровня паратгормона, что характерно для людей старческого возраста. Остеоциты в костных трабекулах 24-месячных крыс являются более уязвимыми к действию гипотермии по сравнению с 6-месячными животными, о чем свидетельствуют низкие адаптационно-компенсаторные возможности этих клеток.

РАЗДЕЛ 5

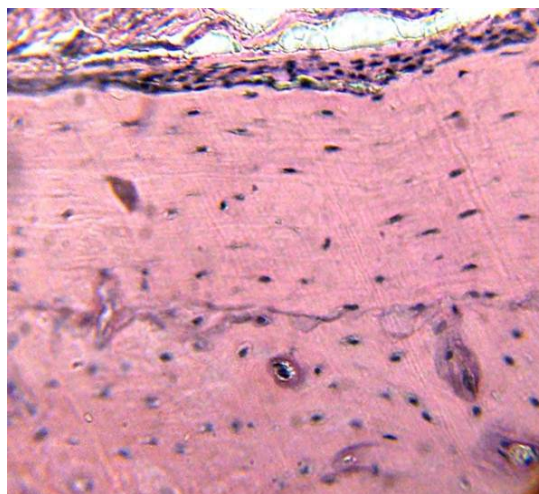
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПАКТНОЙ КОСТИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ГИПОТЕРМИИ

5.1. Особенности структурной организации компактной кости 6-месячных животных после действия гипотермии

Контрольные 6-месячные животные. На поперечных срезах диафизов контрольных крыс выявляется слой внутренних и внешних генеральных костных пластинок со слабо базофильными цементными линиями, а также остеонный слой с различной структурой остеонов и центральными каналами с кровеносными сосудами (рис. 5.1 А). Окраска матрикса кости эозином равномерная, слабо оксифильная. Периост представлен слоем коллагеновых волокон и 2-3 слоями продолговатых, ярко окрашенных клеток фибробластического дифферона (рис. 5.1 Б).



А



Б

Рис. 5.1 (А, Б). А) Слои внешних и внутренних генеральных костных пластинок и остеогенный слой с остеонами. Многочисленные остеоциты. Б) Периост с 2-3 слоями клеток фибробластического дифферона. Ярко

окрашенные остециты в продолговатых лакунах. Контроль. Гематоксилин и эозин. А) и Б) Ув. 400.

На эндостальной поверхности кортекса обнаружены скопления остеобластов в состоянии различной функциональной активности. При электронно-микроскопическом исследовании установлено, что крупные остеобласты содержали эксцентрично расположенное ядро с большим количеством ядерных пор и крупное ядрышко, что указывает на активацию в ядре биосинтеза рибосомальной РНК, что свидетельствует о биосинтезе белка в клетках (рис. 5.2). Практически, весь объем цитоплазмы был заполнен канальцами гЭПС.

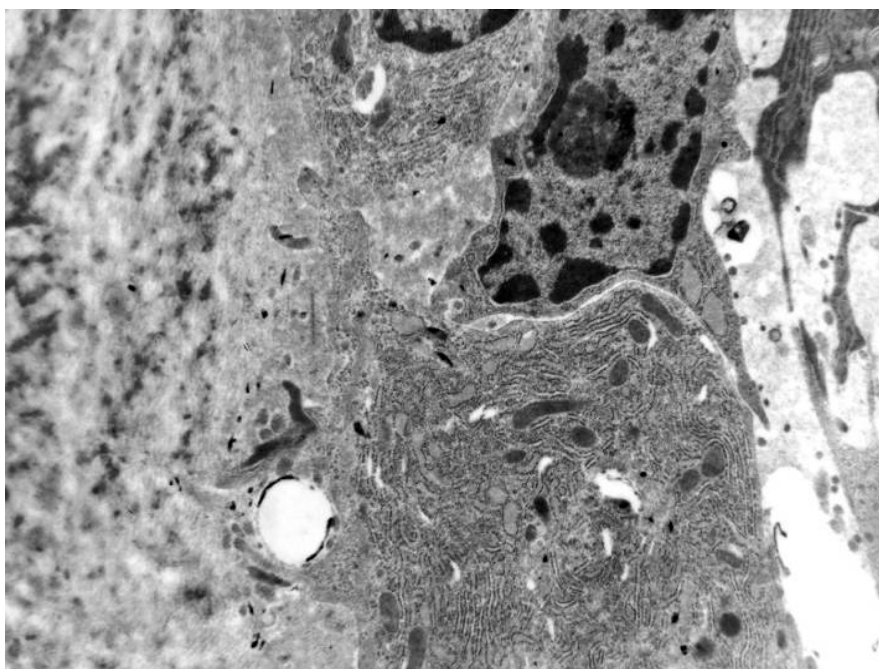


Рис. 5.2. Функционально активные остеобласты на эндостальной поверхности кортекса. Контроль. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Над слоем остеобластов нередко располагались их клетки-предшественники – преостеобласты, содержащие крупное ядро, ядрышко и цитоплазму с канальцами гЭПС (рис. 5.3).

Слой внутренних генеральных пластинок представлен 1-2 слоями костных напластований. Местами на срезе трудно определить границу между остеонным

слоем и слоем внутренних генеральных пластинок. Цементные линии подавляющего большинства внутренних и внешних генеральных пластинок относительно равномерные и имеют слабо выраженную базофильную окраску. Их количество во внешнем слое от трех до пяти.

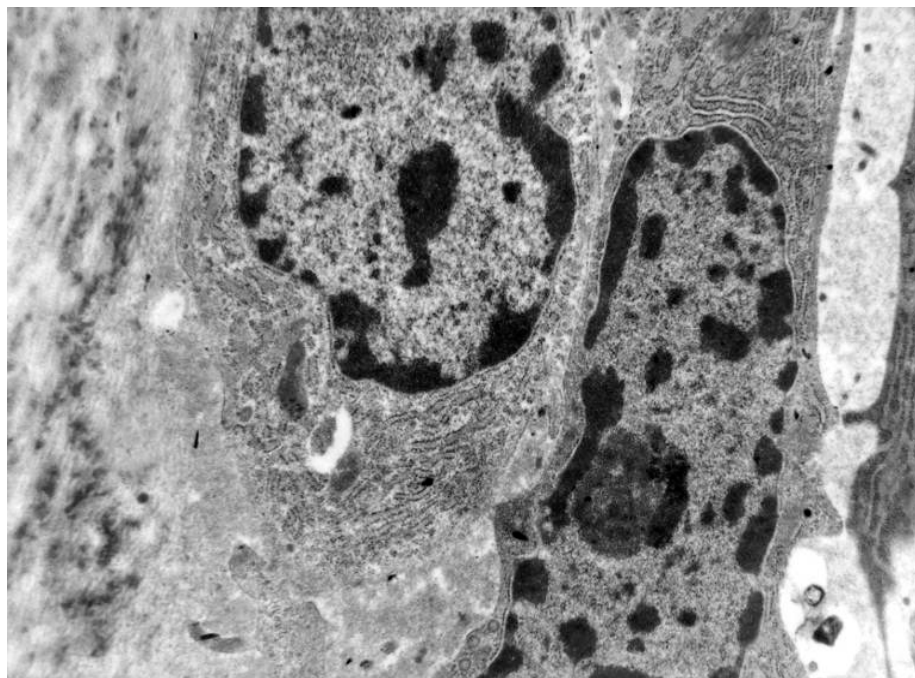
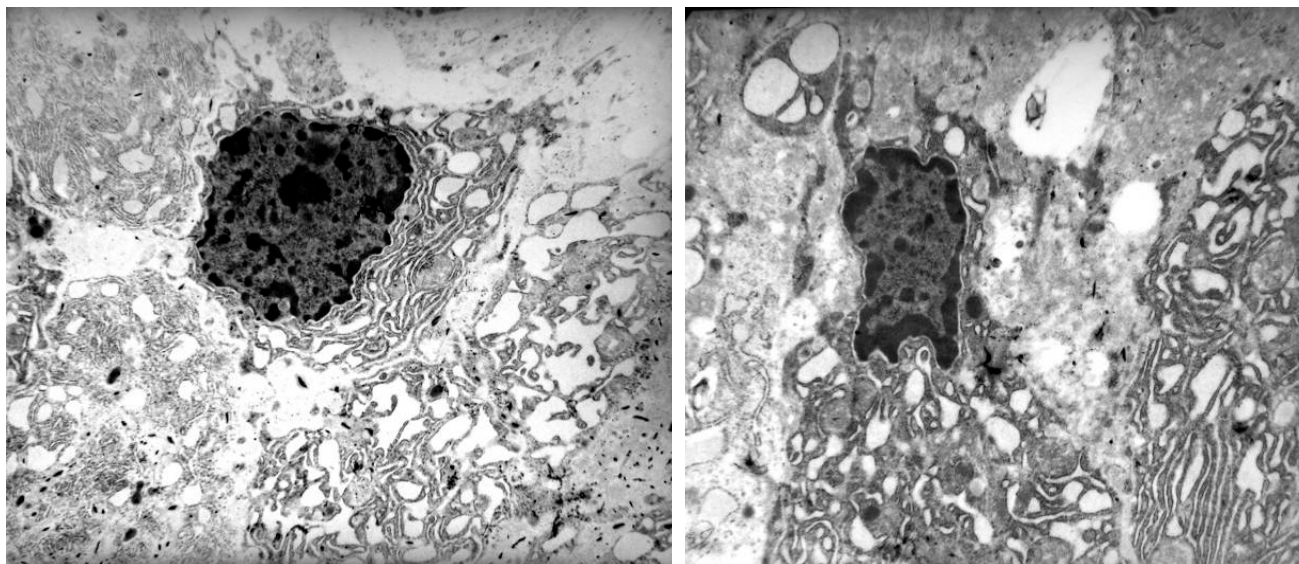


Рис. 5.3. Остеобласт на эндостальной кортикальной поверхности с множеством параллельно ориентированных канальцев гЭПС. Преостеобласт с большим ядром, крупным ядрышком и канальцами гЭПС. Контроль. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

В кортексе остеоны имеют преимущественно форму эллипса, кроме того, обнаруживаются единичные остеоны с неравномерными контурами (см. рис. 5.1 А). Небольшое количество остеонов имеют округлую форму. Костные концентрические пластинки остеонов представлены одной или двумя генерациями костной ткани. Между остеонными конструкциями располагаются вставные пластинки. Центральный сосудистый канал остеона имеет небольшой диаметр и содержат один кровеносный сосуд. В отдельных остеонах наблюдается базофильная окраска стенок центральных каналов (см. рис. 5.1 А, Б), что свидетельствует о неравномерной оссификации.

Отмечены небольшие резорбционные полости, заполненные функционально активными остеобlastами (рис. 5.4), формирующими структуры, подобные симпластам – не имеющие четкой границы между соседними клетками (см. рис. 5.4).

В остеобlastах выявлялась гипертрофированная ЭПС в виде многочисленных, нередко параллельно ориентированных канальцев (см. рис. 5.4). Обильная ЭПС в цитоплазме остеобlastов нередко содержала транспортные везикулы, которые отшнуровывались от канальцев эндоплазматической сети.



А

Б

Рис. 5.4 (А, Б). Функционально активные остеобlastы. Контроль. Контрастирование по Рейнольдсу. А) Ув. 4000. Б) Ув. 6000.

По всей территории срезов диафиза отмечается большое количество ярко окрашенных остеоцитов с ядрами округлой и овальной формы. Большую часть клетки занимает крупное базофильное ядро. Клетки располагаются в продолговатых лакунах (см. рис. 5.1). Местами встречаются единичные пустые лакуны без остеоцитов и остеоциты с пикнотичными ядрами.

При электронно-микроскопическом исследовании установлено, что в центральной части ядер остеоцитов располагается эухроматин. Глубки

гетерохроматина обнаруживались у ядерной мембраны и в кариоплазме среди эухроматина (рис. 5.5).

Вокруг ядра в виде узкого ободка располагалась цитоплазма со слабо развитой гранулярной ЭПС, представленной короткими профилями канальцев, единичными митохондриями и лизосомами.

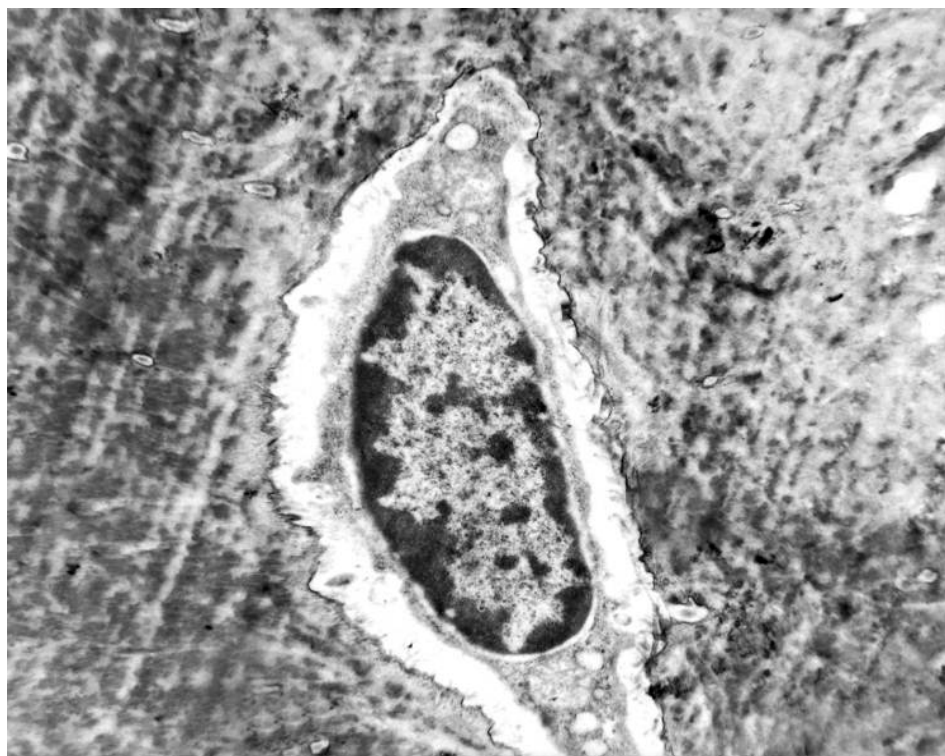


Рис. 5.5. Остеоцит продолговатой формы в лакуне. Крупное овальное ядро с преобладанием эухроматина. Узкий ободок цитоплазмы. Контроль. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

При морфометрическом исследовании установлено, что количество остеоцитов (в поле зрения микроскопа) и лакун без остеоцитов составляет $74,61 \pm 6,61$, среди которых количество лакун без остеоцитов равно $3,61 \pm 0,36$, что составляет 5,1 %. Площадь лакун остеоцитов составляла $50,87 \pm 3,51$ мкм². Количество остеоцитов в поле зрения микроскопа составило $70,72 \pm 6,61$.

По территории срезов диафиза наблюдаются кровеносные сосуды, располагающиеся в центральных каналах остеонов и прободающие костные каналы с сосудами, имеющими узкие просветы, стенки которых слабо

базофильные. В просветах сосудов располагаются клеточные элементы крови (рис. 5.6).

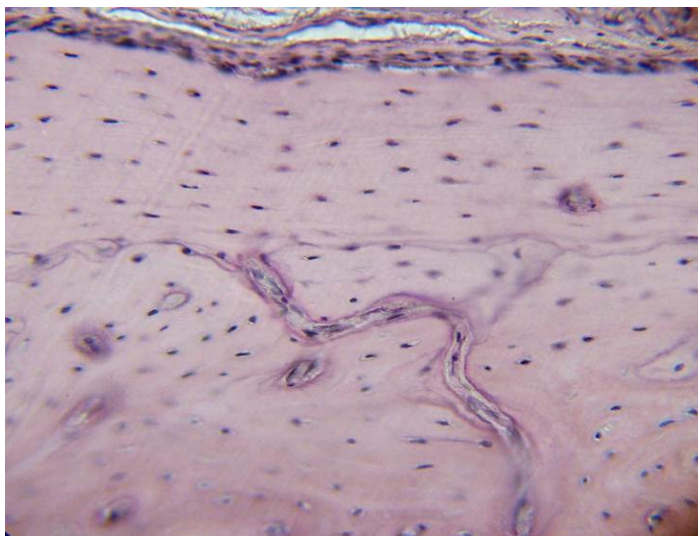


Рис. 5.6. Тонкостенный кровеносный сосуд в костном канале остеонного слоя кортекса крысы с клетками крови в узком просвете. Контроль. Гематоксилин и эозин. Контроль. Ув. 400.

Красный костный мозг в мозговом канале содержит характерные клетки – лимфоциты, нейтрофилы, плазматические клетки и мегакариоциты, различной степени дифференцировки (рис. 5.7). Определяются кровеносные сосуды, заполненные клетками крови.

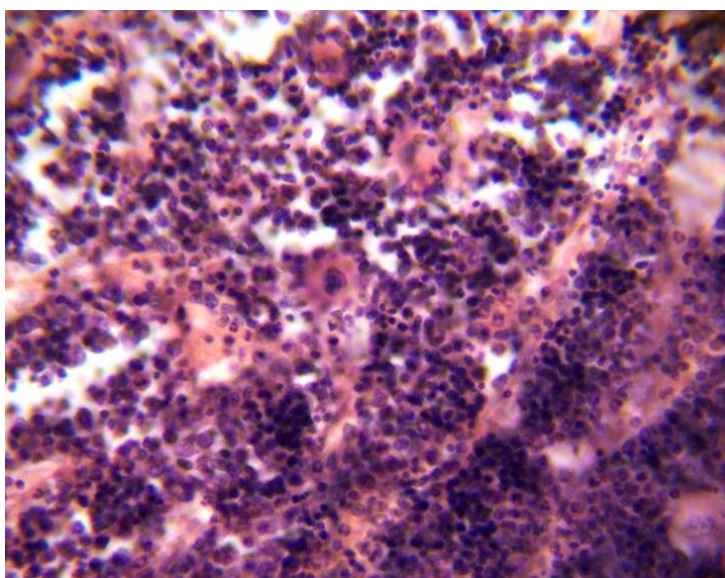


Рис. 5.7. Участок красного костного мозга в мозговом канале с четкой структурой клеток и кровеносными сосудами. Контроль. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

Опытные 6-месячные животные. 7 суток после гипотермии. На срезах диафизов **опытных крыс** в кортексе выявляется слой внешних и внутренних генеральных пластинок, а также остеонный слой с нечеткими, в большинстве случаев, цементными линиями (рис. 5.8 А). Периост, в отличие от контрольных крыс, представлен тонким слоем расслоенных коллагеновых волокон с одним и местами двумя слоями фибробластов (рис. 5.8 Б), большая часть из которых имеют пикнотичные ядра.

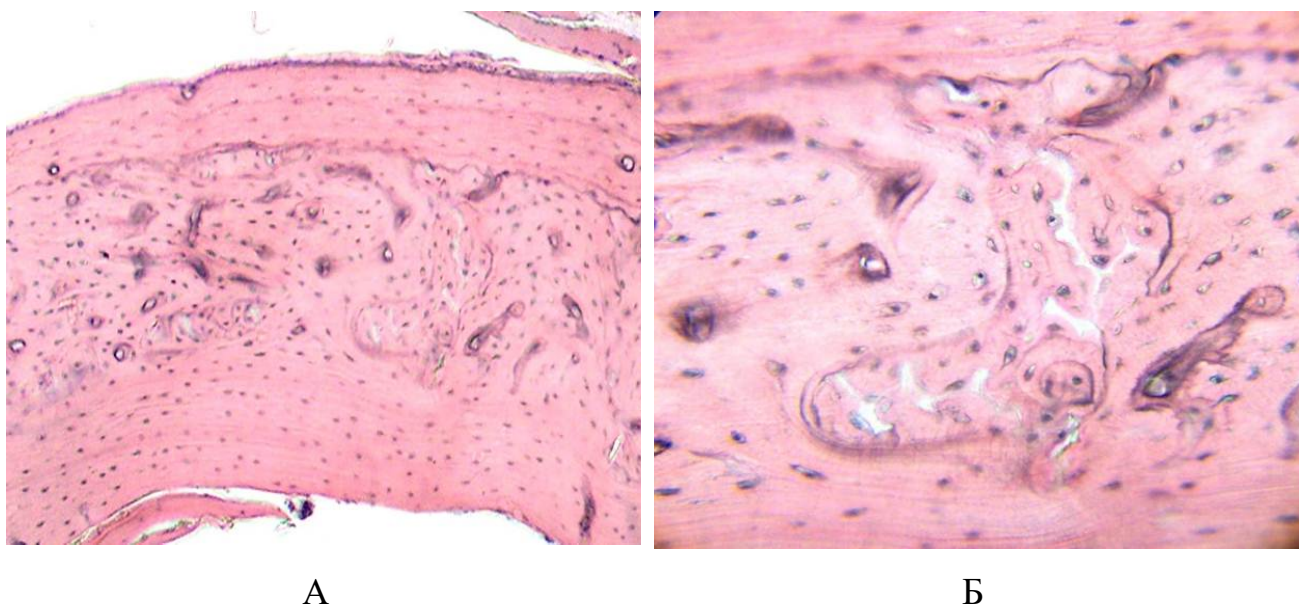


Рис. 5.8 (А, Б). Область диафиза крыс. А) Узкий слой внешних генеральных пластинок. Нарушение структуры остеонного слоя и внутренних генеральных пластинок. Б) Многочисленные поперечные микротрещины, нарушение структуры остеонов в остеонном слое. Базофилия стенок сосудистых каналов, пустые просветы отдельных сосудов. Опыт. Гематоксилин и эозин. А). Ув. 100. Б). Ув. 400.

В слое внешних генеральных пластинок цементные линии неравномерные, отдельные зигзагообразные, выражено базофильные. Это

может свидетельствовать о начальных проявлениях реактивных изменений в костной ткани [45]. Граница между остеонным слоем и слоем внутренних генеральных пластинок определяется не по всей территории кортекса.

В остеонном слое и местами по территории внешних генеральных пластинок обнаруживаются трещины и щели. По сравнению с контрольными животными повышена базофилия стенок сосудистых каналов (см. рис. 5.8).

Структура большей части остеонов нарушена. Остеоны с неравномерными нечеткими цементными линиями имеют разную форму. Вблизи таких остеонов располагаются фрагменты вставных пластинок с неравномерными контурами. Значительная часть остеонов представлена мелкими формами с одной генерацией пластинок и расширенным центральным сосудистым каналом. Большая часть центральных каналов имеет неравномерные и базофильные края (см. рис. 5.8). Некоторые центральные каналы остеонов пустые. Вблизи таких остеонов располагаются трещины, наблюдается повышение базофилии костного матрикса.

Обращает внимание запускание просветов кровеносных сосудов в значительной части костных каналов, повышена базофилия и неравномерны контуры их стенок (рис. 5.9).

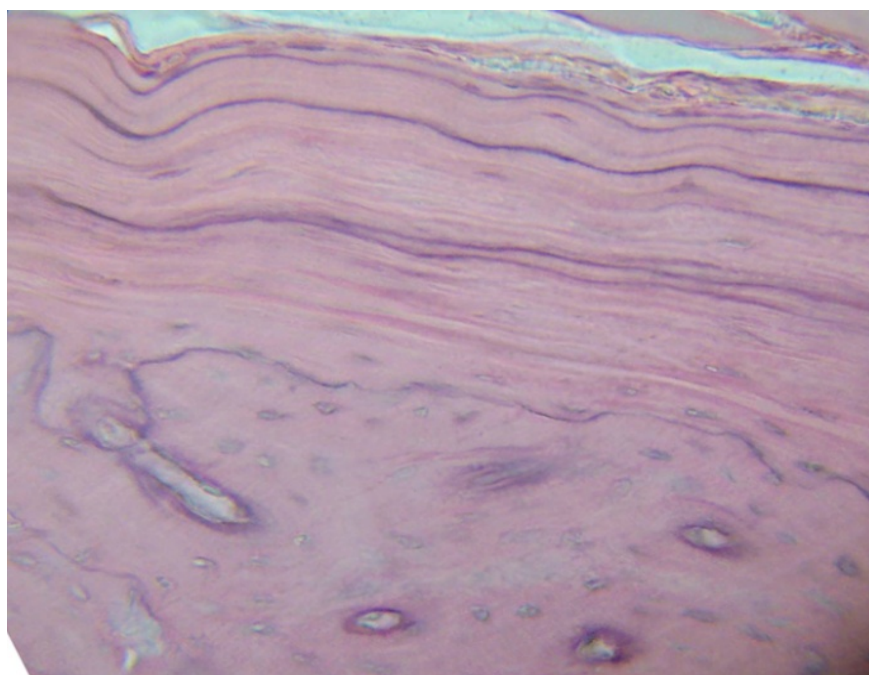


Рис. 5.9. Базофильные линии во внешнем слое костных пластинок. Пустые лакуны остеоцитов и запустевшие сосудистые каналы с базофильными краями. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

Отмеченные изменения в костных каналах диафиза крыс свидетельствуют о негативном влиянии гипотермии на кровоснабжение кости, а это в свою очередь отражается на структурной организации костной ткани. Из данных литературы известно, что состояние костной ткани в значительной степени зависит от структурно-функциональных характеристик микроциркуляторного русла [10, 128]. При проведении других экспериментальных исследований выраженные структурные нарушения в кровеносных сосудах костей крыс и дегенеративные изменения костной ткани наблюдали у крыс, находившихся в течение 28 суток в антиопорностатическом положении [5, 25].

Обращает на себя внимание выраженная неравномерность плотности остеоцитов по территории кости. Отмечаются обширные области с остеоцитами, ядра которых лизированы, а также с пустыми лакунами без остеоцитов. Лакуны в которых отсутствуют остеоциты расширены, некоторые из них имеют неравномерные края (рис. 5.10). Отмечены лакуны, содержащие остеоциты со слабо базофильными ядрами. Со стороны костного мозга по эндостальной поверхности располагаются лентовидные базофильные структуры, вероятно, погибшие остеобласты.

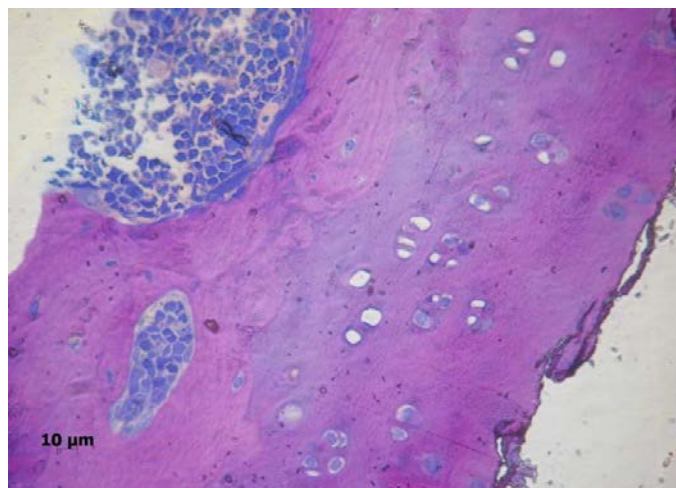


Рис. 5.10. Множество пустых лакун без остеоцитов на участке кортекса бедренной кости. Лакуны, содержащие остеоциты со слабо базофильными ядрами. Опыт. Окраска по Арагизю. Ув. 400.

При электронно-микроскопическом исследовании местами выявлены остеоциты с гетерохроматизованными ядрами и деструкцией цитоплазмы в виде гомогенизации органелл (рис. 5.11). На участках отмечен лизис цитоплазматической мембраны остеоцитов.

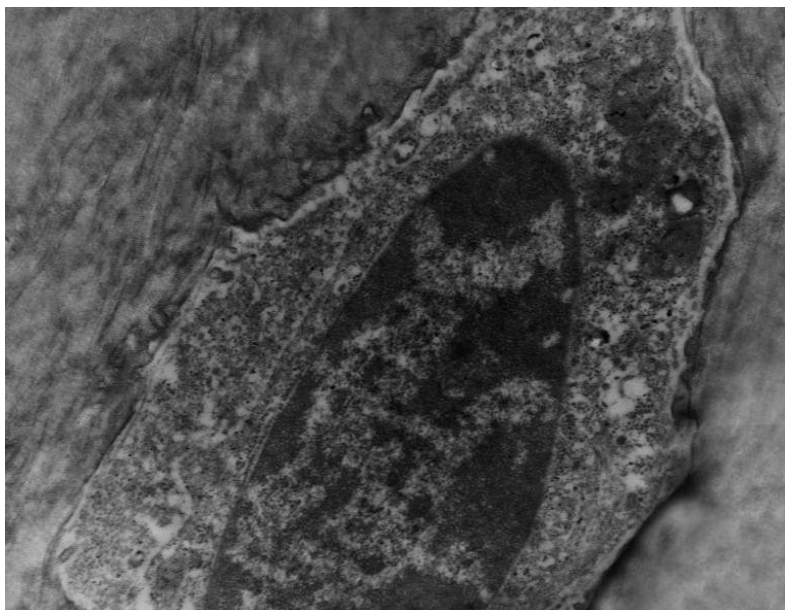


Рис. 5.11. Фотоотпечаток электронограммы участка кортекса. Фрагмент остеоцита с округлым ядром и гомогенной цитоплазмой. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

Остеоциты, сохраняющие структурную организацию, располагались в расширенных костных лакунах резорбционного типа с неровными зазубренными краями (рис. 5.12), что является свидетельством активизации перилакунарной остеоцитарной резорбции.

Известно, что остеоциты являются многофункциональными клеточными элементами кости и их жизнеспособность и функциональная активность имеет большое значение для сохранения структурно – функциональной целостности скелета [1]. Доказано, что остеоциты участвуют в процессах ремоделирования

костной ткани путем остеолизиса и внутреннего лакунарного формирования костного матрикса в зависимости от механических и метаболических воздействий [61, 107, 85].

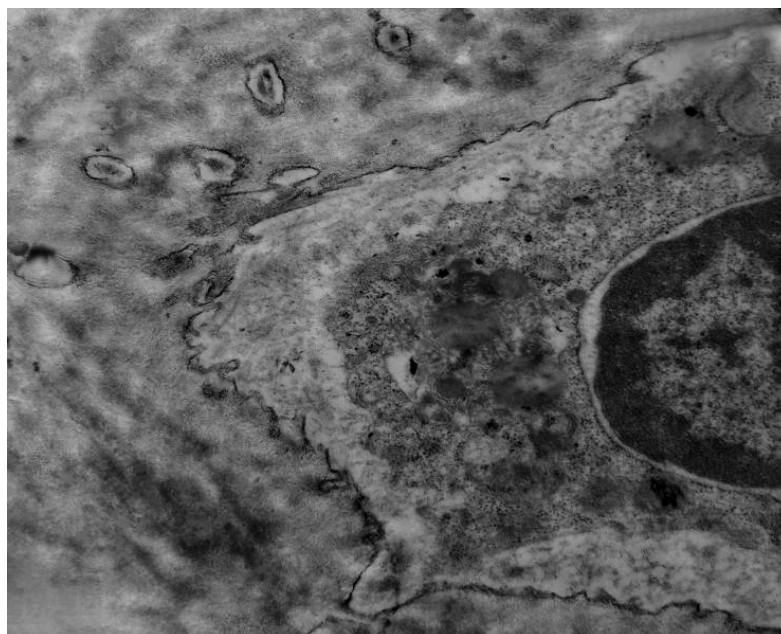


Рис. 5.12. Фотоотпечаток электроннограммы участка кортекса. Фрагмент остеócита в резорбционной лакуне с зазубренными краями. Скопление вторичных лизосом в цитоплазме остеócита. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

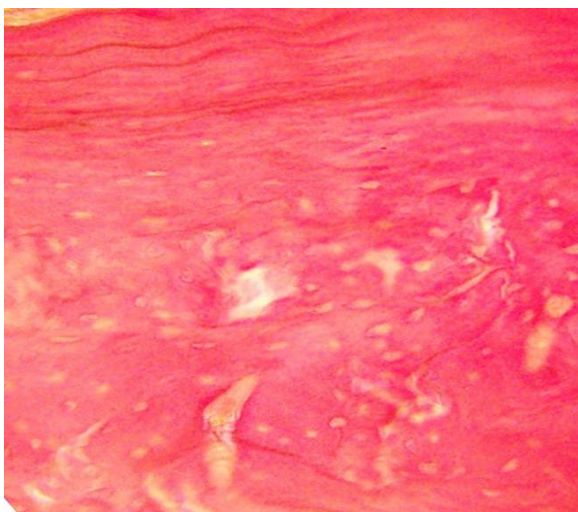
Поэтому можно утверждать, что появление остеócитов с пикнотичными ядрами, пустых лакун без остеócитов в кортексе диафиза крыс опытной группы связано с активизацией остеócитарного лизиса. В литературе имеются данные, что остеócитарный лизис зависит от многих факторов, в том числе и изменения двигательной активности. В условиях гипокинезии наблюдается увеличение количества пустых лакун и увеличение удельной площади расширенных лакун резорбционного типа [24, 130].

При проведении морфометрического исследования кортекса опытных и контрольных крыс выявлено, что общее количество остеócитов и пустых лакун в поле зрения микроскопа составляет $70,52 \pm 5,31$, что достоверно не отличается от показателей контрольных крыс. Однако количество пустых лакун равнялось $22,31 \pm 1,22$ (31,7 %), что было больше в 6,2 раза по сравнению с

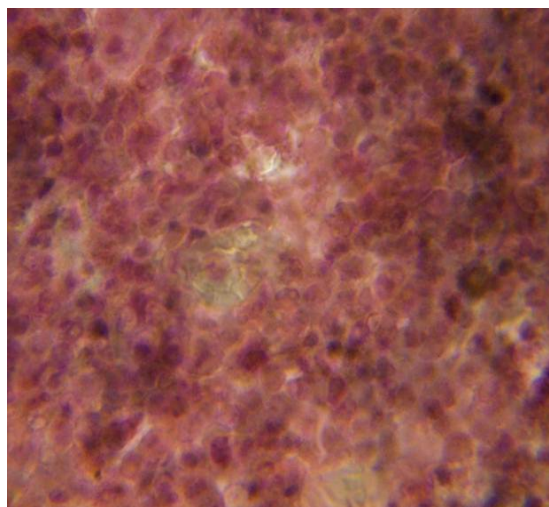
контрольными значениями. Количество остеоцитов было равным $48,21 \pm 2,42$. Площадь лакун имела тенденцию к увеличению, ее показатели составили $56,29 \pm 3,11$ мкм².

Окраска матрикса кости неравномерная, местами имеется выраженная базофилия. На остальных участках матрикс был окрашен слабо оксифильно (рис. 5.13 А). Это может свидетельствовать о реактивных изменениях костной ткани в условиях действия гипотермии.

Красный костный мозг в мозговом канале с клетками, которые имеют нечеткие контуры, большая часть из которых деструктивно изменена. Присутствуют лизированные клетки. Ядра мегакариоцитов нечеткие и в части клеток сохраняются только фрагменты ядерной мембраны (рис. 5.13 Б). Просветы кровеносных сосудов, расположенных в красном костном мозге, деформированы.



А



Б

Рис. 5.13 (А, Б). А) Выраженная неравномерность окраски костного матрикса кортекса. Пустые лакуны остеоцитов. Пикрофуксин по Ван-Гизону. Б) Деструктивно измененный красный костный мозг. Опыт. Гематоксилин и эозин. А). Ув. 400. Б). Ув. 1000.

14 сутки после гипотермии. При исследовании гистологических срезов диафизов контрольных крыс отличий от описанной морфологической картины на 7 сутки не установлено.

У **опытных** 6-месячных крыс на 14 сутки после гипотермии не было отмечено значительных различий в структурной организации компактной кости при сравнении с предыдущим сроком. Деструктивные изменения, выявленные у опытных крыс на 7 сутки после гипотермии, отмечены и на 14 сутки. Они зафиксированы на значительных территориях и касались структуры остеонов, их центральных каналов, плотности остеоцитов и их структурной организации.

На срезах диафизов четко определяется слой внешних генеральных пластинок (рис. 5.14), который занимает около 1/5 части поперечника диафиза и имеет 3-4 базофильные цементные линии.

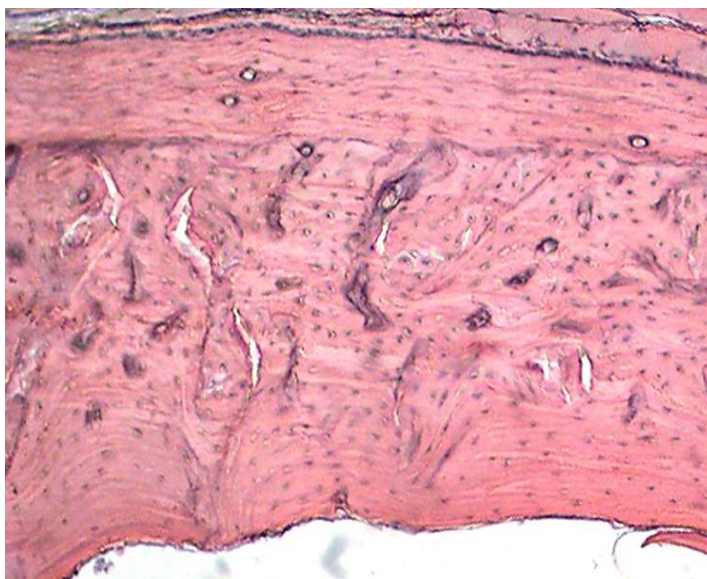


Рис. 5.14. Слой внешних генеральных пластинок, нарушение структуры остеонового слоя и внутренних генеральных пластинок на участке кортекса. Поперечные трещины. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 200.

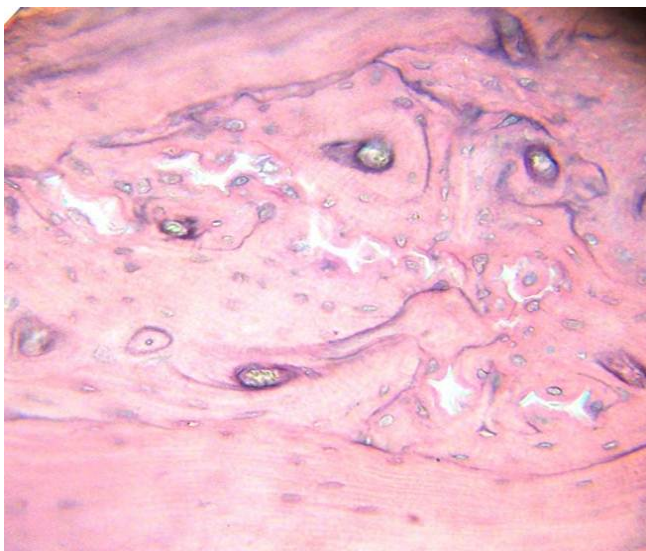
Остеонный слой сравнительно широкий, однако местами сужен, без четкой границы переходит в слой внутренних генеральных пластинок (см. рис. 5.14). Структура остеонов нечеткая, их форма различная. Внешние концентрические пластинки у части остеонов также неравномерны по окраске

и, местами, выражено базофильны. Вблизи некоторых остеонов выявляются обломочные структуры. У части остеонов центральные каналы расширены и пусты, их стенки утолщены и выражено базофильны.

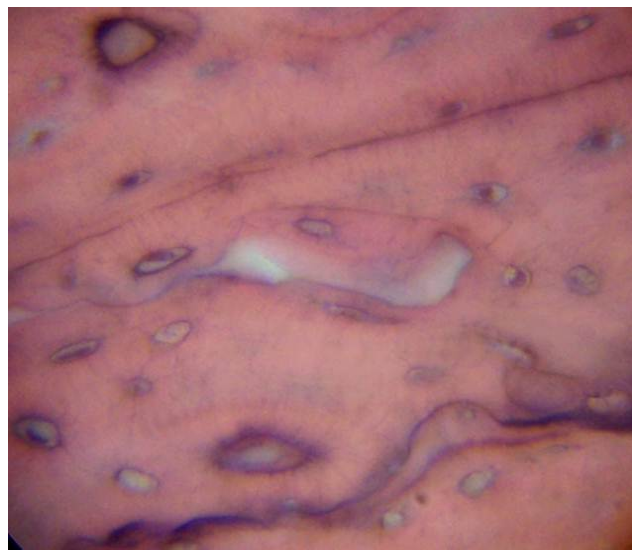
Слой внутренних генеральных костных пластинок неравномерный по протяженности. Его структура местами нарушена за счет проникновения в него вставных пластинок остеонового слоя (см. рис. 5.14). Цементные линии на большей части слоя неравномерны – зигзагообразные, местами с проникновением в остеоновый слой. Кое-где четкость цементных линий не определяется.

Ширина костных пластинок между цементными линиями различная – определяются широкие и узкие пластинки. Наличие линий цементации с «зигзагообразными» контурами различной ширины костных пластинок может свидетельствовать о неравномерности процессов перестройки компактной кости [45, 69].

По всей территории среза диафиза кости располагались мелкие и крупные как продольные, так и поперечные трещины и щели (рис. 5.15 А). Вдоль пластинок между цементными линиями, преимущественно во внешнем слое, выявляются запустевшие костные каналы, участки расслоения костного матрикса и очаги лизиса (рис. 5.15 Б).



А



Б

Рис. 5.15 (А, Б). А) Остеонный слой с многочисленными крупными трещинами в кортексе бедренной кости. Базофилия цементных линий и стенок центральных сосудистых каналов. Б) Пустые лакуны остеоцитов с базофильными краями и остеоциты с пикнотичными ядрами. Очаг лизиса костного матрикса. Опыт. Гематоксилин и эозин. А). Ув. 400. Б). Ув. 1000.

Обращает внимание то, что по территории срезов кортекса опытных крыс выявляется выраженная неравномерность в расположении остеоцитов (рис. 5.16). Их плотность меньше во внешних и внутренних генеральных костных пластинках, по сравнению с остеонным слоем.

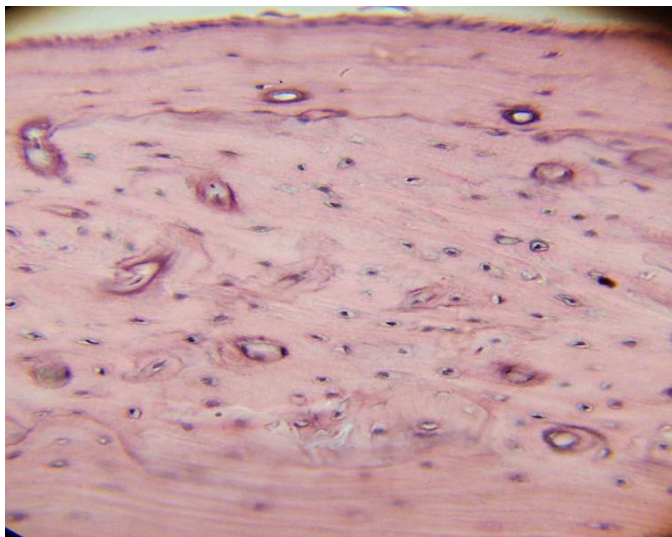
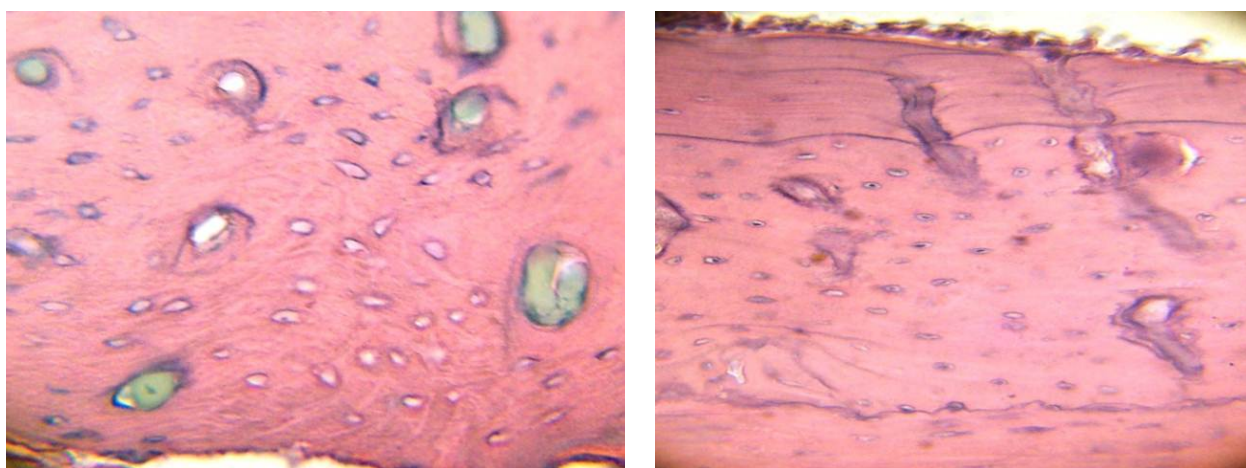


Рис. 5.16. Область кортекса диафиза бедренной кости крыс. Узкий слой внешних генеральных костных пластинок, слабо выраженная структура остеонного слоя и внутренние генеральные костные пластинки. Неравномерная плотность остеоцитов. Пустые центральные костные каналы в слое наружных генеральных пластинок. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

Обнаруживается значительное количество пустых лакун. По данным морфометрического исследования установлено, что количество остеоцитов и пустых лакун были сравнимы с показателями контрольных животных и составляли $69,87 \pm 5,13$, а количество остеоцитов ($46,81 \pm 2,72$) было на 33,8 %

меньше, чем в контроле. Эти показатели достоверно не отличались от количества остеоцитов у опытных животных на 7 сутки. Количество пустых лакун в диафизе опытных крыс на 14 сутки составило $23,92 \pm 1,53$. По сравнению с контролем количество пустых лакун было большим в 6,6 раза.

В отличие от контрольных крыс на срезах диафизов бедренной кости опытных крыс наблюдали значительное количество расширенных центральных каналов остеонов. Их стенки неравномерны и выражено базофильны. Часть из них пустая или заполненная тканевым детритом (рис. 5.17 А, Б).



А

Б

Рис. 5.17 (А, Б). А) Многочисленные центральные каналы в кортексе диафиза бедренной кости крыс. Остены с выраженной базофилией стенок. Детрит в просвете части костных каналов. Пустые лакуны остеоцитов. Б) Базофилия и неравномерность стенок сосудистых каналов, пустые просветы сосудов. Опыт. Гематокилин и эозин. А) и Б) Ув. 400.

Большая часть кровеносных сосудов в прободающих каналах на срезах диафиза пуста или заполнена гомогенными розовыми массами, либо детритом (см. рис. 5.17 А). Стенки сосудов выражено базофильные. Вблизи таких сосудов наблюдаются остеоциты различной структурной организации – отмечаются остеоциты, содержащие пикнотичные ядра, пустые лакуны

остеоцитов и участки костного матрикса, где остеоциты не обнаруживаются (см. рис. 5.17 Б).

Установленные изменения в кровеносном русле диафиза опытных крыс свидетельствуют о негативном влиянии гипотермии на кровоснабжение кости, а это, в свою очередь, приводит к нарушению структурной организации, в первую очередь, клеток костной ткани. Из данных представленных в литературе, известно, что состояние костной ткани в значительной степени зависит от структурно-функциональных характеристик микроциркуляторного русла [10, 128]. Связь между структурными нарушениями в кровеносных сосудах костей крыс с дегенеративными изменениями костной ткани наблюдали и в условиях действия других неблагоприятных факторов, а именно у крыс, находившихся в антиопорно-статическом положении (модель разгрузки) в течение 28 суток [5, 25].

Обращает внимание выраженная неоднородность в строении, форме и размерах остеоцитов. По территории срезов диафиза бедренной кости выявлены продолговатые остеоциты с такой же формы ядрами, расположенными в узких лакунах, а также овальные и округлые расширенные лакуны с остеоцитами, которые содержат преимущественно мелкие пикнотичные ядра (рис. 5.18). Присутствуют участки кости с расширенными пустыми лакунами, либо лакунами, заполненными детритом.

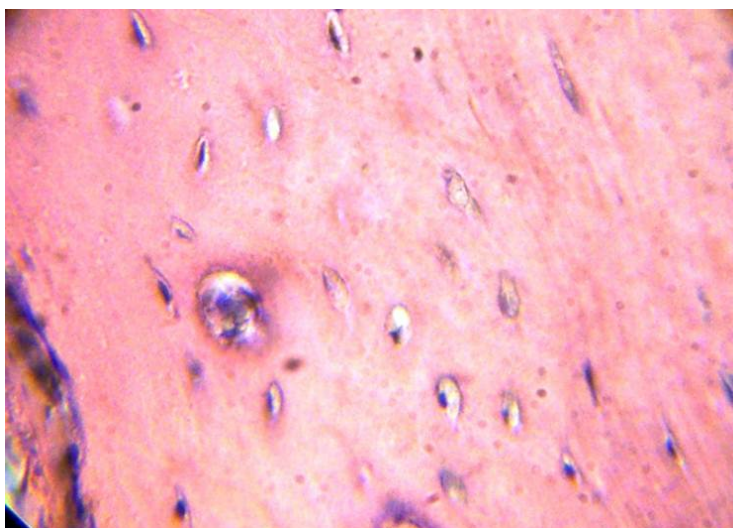


Рис. 5.18. Узкие удлиненные лакуны остеоцитов с продолговатыми ядрами клеток, а также широкие лакуны с остеоцитами с мелкими пикнотичными ядрами в участке кортекса диафиза бедренной кости крыс. Гематоксилин эозин. Ув. 400.

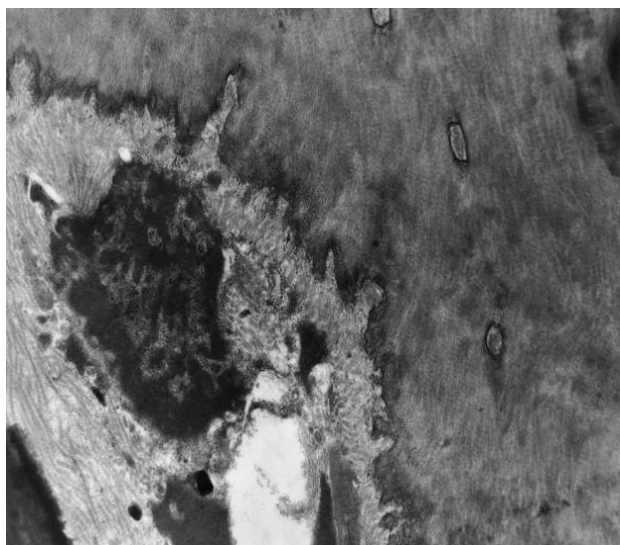
Контуры отдельных лакун теряют четкость и становятся «размытыми». Площадь лакун остеоцитов у крыс опытной группы составила $63,87 \pm 2,94$ мкм², что было на 25,5 % больше, чем площадь лакун у контрольных крыс.

С помощью электронно-микроскопического исследования было установлено, что ультраструктурная организация большей части остеоцитов была нарушена. Выявлялись остеоциты с выраженной гетерохроматизацией ядра и деструкцией цитоплазматических органелл (рис. 5.19).

В цитоплазме отдельных остеоцитов отмечены очаги гомогенизации. Отмечается некроз остеоцитов (см. рис. 5.19). Такие остеоциты располагаются в расширенных лакунах резорбционного типа, стенки которых с неравномерными контурами в виде зазубрин. Это может быть отражением активации периosteоцитарного остеолизиса.



А



Б

Рис. 5.19 (А, Б). А) Некроз остеоицита. Деструкция цитоплазмы. Ув. 22800.
Б) Некроз остеоицита в расширенной лакуне с зазубренными краями. Опыт.
Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

Изредка в компактной костной ткани выявляли некротически измененные остеоициты, расположенные в костных лакунах (рис. 5.20), полость которых была открыта в мозговой канал. Нередкими были лакуны, содержащие погибшие остеоициты, клеточный детрит и запустевшие.

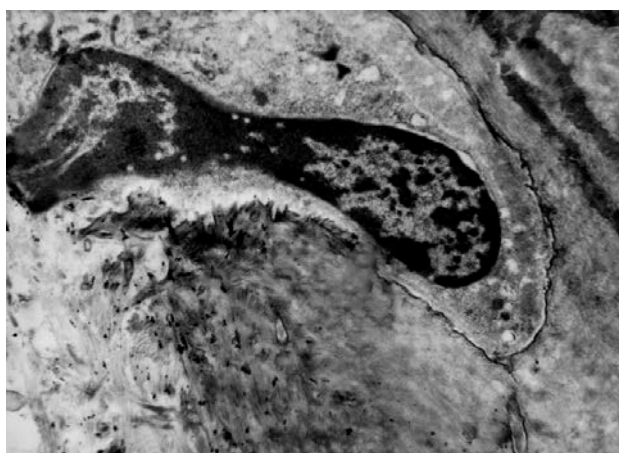


Рис. 5.20. Вскрытая костная лакуна с некротически измененным остеоицитом в участке эндоста кортекса диафиза бедренной кости крысы. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

Однако при наличии выраженных деструктивных изменений в кортексе опытных животных на 14 сутки после гипотермии кое-где отмечены остеоициты различной формы с сохраненной ультраструктурной организацией (рис. 5.21).

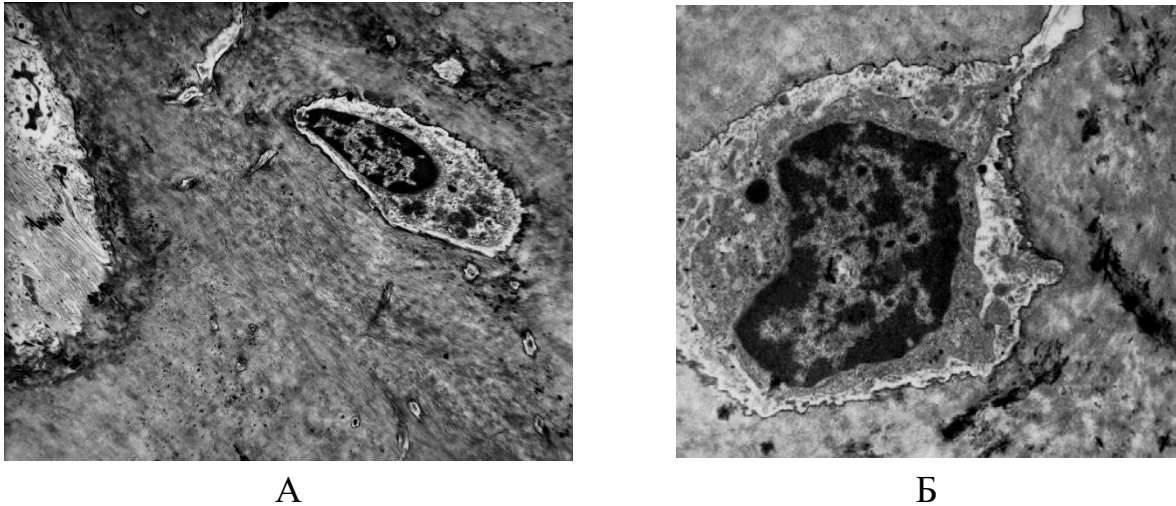


Рис. 5.21 (А, Б). А) Остеоцит с участка диафиза бедренной кости крысы с ядром, в котором отмечается как эухроматин, так и гетерохроматин. Лизосомы в цитоплазме остеоцита. Ув. 4000. Б) Зазубренные края лакуны остеоцита. Деструктивная цитоплазма. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

Следует отметить, что обнаруженные нами на данный срок исследования более выраженные нарушения ультраструктурной организации в остеоцитах, по сравнению с остеобластами 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. В то время, как остеоциты, будучи замурованными в минерализованный костный матрикс, на фоне гипотермии, приводящей к общему замедлению кровотока и угнетению внутриканальцевой костной микроциркуляции, оказываются в условиях нарушения трофики, что приводит к формированию в них значительных ультраструктурных изменений. Минерализованный костный матрикс имел неоднородную структуру. Он характеризовался наличием участков различной электронной плотности, что отражает разную степень его минерализации, возможно, обусловленную действием гипотермии.

Признаки активизации костной резорбции были также отмечены в области периоста. Периостальная поверхность кортекса на значительном протяжении была бахромчатой, представленной множеством мелких костных фрагментов (рис. 5.22).

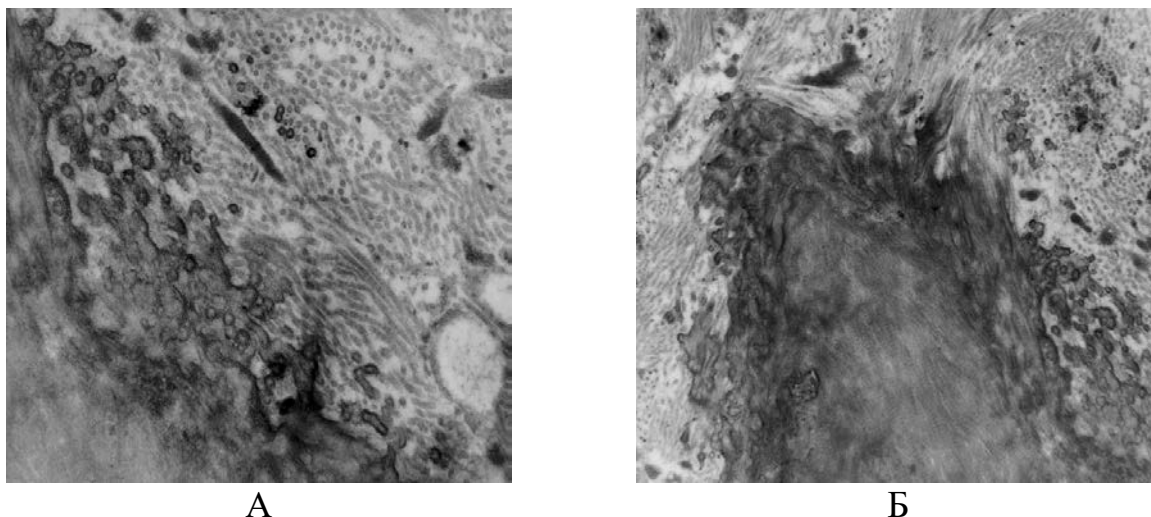


Рис. 5.22 (А, Б). А) Периостальная резорбция кортекса в участке диафиза бедренной кости. Ув. 15600. Б) Резорбируемая периостальная поверхность кости. Множество мелких очагов костеобразования по периметру кости. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

В зоне резорбции периоста нередко выявляли мононуклеарные фагоциты – клетки, играющие вспомогательную роль в процессе костной резорбции и включающиеся в этот процесс после завершения основной остеокластической резорбции.

Остеогенный слой периоста был представлен остеобластами, содержащими профили гранулярной эндоплазматической сети, небольшие очаги деструкции цитоплазмы и обширные участки лизиса цитоплазматической мембраны, что свидетельствует о низких репаративных возможностях.

Следует отметить, что у животных данной серии эксперимента присутствовал расширенный фибробластический слой периоста, представленный большим количеством фибробластов в состоянии функциональной активности и многочисленными разнонаправленными коллагеновыми волокнами. В структуре фибробластов отмечены выраженные деструктивные и дистрофические изменения: обширные очаги лизиса цитоплазматической мембраны, повышенная плотность лизосом и остаточных телец в цитоплазме (рис. 5.23).

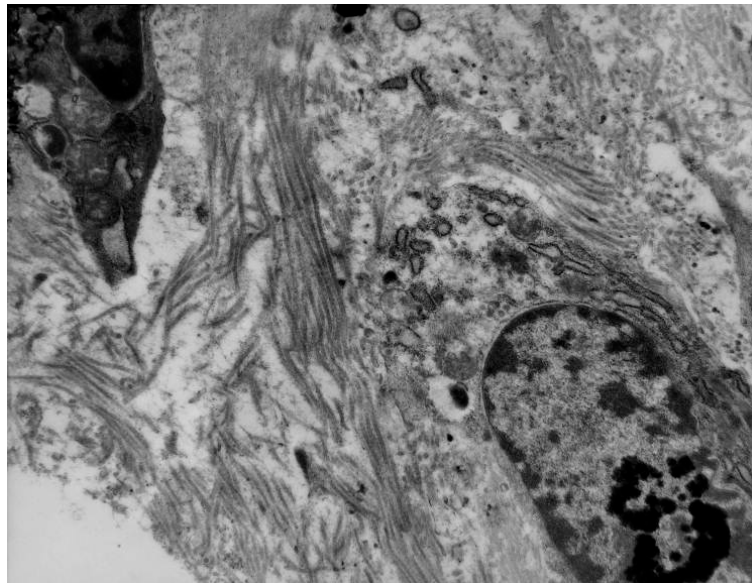
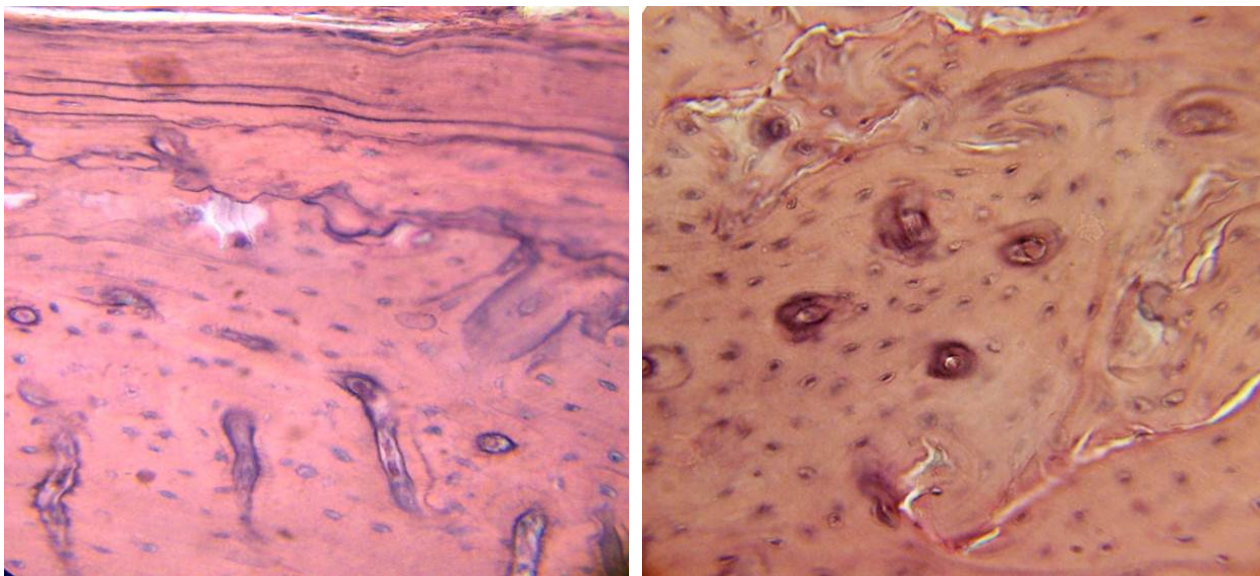


Рис. 5.23. Гипертрофированный фиброзный слой периоста на участке кортекса диафиза крыс. Фрагмент фибробласта в правом нижнем углу с профилями гЭПС и нечетко контурированной цитоплазматической мембраной. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

28 сутки после гипотермии. При анализе поперечных срезов диафизов бедренной кости контрольных крыс не было выявлено отличий в структурной организации компактной кости, описанной на 7 сутки.

У животных опытной группы на 28 сутки после гипотермии установлены значительные деструктивные изменения как в матриксе кости, так и в структурной организации остеоцитов, их количестве и характеристике лакун. Так, зафиксированы выраженная неравномерность и базофилия цементных линий во внешнем слое наружных генеральных пластинок (рис. 5.24 А), обширные поперечные и продольные трещины в остеонном слое, иногда по границе отдельных остеонов, базофилия стенок костных каналов (рис. 5.24 Б), расширение и запустение просветов кровеносных сосудов, узурация стенок прободающих каналов (см. рис. 5.24 А).



А

Б

Рис. 5.24 (А, Б). Область кортекса из участка диафиза крысы. А) Выраженная неравномерность генеральных пластинок в наружном слое, базофилия цементных линий и стенок прободающих каналов. Пустые лакуны остецитов. Б) Крупные поперечные трещины в остеонном слое. Неравномерная плотность остецитов, выраженная базофилия стенок центральных каналов. Опыт. Гематоксилин и эозин. А) и Б) Ув. 400.

Отмечено выраженное нарушение структуры сосудистых каналов (рис. 5.24 А; 5.25) и неравномерная плотность остецитов по территории диафиза.

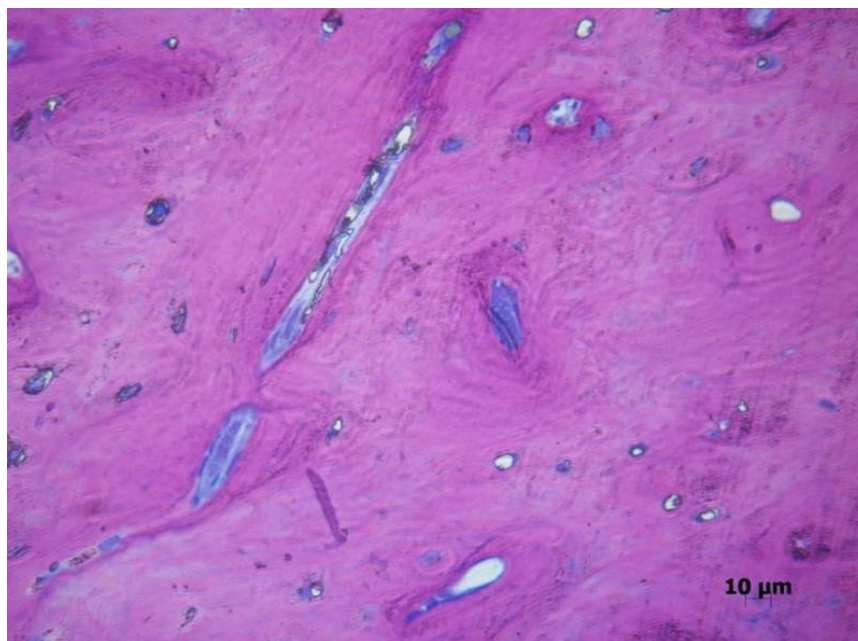


Рис. 5.25. Нарушение структуры сосудистых каналов в кортексе из участка диафиза бедренной кости крысы. Опыт. Окраска по Aparizio. Ув. 1000.

На значительном протяжении диафиза наблюдали пустые лакуны остеоцитов, большинство из которых были расширены. Их площадь по сравнению с 14-и сутками достоверно не изменилась ($65,77 \pm 4,98 \text{ мкм}^2$), но была на 29,3 % больше, чем у контрольных животных.

Количество остеоцитов и пустых лакун в поле зрения микроскопа составило $71,61 \pm 5,33$. По сравнению с предыдущим сроком (14-е сутки) наблюдения достоверно не изменилось и количество остеоцитов ($44,62 \pm 2,51$), но по сравнению с контролем было меньше на 36,9 %. При этом количество пустых лакун составило $26,93 \pm 1,57$. Это было в 7,5 раза больше, чем в контроле.

Зафиксированы запустевшие центральные костные каналы с базофильными стенками (рис. 5.26).

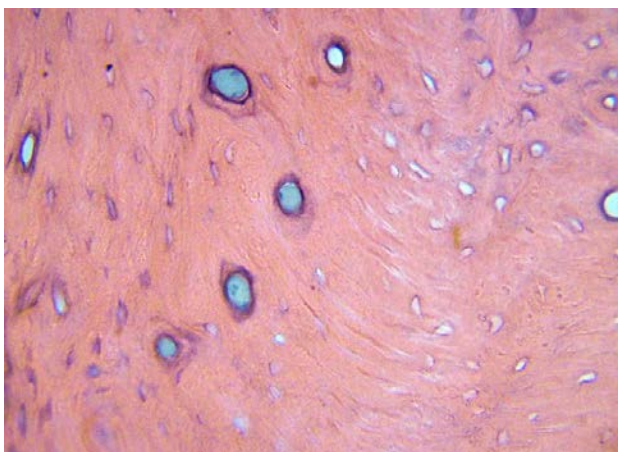


Рис. 5.26. Многочисленные пустые лакуны остеоцитов в участке кортекса. Выраженная базофилия стенок запустевших расширенных центральных каналов. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

Обращало на себя внимание значительные деструктивные изменения в периосте опытных крыс на данный срок. Периост, в отличие от контрольных животных, был представлен одним неравномерным слоем фибробластов, располагающихся неплотно в тонком слое коллагеновых волокон (рис. 5.27). Местами клетки в периосте не выявлялись. Плотность остеобластов в остеонном слое периоста была низкой (рис. 5.27).

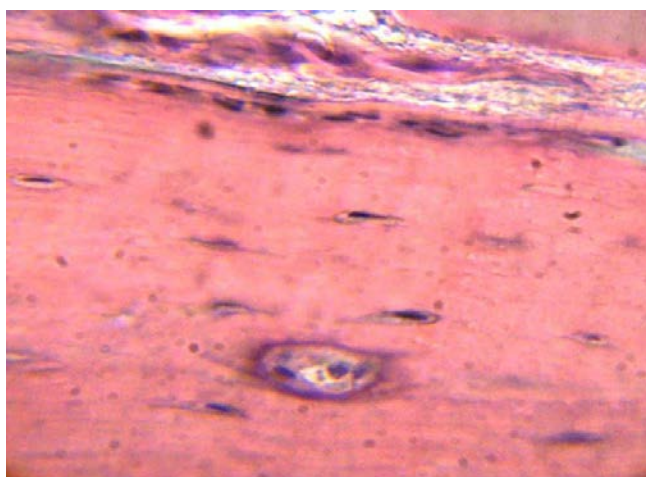


Рис. 5.27. Периост, представлен одним слоем фибробластоподобных клеток. Низкая плотность остеоцитов в наружном слое кортекса. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

В отдельных областях кортекса в наружном слое генеральных пластинок отмечали длинные продольные трещины (рис. 5.28).

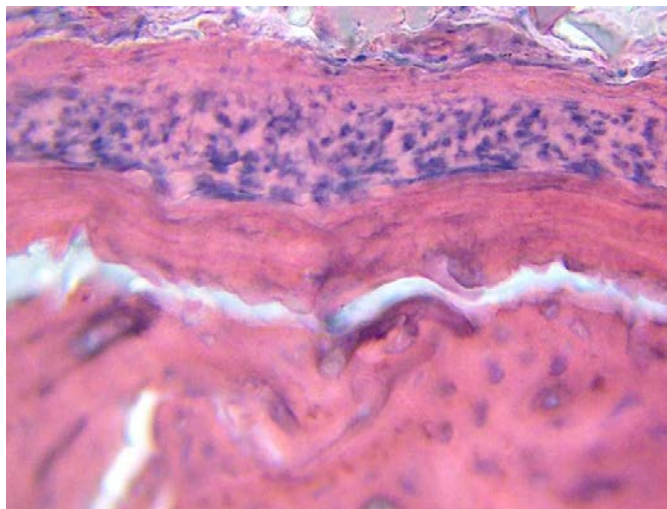


Рис. 5.28. Продольная трещина в слое наружных генеральных пластинок диафиза. Пустые лакуны остеоцитов. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

При электронно-микроскопическом анализе выявлено, что на минерализованной поверхности кости располагались остеобласты, содержащие большие полости деструкции (рис. 5.29).

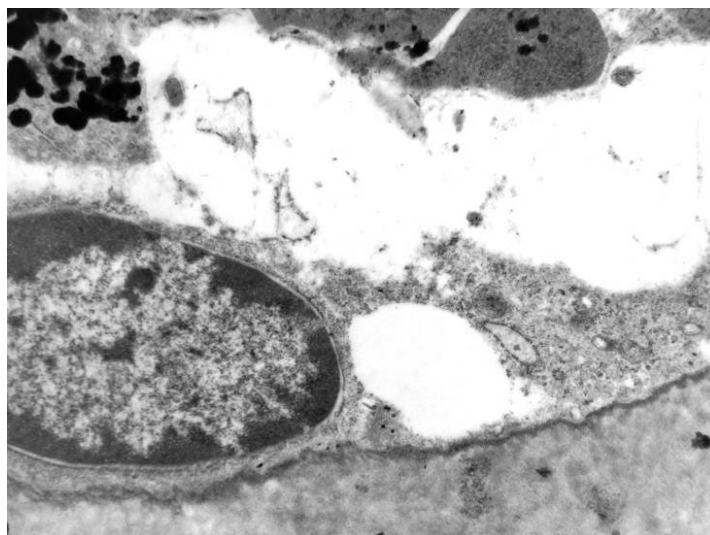


Рис. 5.29. Участок кортекса диафиза бедренной кости крысы. Остеобласт с полостью деструкции в цитоплазме. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

В некоторых остеобластах обнаружены миелиновые фигуры – в виде концентрических многослойных напластований, представляющие собой продукт деструкции мембранных органелл клетки (рис. 5.30).

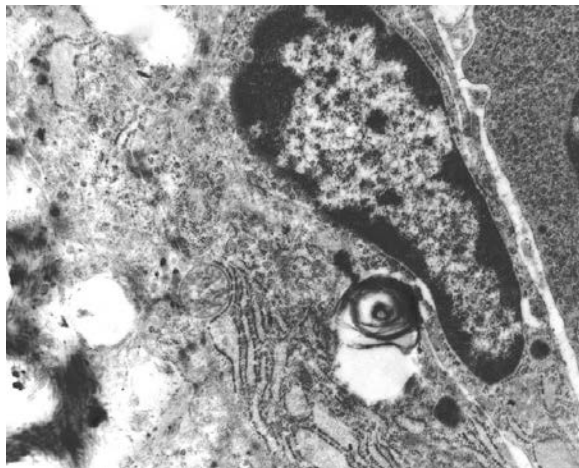


Рис. 5.30. Остеобласт в кортексе бедренной кости крысы. Миелиновая фигура в цитоплазме остеобласта. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 15600.

В остеобластах также наблюдалась деструкция и набухание митохондрий, очаговая деструкция канальцев гЭПС и остаточные тельца (рис. 5.31 А, Б).

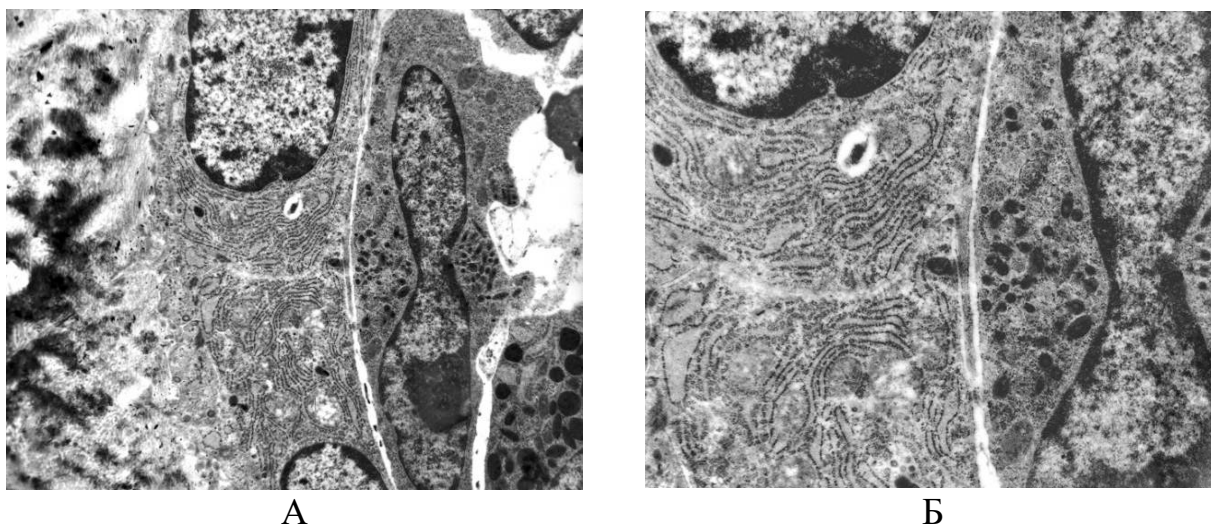


Рис. 5.31 (А, Б). А) Амитотическое деление ядра в преостеокласте. Набухшие митохондрии, вторичные лизосомы, остаточные тельца в цитоплазме остеобласта. Деструкция рибосом в перинуклеарной области остеобласта. Ув. 6000. Б) Фрагмент рис. А. Очаговая деструкция канальцев гЭПС в остеобласте. Амитоз ядра преостеокласта. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 15600.

В отдельных случаях вблизи функционально активных остеобластов наблюдали амитотическое деление ядра преостеокластов, клетках предшественников остеокластов (см. рис. 5.31).

Для популяции остеоцитов была характерна ультраструктурная гетероморфность. Остеоциты, расположенные вблизи периоста, имели не полностью минерализованную стенку костной лакуны (рис. 5.32), крупное ядро удлиненной формы с высокой долей эухроматина и расширенные ядерные поры. В таких остеоцитах присутствовали участки с расширенным перинуклеарным пространством (см. рис. 5.32). Аналогичные картины мы наблюдали на 14 сутки после гипотермии.

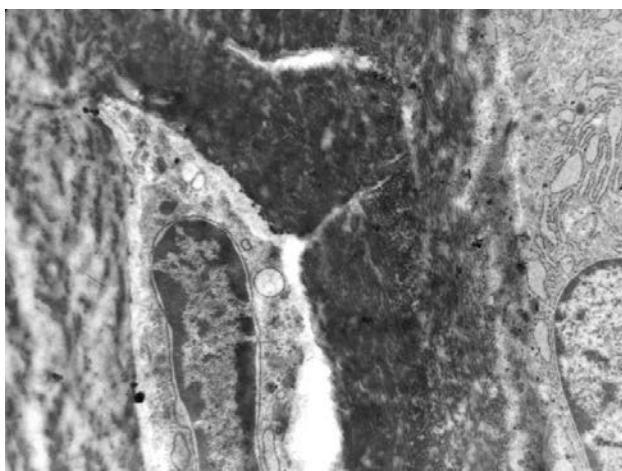


Рис. 5.32. Толстый слой остеоида под функционально активным остеобластом в участке кортекса диафиза бедренной кости крысы. Остеоцит с частично минерализованной стенкой лакуны. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

В минерализованном костном матриксе в расширенных лакунах резорбционного типа присутствовали остеоциты с выраженными деструктивными изменениями. В ядрах таких остеоцитов выявлены признаки балонной дистрофии в виде крупных вакуолей (рис. 5.33), что указывает на нарушение процесса гидратации.

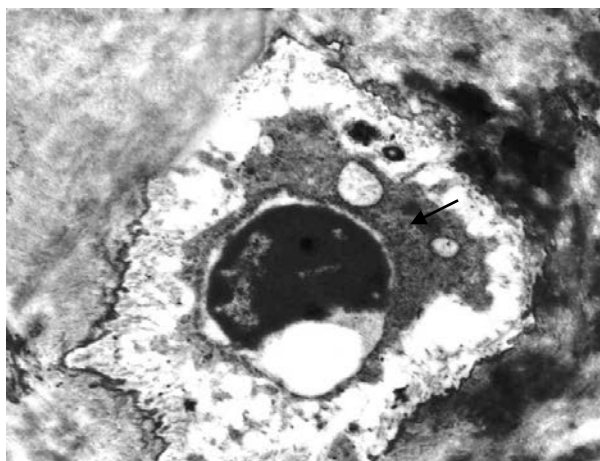


Рис. 5.33. Балонная дистрофия ядра остеócита из кортекса диафиза бедренной кости крысы. Деструкция цитолеммы. Перичеселлюлярная локализация вторичной лизосомы. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 15600.

Цитоплазматическая мембрана на большом протяжении практически была лизирована. В перичеселлюлярном пространстве определялись вторичные лизосомы (рис. 5.34), высвобождающиеся в результате лизиса плазматической мембраны клетки и включающиеся в процесс периостеocитарного лизиса. Костный матрикс вокруг таких остеocитов имел мозаичную минерализацию (рис. 5.34).

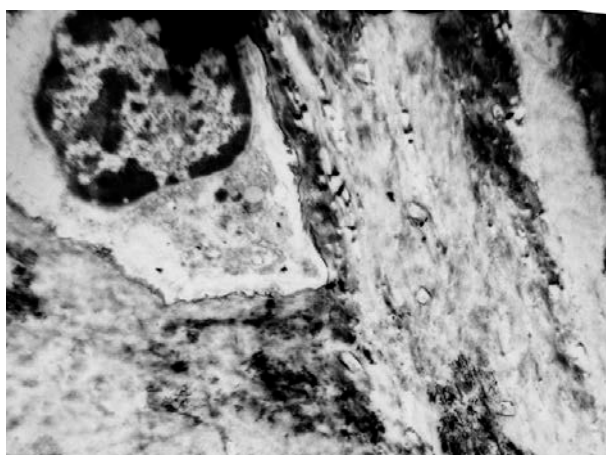


Рис. 5.34. Деструкция остеocита в расширенной резорбционной лакуне из участка кортекса диафиза бедренной кости крысы. Мозаичная минерализация матрикса. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 4000.

В популяции остеоцитов часто встречали клетки с электронноплотным практически полностью гетерохроматизированным клеточным ядром, вакуолизированной цитоплазмой с отсутствием дифференциации на мембранные органеллы и лизисом цитоплазматической мембраны (рис. 5.35). Значительное количество костных лакун содержало пристеночно локализованные остатки погибших остеоцитов, либо они были полностью запустевшие.

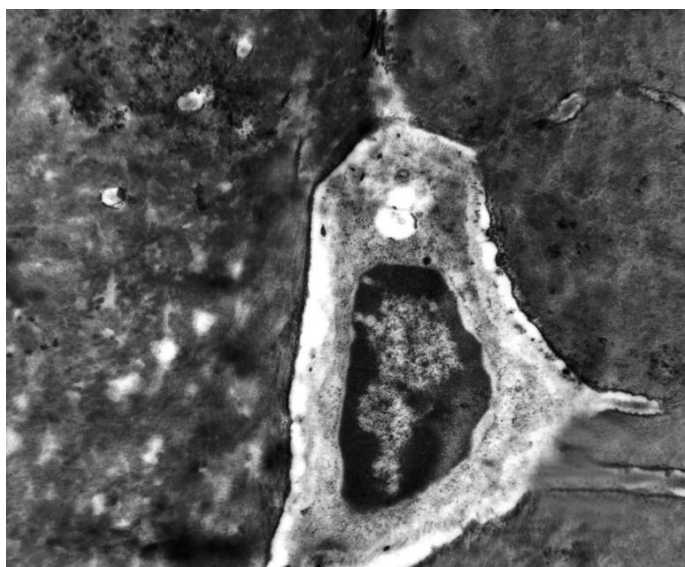


Рис. 5.35. Участок кортекса диафиза бедренной кости крысы. Гетерохроматизация ядра остеоцита. Лизис цитолеммы. Деструкция цитоплазмы. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

5.2. Структурная организация компактной кости у 24-месячных крыс после гипотермии

Контрольные 24-месячные крысы. На поперечных гистологических срезах диафиза бедренной кости контрольных 24-месячных крыс определяются неравномерной ширины внешние и внутренние генеральные пластинки, а также остеонный слой, который местами не четко выражен (рис. 5.36).

В отличие от контрольных 6-месячных животных во внешних и внутренних генеральных пластинках диафиза 24-месячных крыс содержатся участки без клеток, а также остеоциты с пикнотичными ядрами (рис. 5.37).

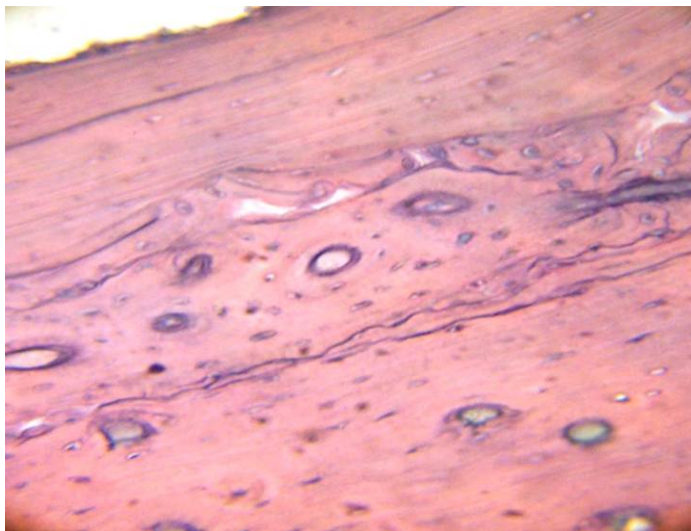


Рис. 5.36. Расширенные каналы остеонов. Неравномерные линии склеивания. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 200.

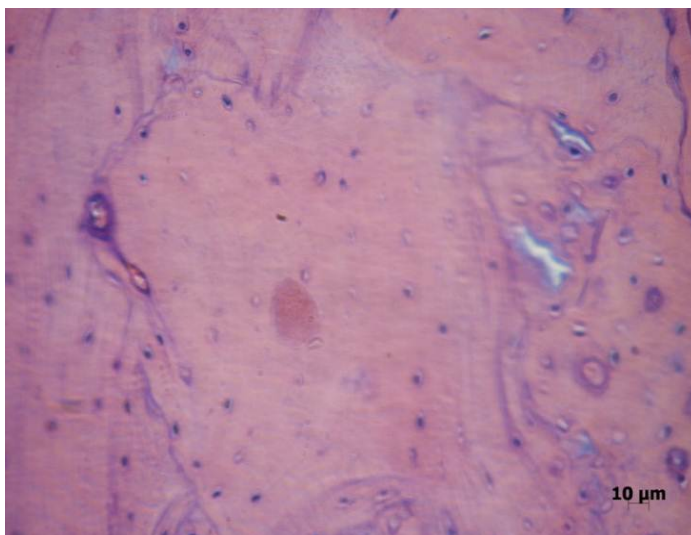


Рис. 5.37. Области компактной кости без остеоцитов. Микротрещины. Гематоксилин и эозин. Опыт. Ув. 400.

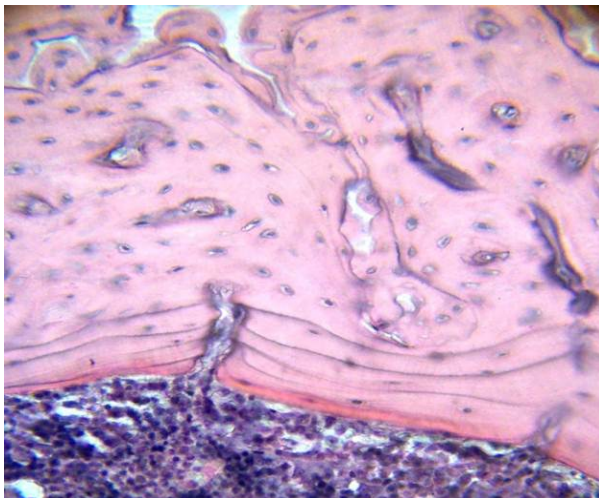
Отдельные остеоциты располагаются в расширенных лакунах. Определяются лакуны без остеоцитов, а также базофильные линии цементации с «зигзагообразными» контурами, что свидетельствует о неравномерности процессов перестройки компактной кости.

В остеонном слое остеоны чаще имеют неправильную асимметричную форму. В большей части остеонов контуры внешних концентрических пластинок неровные, наблюдается выраженная базофилия их центральных

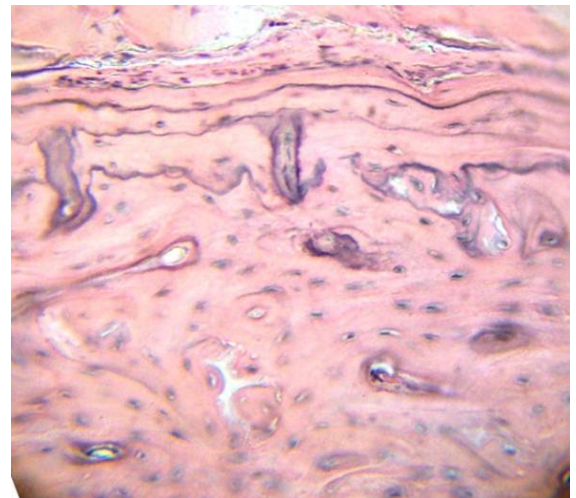
каналов. Выявляются участки разрушения остеонных конструкций, очаги лизиса матрикса различных размеров. Кроме того, обнаруживаются микротрещины, неравномерные наслоения concentрических и вставочных костных пластинок.

Количество остеоцитов и лакун без остеоцитов в поле зрения микроскопа составляет $67,8 \pm 5,3$, что достоверно не отличалось от контрольных и опытных (на 7 сутки) 6-месячных животных, однако количество пустых лакун было в 2,2 раза больше ($7,8 \pm 0,73$), чем у контрольных 6-месячных животных.

Сосудистая сеть в диафизе представлена кровеносными сосудами центральных каналов остеонов и прободающих костных каналов. В просветах сосудов располагаются клеточные элементы крови. Местами центральные каналы остеонов расширены, а сосуды в них запустевшие. Стенки отдельных центральных и прободающих каналов выражено базофильны (рис. 5.38 А, Б).



А



Б

Рис. 5.38 (А, Б). А) и Б) Повышенная плотность сосудов в компактной кости. Базофилия стенок сосудов. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 200.

Периостальная поверхность кортекса на отдельных участках имеет неровные контуры с лакунарными углублениями. Периост представлен узким слоем коллагеновых волокон, между которыми располагаются клетки

фибробластического дифферона с покоящимися остеобластами на поверхности кости (рис. 5.39).

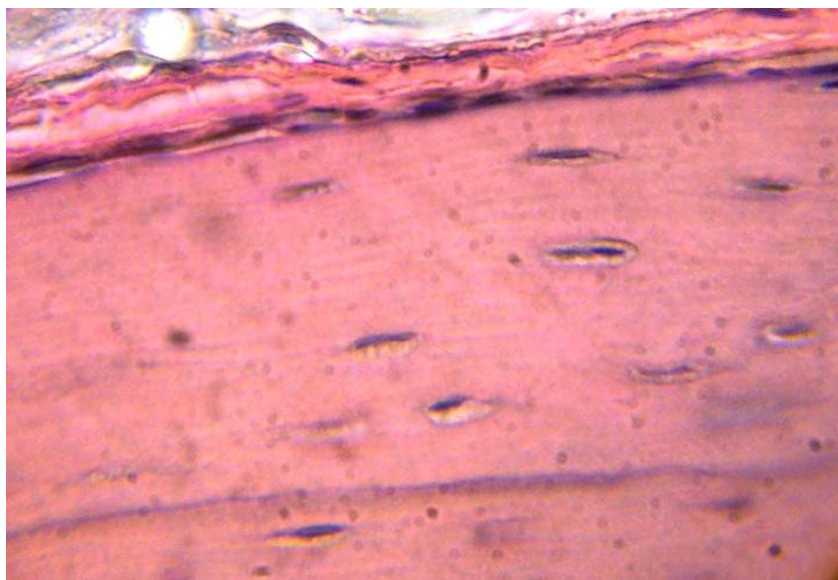


Рис. 5.39. Периост представлен узким слоем коллагеновых волокон. Узкий слой клеток фибробластического дифферона. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

Опытные (после действия гипотермии) 24-месячные крысы. В связи с тем, что на поперечных срезах диафизов бедренной кости опытных крыс на 7, 14 и 28 сутки обнаружены деструктивные изменения, аналогичные, описанным у опытных 6-месячных животных, чтобы не повторять описание имеющихся нарушений, представлялось целесообразным представить обобщенные результаты исследований на данные сроки наблюдения. Отличительной особенностью у 24-месячных животных от 6-месячных крыс было то, что деструктивные изменения в диафизах опытных крыс (после действия гипотермии) наблюдались на больших территориях и были значительно выраженными.

Так, на 7 сутки после гипотермии на поперечных срезах диафиза во внешних генеральных пластинках 24-месячных крыс выявляются многочисленные выражено базофильные, местами расширенные, цементные линии. Они имели извилистый вид и сливаются между собой (рис. 5.40).

Выявляется неравномерная плотность расположения остеоцитов, среди которых отмечены остециты с пикнотичными ядрами.

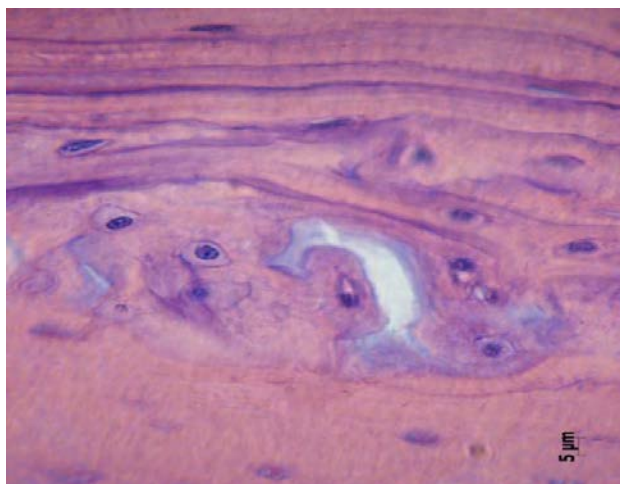


Рис. 5.40. Неравномерные базофильные цементные линии, разделяющие генерации костной ткани в наружном слое генеральных пластинок. Трещины в костном матриксе. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 1000.

На все сроки исследования наиболее выраженные изменения наблюдались в остеонном слое. Извилистые прободающие каналы пронизывают толщу остеонного шара. Определяются участки мозаичной окраски и отломки вторичных остеонов. Отмечены многочисленные продольные и поперечные трещины, очаги разрыхления костного матрикса (рис. 5.41).

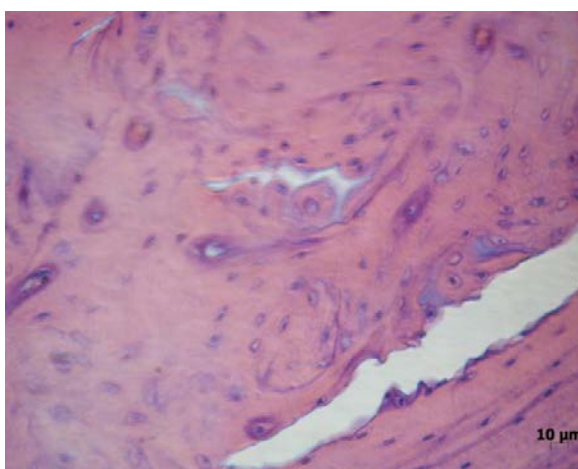


Рис. 5.41. Поперечные и продольные трещины в компактной кости. Гематоксилин и эозин. Ув. 100.

Местами выявлялись остеоны с расширенными центральными каналами. Размеры диаметров центральных каналов используют как показатель интенсивности процессов резорбции, в связи с тем, что при усилении резорбционных процессов их диаметры увеличиваются. Достоверных изменений диаметров центральных каналов остеонов между контрольными и опытными животными не выявлено.

В остеоном слое 24-месячных опытных крыс многочисленными были вставные пластинки, что свидетельствует об уменьшении плотности остеоновых конструкций. Остеоны, чаще неправильной формы, были представлены одной или двумя концентрическими пластинками. Большинство остеонов характеризовались выражено базофильной окраской контуров центрального канала. Местами в остеоном слое крыс, особенно на 14 и 28 сутки, наблюдались участки остеолизиса по типу «жидкой кости» (рис. 5.42). В области единичных резорбционных полостей по внутренней краевой поверхности плотность остеобластов была повышена (см. рис. 5.42).

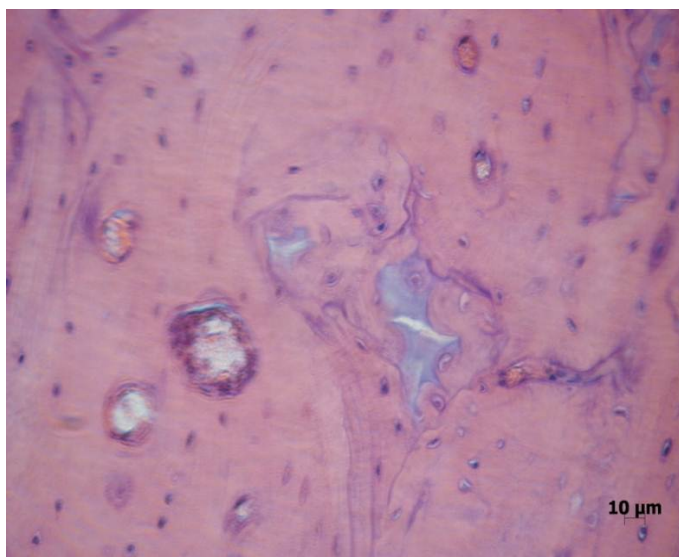


Рис. 5.42. Микротрещины в компактной кости. Остеобласты по краевой поверхности резорбционной полости. Опыт. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

У опытных крыс слои кортекса пересекали сосудистые каналы, стенки которых чаще были выражено базофильными и неровными, а просветы

расширенными. Чаще сосудистые каналы были запустевшими или содержали детрит (рис. 5.43).

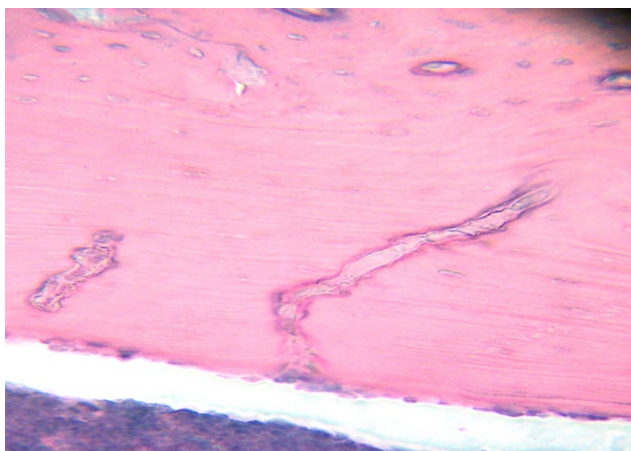


Рис. 5.43. Запустевшие кровеносные сосуды по территории диафиза бедренной кости опытных крыс. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

На поверхности центральных каналов остеонов компактной кости центральной части диафиза бедренной кости крыс после гипотермии на ультраструктурном уровне были обнаружены остеобласты, в цитоплазме которых присутствовали электронноплотные митохондрии округлой либо удлинненной формы с отсутствием четкости контуров, что свидетельствует о нарушении энергетического обмена в этих клетках (рис. 5.44).

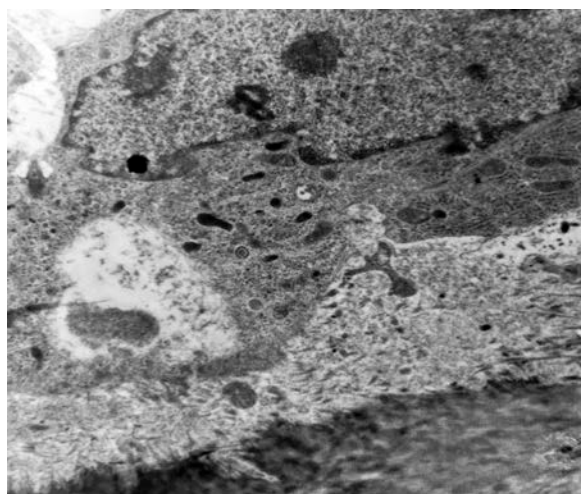


Рис. 5.44. Фрагмент остеобласта с полостью деструкции в цитоплазме. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

Отмечена деструкция канальцев гЭПС, а также их дегрануляция, что, по-видимому, было вызвано нарушением биосинтетических процессов в остеобластах на фоне гипотермии. В цитоплазме остеобластов выявлены значительные по размерам очаги деструкции с гомогенизацией цитоплазмы (см. рис. 5.44).

На поверхности центральных каналов остеонов располагались остеобласты с очаговой деструкцией цитоплазмы (рис. 5.45).

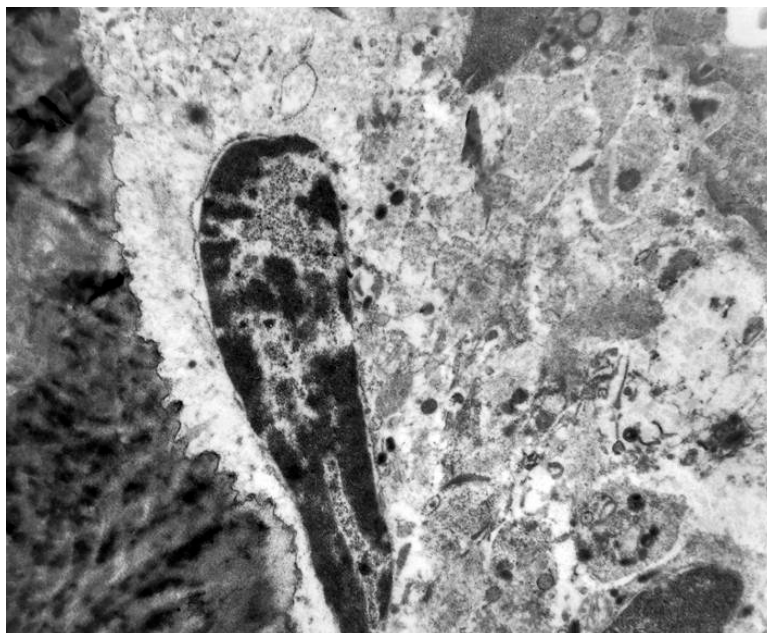


Рис. 5.45. Остеобласт. Очаговая деструкция цитоплазмы. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 8000.

В минерализованном костном матриксе были отмечены признаки дисбаланса остеоцитарного ремоделирования со сдвигом этого процесса в сторону активизации периosteоцитарного остеолиза.

В остеоцитах имел место очаговый лизис ядерной мембраны и деструкция плазматической мембраны.

В цитоплазме практически отсутствовала дифференциация на мембранные органеллы, преобладали рибосомы и полисомы, значительная часть из которых не имела четких контуров (рис. 5.46), что свидетельствует об имеющих место деструктивных изменениях.

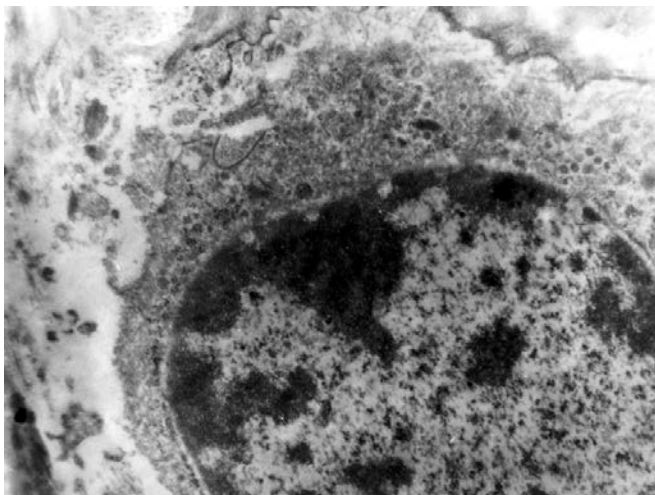


Рис. 5.46. Фрагмент остеокита. Очаговый лизис ядерной и цитоплазматической мембран. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 20400.

Большая часть остеокитов располагалась в резорбционных лакунах с неровными зазубренными контурами (см. рис. 5.46, 5.47). В пользу активизации не только перилакунарной (см. рис. 5.46), но и периканаликулярной резорбции свидетельствуют расширенные костные каналы остеокитов (рис. 5.47).

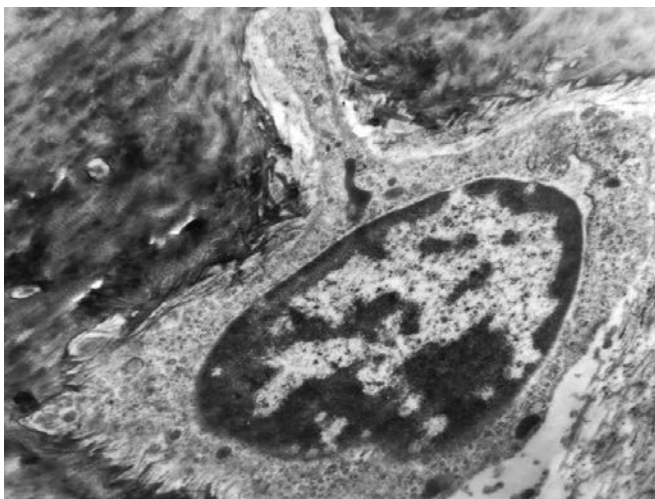


Рис. 5.47. Остеокит на стадии перилакунарной и периканаликулярной резорбции. Опыт. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 10000.

В перилакунарном матриксе нарушена минерализация, сопровождающаяся визуализацией коллагеновых волокон (рис. 5.48).

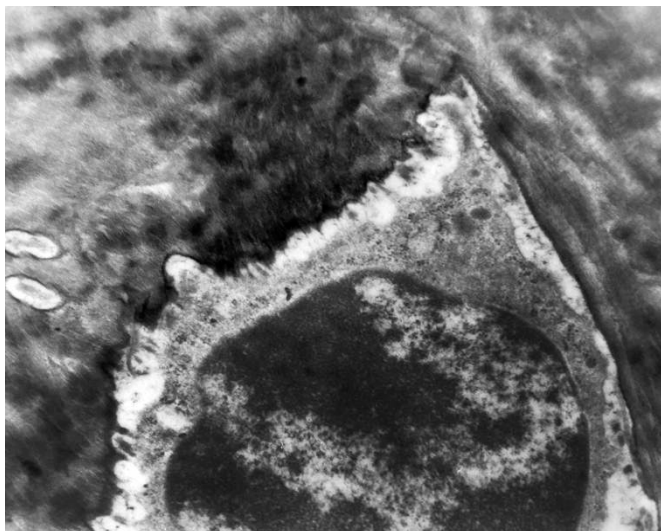


Рис. 5.48. Фрагмент остеокита в резорбционной лакуне. Визуализация в перилакунарном матриксе коллагеновых волокон с характерной поперечной исчерченностью. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 20400.

Вблизи поверхности центральных каналов остеонов были обнаружены остеокиты во вскрытых лакунах (рис. 5.49), возле которых присутствовали мононуклеарные фагоциты, клетки, играющие вспомогательную роль в процессе костной резорбции.

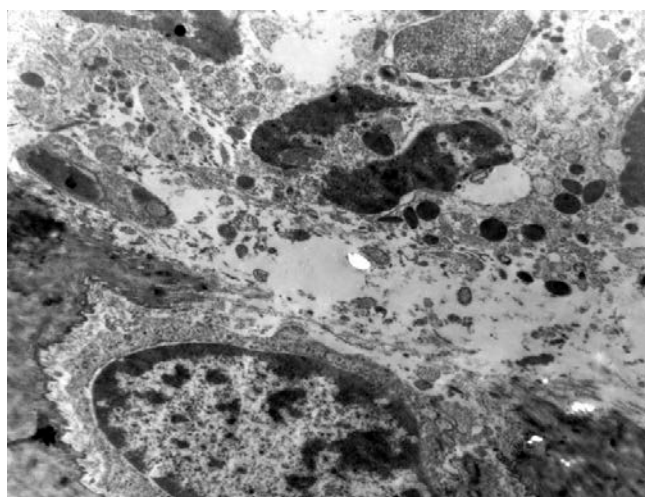


Рис. 5.49. Остеокит во вскрытой лакуне с зазубренными краями. Апоптоз остеобласта на поверхности центрального канала остеона. Мононуклеарные фагоциты возле вскрытой лакуны остеокита. Контрастирование по Рейнольдсу. Ув. 6000.

На поверхности центральных каналов остеонов в непосредственной близости от остеоцитов во вскрытых лакунах были выявлены остеобласты в состоянии апоптоза.

Трещины и щели (рис. 5.50) в компактной кости сохранялись и на 28 сутки. В остеонном слое наблюдались остеоны с нарушенными слоями concentрических пластинок (см. рис. 5.50). Во вставочных пластинках присутствовали пустые лакуны без остеоцитов, а также остеоциты с пикнотичными и лизированными ядрами (см. рис. 5.50).

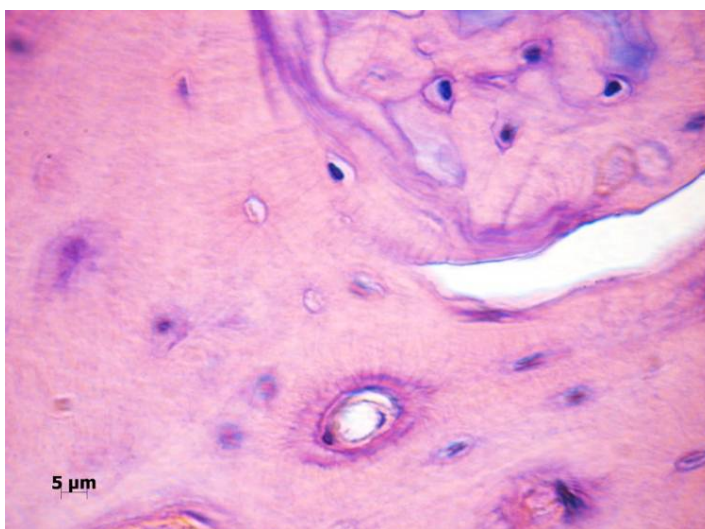


Рис. 5.50. Крупные продольные трещина в остеонном слое диафиза. Пустые лакуны остеоцитов, остеоциты с лизированными ядрами. Опыт. 28 сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 1000.

Как и на предыдущие сроки наблюдения имела место неравномерность окраски костного матрикса и базофилия цементных линий склеивания (рис. 5.51).

В центральных каналах остеонов были отмечены признаки нарушения микроциркуляции, присутствовали запустевшие сосуды (рис. 5.52), в клетках эндотелия выявлен отек цитоплазмы. В зоне периваскулярной деструкции обнаружены мононуклеарные фагоциты.

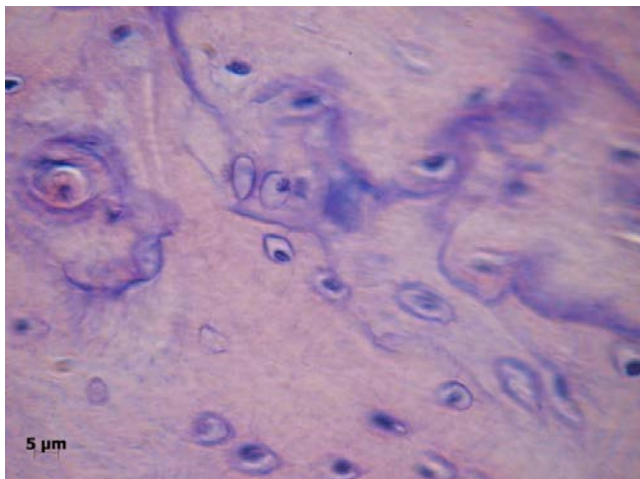


Рис. 5.51. Неравномерная окраска костного матрикса, базофилия цементных линий. Пустые лакуны остеоцитов, пикноз ядер остеоцитов. Опыт. 28 сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 1000.

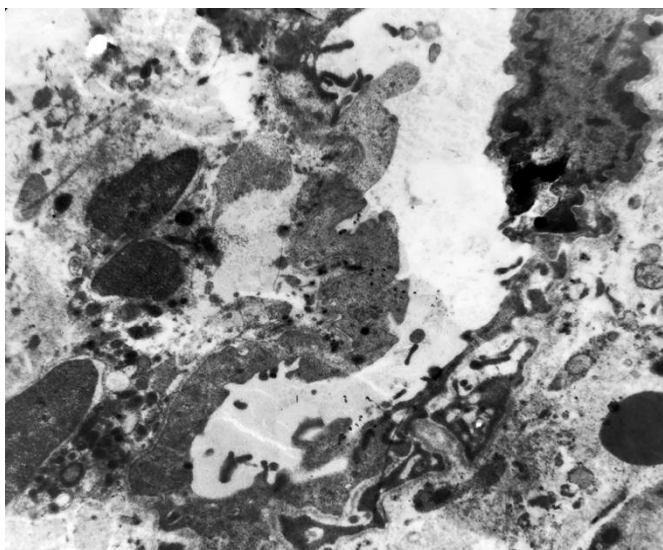


Рис. 5.52. Запустевший сосуд в центральном канале остеона. Отек цитоплазмы эндотелиоцитов. Мононуклеарные фагоциты в зоне периваскулярной деструкции. Опыт. 28 сутки. Контрастировано по Рейнольдсу. Ув. 20000.

Во всех слоях кортекса опытных крыс наблюдается низкая плотность остеоцитов, участки без клеток. Отмечены лизированные остеоциты, остеоциты с пикнозом ядра, а также пустые лакуны (рис. 5.53).

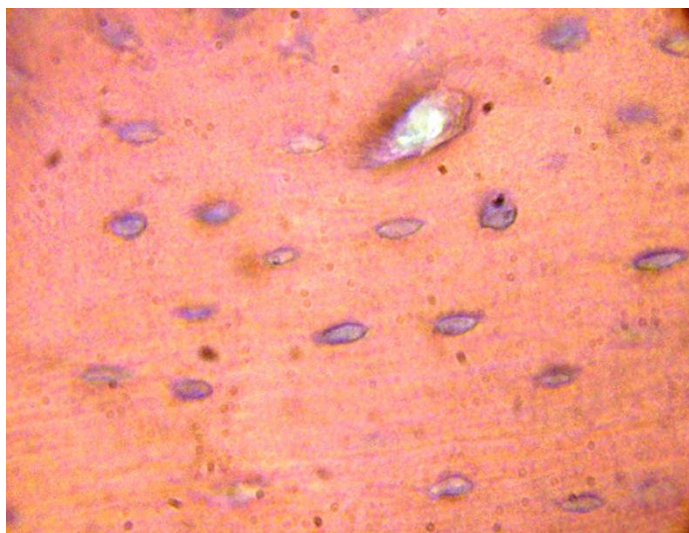


Рис. 5.53. Пустые лакуны без остеоцитов. Опыт. 28 суток. Гематоксилин и эозин. Ув. 400.

Количество остеоцитов на 7-е, 14-е и 28-е сутки было снижено, соответственно на 18,6; 17,9 и на 23,5 %, чем в аналогичные сроки опытных 6-месячных животных, а численность пустых лакун, больше на 21,6; 23,5 и 21,9 %, соответственно (табл. 5.1).

Таблица. 5.1

Определяемые показатели ($M \pm m$), характеризующие состояние костной ткани диафизов бедренной кости 24-месячных крыс на различные сроки наблюдения

Определяемый параметр	Контроль	Опыт (сутки после холодового воздействия)		
		7	14	28
Количество остеоцитов и пустых лакун (n=14)	$67,83 \pm 5,34$	$66,53 \pm 4,92$ P > 0,05	$67,82 \pm 5,11$ P > 0,05	$66,34 \pm 4,95$ P > 0,05
Количество остеоцитов (n=14)	$60,14 \pm 4,72$	$39,24 \pm 2,13$ P < 0,001	$38,43 \pm 2,23$ P < 0,001	$34,13 \pm 2,15$ P < 0,001

Определяемый параметр	Контроль	Опыт (сутки после холодового воздействия)		
		7	14	28
Количество пустых лакун (n=14)	5,81 ± 0,73	27,14 ± 1,53 P < 0,001	29,55 ± 1,64 P < 0,001	32,84 ± 1,92 P < 0,001
Площадь (мкм ²) лакун остеоцитов (n=14)	52,25 ± 3,81	59,45 ± 3,32 P > 0,05	66,52 ± 3,41 P < 0,01	69,59 ± 4,32 P < 0,01

Примечание.

P – достоверность различия по сравнению с контрольной группой.

По сравнению с контролем количество пустых лакун остеоцитов на все сроки наблюдения было достоверно большим как у опытных 6-месячных, так и у опытных 24-месячных животных. Большинство остеоцитов имели расширенные лакуны. Их площадь на 7-е сутки не отличалась от показателей в контроле, а на 14-е и 28-е сутки была большей, соответственно на 25,5 и 29,3 % чем в контроле (табл. 5.1).

Таким образом, проведенное исследование по влиянию гипотермии, вызванной пребыванием крыс в холодной камере (–20 °С) в течение 5 суток по 5 часов ежедневно вызывает в компактном веществе костной ткани 6- и 24-месячных крыс выраженные деструктивные изменения как клеток, так и костного матрикса. У 24-месячных крыс наблюдаемые изменения – трещины, разрыхления и гомогенизация матрикса, деструктивные щели, расширение и запустение костных каналов, пикноз и лизис ядер остеоцитов, деструкция органелл цитоплазмы были выраженными, что проявилось большими территориями деструктивных изменений костного матрикса, а также повышением количества деструктивных остеоцитов, пустых лакун без остеоцитов и снижением плотности остеоцитов по территории среза диафиза.

У 6-месячных животных качественные и количественные показатели, характеризующие состояние костной ткани, свидетельствуют о начале восстановительных процессов к 28 суткам после гипотермии. У животных 24-месячного возраста к данному периоду процессы деструкции превалируют над костеобразованием.

РАЗДЕЛ 6
ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO ОСОБЕННОСТЕЙ
КОЛОНИЕОБРАЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ХОЛОДОВОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ

В связи с тем, что при исследовании структурной организации эпифизов и диафизов бедренной кости крыс после холодового воздействия были установлены деструктивные изменения в костном мозге (см. разд. 5), представляется целесообразным изучить особенности колониобразования мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крыс.

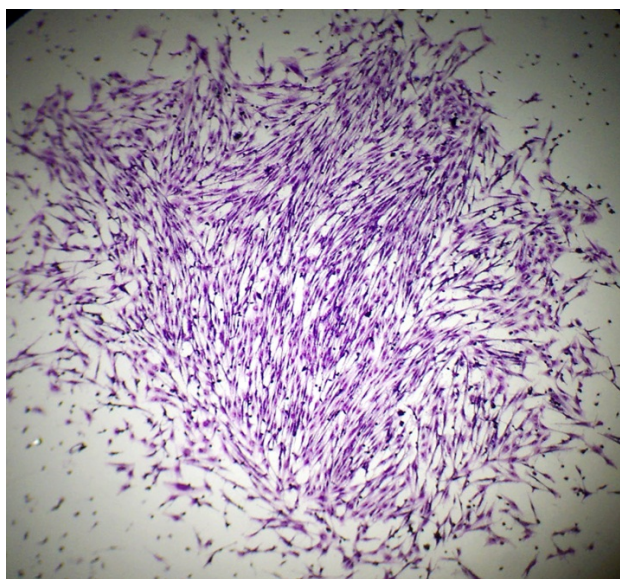
Использовали особенности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга образовывать в процессе культивирования колонии, количество которых и размеры (количество клеток в колонии) зависит от состояния клеток, а также их количества. Из литературы известно, что с возрастом количество МСК уменьшается [14]. Так, установлено, что наибольшее количество стромальных клоногенных клеток в костном мозге наблюдалось у 5-месячных крыс. Показатели эффективности клонирования и числа стромальных клоногенных клеток значительно снижалось к 24 месяцам [15]. Действие неблагоприятных факторов на организм может вызывать ультраструктурные изменения в МСК, что сказывается в дальнейшем на пролиферативной активности клеток, а также на их способности образовывать колонии. Имеются данные литературы, что количество клеточных колоний и клеток в колониях после действия на организм крыс экспериментальной гиподинамии было ниже, чем у контрольных животных [61]. Снижение пролиферативной активности и способности к дифференцировке в остеогенном направлении МСК костного мозга *in vitro* было установлено у больных остеопорозом [26].

Целью данного раздела было оценить особенности колониеобразования МСК костного мозга 6- и 24-месячных крыс после гипотермии.

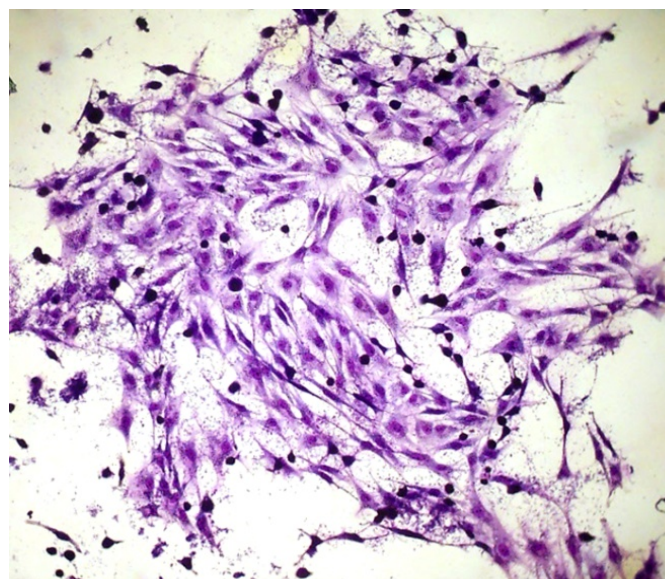
Поведено исследование культивированных МСК костного мозга контрольных крыс, а также опытных крыс после гипотермии (на 7 и 28 сутки после 5 суточного холодового воздействия, температура холодной камеры, где содержались крысы $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Установлено, что как в контрольных, так и в опытных культурах МСК костного мозга 6-месячных крыс (на 7 сутки после окончания холодового воздействия) наблюдались клеточные колонии, которые были представлены различным количеством клеток. Между колониями располагались одиночные клетки вытянутой формы с длинными отростками.

В контрольных культурах на поверхности культурального флакона насчитывалось в среднем $14,2 \pm 1,3$ колонии, а в опыте – $9,3 \pm 0,8$, что было на 34,5 % ($P < 0,01$) меньше. Обращало внимание и то, что количество клеток в колониях было различным, что обуславливало различную площадь колоний. Так, в контрольных культурах площадь колоний в среднем была равна $3,79 \pm 0,29\text{ мм}^2$. Плотность клеток была большой, часто клетки напозали друг на друга, так что границы отдельных клеток не всегда были четко различимы (рис. 6.1), т.е. имело место формирование многослойных колоний.



А



Б

Рис. 6.1 (А, Б). Клеточные колонии МСК костного мозга 6-месячных крыс на 7 сутки после холодового воздействия: А) Контрольная культура. Б) Опытная культура. Окраска по Романовскому. А) Ув. 100 и Б) Ув. 200.

В опытных культурах клетки в колониях располагались рыхло, местами в один слой, формируя однослойные колонии (см. рис. 6.1 Б). Площадь колоний в опытных культурах равнялась $2,27 \pm 0,25 \text{ мм}^2$, что было на 40,1 % меньше, чем в контрольных культурах.

Морфологический анализ колоний МСК костного мозга показал, что в обоих случаях клетки имели вытянутую – палочковидную или веретеновидную форму, иногда треугольную форму и несколько цитоплазматических отростков с помощью которых клетки контактировали между собой. Клетки характеризовались гомогенной цитоплазмой и крупным ядром (рис. 6.2).

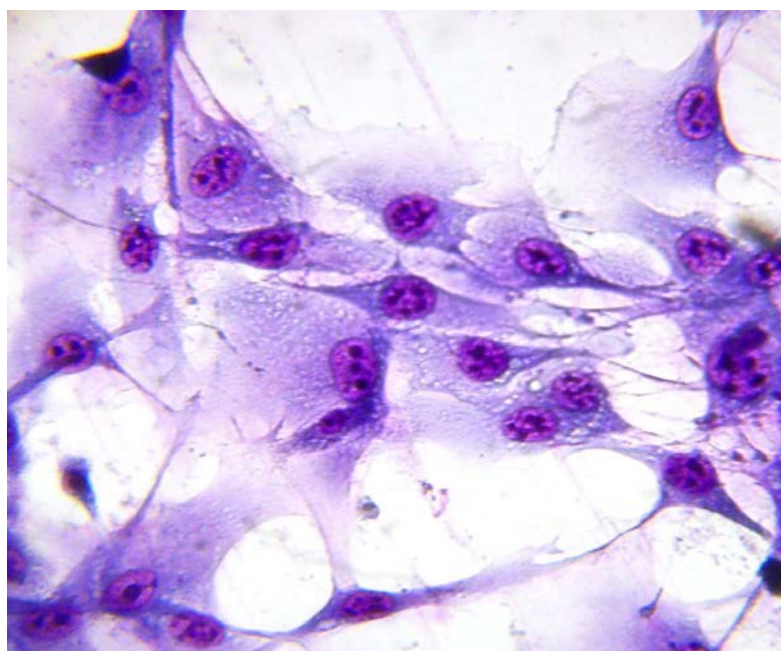


Рис. 6.2. Контрольная культура МСК костного мозга 6-месячных крыс. Окраска по Романовскому. Ув. 400.

В клетках опытных культур, особенно на периферии колоний, часто выявлялись деструктивные изменения – вакуолизация цитоплазмы, разрывы мембран и пикноз ядра (рис. 6.3).

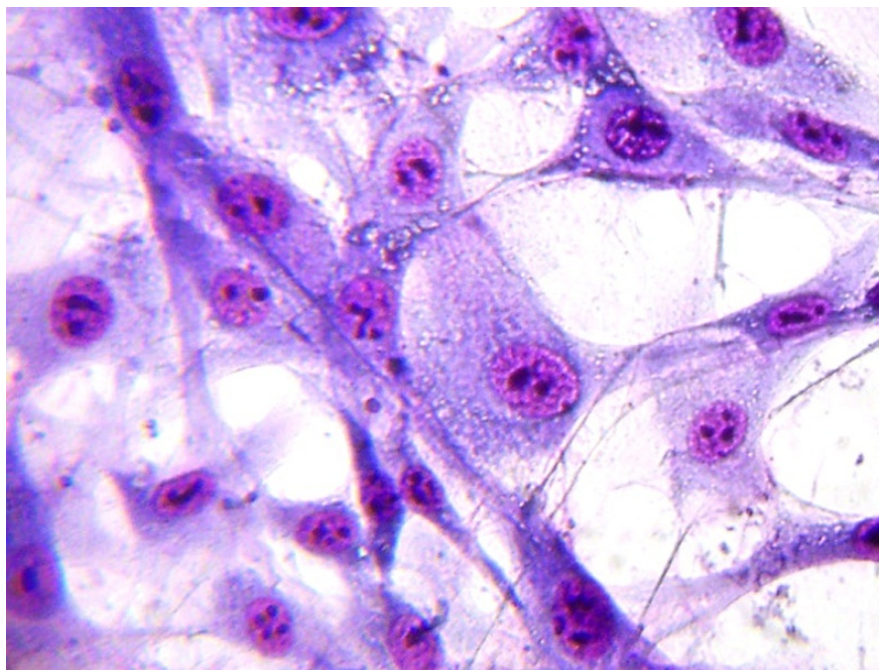


Рис. 6.3. Опытная культура МСК костного мозга 6-месячных крыс. Клетки с деструктивными изменениями. Окраска по Романовскому. Ув. 400.

Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии гипотермии на состояние клеток костного мозга и их колониобразующую функцию. В литературе имеются данные о том, что неблагоприятные факторы могут вызывать нарушения структурной организации МСК костного мозга. Так, было установлено, что у МСК костного мозга крыс, которые в течение 28 суток пребывали в условиях гиподинамии, обнаруживались выраженные ультраструктурные изменения – конденсация хроматина ядра в одних участках и деконденсация в других, деструкция мембран, выход хроматиновых фибрилл в цитоплазму и др. [75].

При культивировании клеток костного мозга, выделенного у крыс на 28 сутки после холодового воздействия, морфологическая картина культур клеток была подобна, описанной на 7 сутки (рис. 6.4).

Количество колоний в опытных культурах, клеток в колониях и их структурная организация свидетельствует о восстановительных процессах, происходящих в костном мозге.

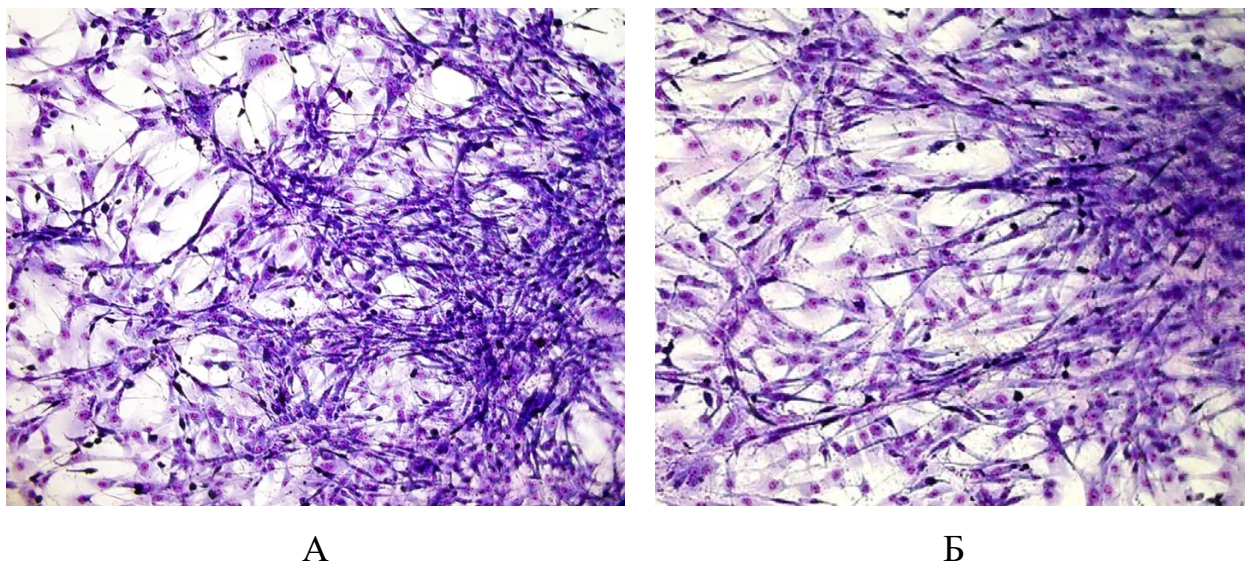
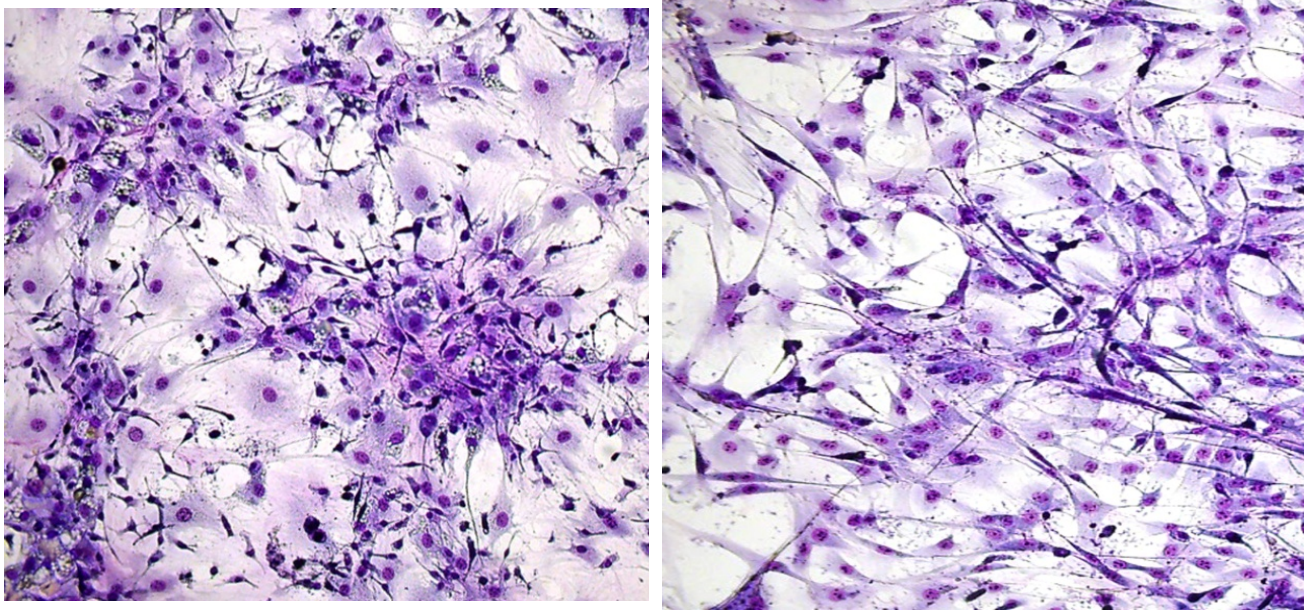


Рис. 6.4 (А, Б). Клеточные колонии МСК костного мозга 6-месячных крыс на 28 сутки после холодового воздействия. А). Контрольная культура. Б). Опытная культура. Окраска по Романовскому. Ув. 200.

Так, количество клеточных колоний в опытных культурах ($12,4 \pm 1,02$) достоверно не отличалось от числа колоний в контрольных культурах ($13,9 \pm 1,2$), а также от показателей контрольной культуры на 7 сутки и было достоверно ($P < 0,05$) большим на 25 % от количества колоний в опыте на 7 сутки. Плотность клеток в колониях контрольных культур была большей, чем в опыте и это сказывалось на площади колоний. Площадь колоний в опытных культурах составляла $3,38 \pm 0,32 \text{ мм}^2$, что было достоверно выше на 32,8 %, чем в первом опыте, однако достоверно не отличалось от показателей в контрольных культурах, где площадь колоний составила $3,84 \pm 0,39 \text{ мм}^2$. Обращало внимание снижение числа клеток в опытных культурах с деструктивными изменениями.

При исследовании колониеобразующей функции МСК костного мозга **24-месячных крыс** на 7 сутки после холодового воздействия было установлено, что в контрольных культурах выявлялись немногочисленные ($7,92 \pm 0,72$) небольшие по размерам, чаще однослойные, клеточные колонии (рис. 6.5 А). Количество колоний было в 1,8 раза меньше, чем в контрольных культурах 6-месячных крыс.



А

Б

Рис. 6.5 (А, Б). Клеточные колонии МСК костного мозга 24-месячных крыс на 7 сутки после холодового воздействия: А) Контрольная культура. Б) Опытная культура. Окраска по Романовскому. Ув. 200.

По территории культурального флакона за границами колоний обнаруживались многочисленные фибробластоподобные клетки, расположенные одиночно. У значительной части клеток выявлялись деструктивные изменения – вакуолизация цитоплазмы и пикноз ядра. Площадь колоний составляла в среднем $1,76 \pm 0,13 \text{ мм}^2$, что было в 2,15 раза меньше, чем у контрольных 6-месячных крыс и в 1,3 раза меньше, чем в культуре опытных 6-месячных животных.

В опытных культурах МСК костного мозга 24-месячных крыс преобладали одиночные клетки, которые не формировали колоний

(см. рис. 6.5 Б). Встречались лишь небольшие кластеры клеток. Количество клеток в них было $10,85 \pm 2,93$.

Полученные данные свидетельствуют о том, что на активность формирования клеточных колоний в культуре МСК костного мозга влияет как возраст животных, так и холодовое воздействие.

В опытных культурах МСК костного мозга, выделенного у 24-месячных животных после 28 суток холодового воздействия, в отличие от 7 суток, обнаруживалось небольшое количество клеточных колоний. Так, количество колоний составило $8,25 \pm 0,86$, что было меньше на 30,6 %, чем в у 6-месячных животных на этот срок. Также была меньше в 1,7 раза и площадь ($1,88 \pm 0,17 \text{ мм}^2$) образовавшихся колоний при сравнении с культурами 6-месячных животных.

В контрольных культурах количество колоний составило $10,2 \pm 1,1$, что не отличалось от количества колоний в опыте, но было на 26,6 % меньше, чем в контроле 6-месячных животных. Площадь колоний ($2,47 \pm 0,21 \text{ мм}^2$) была на 23,8 % больше, чем в опыте.

Необходимо обратить внимание на то, что если через 7 суток холодового воздействия в культурах МСК костного мозга 24-месячных животных, мы не обнаруживали клеточных колоний, то через 28 суток такие колонии присутствовали, что указывает на восстановительные (адаптационные) процессы, происходящие в костном мозге крыс.

Таким образом, гипотермия, вызванная пребыванием крыс в холодной камере в течение 5 суток, негативно влияет на состояние МСК костного мозга, угнетая их пролиферативную активность и способность образовывать клеточные колонии. В культивированных МСК костного мозга опытных животных на 7 сутки наблюдаются деструктивные изменения и уменьшение по сравнению с контролем количества колоний и клеток в них. По истечению 28 суток после холодового воздействия различия между опытными и контрольными культурами были менее выражены как у 6-месячных, так и у 24-месячных животных по сравнению с показателями культур на 7 сутки. Это

свидетельствует о восстановительных процессах, протекающих в костном мозге, однако у 24-месячных животных эти процессы были выражены в меньшей степени.

РАЗДЕЛ 7

ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ, МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ БЕДРЕННОЙ КОСТИ КРЫС ПОСЛЕ ГИПОТЕРМИИ

В связи с тем, что в предыдущих разделах было доказано негативное влияние гипотермии на структурную организацию губчатой и компактной костей, и были выявлены значительные деструктивные изменения в костном матриксе, который содержит многочисленные макро- и микроэлементы, *целью* настоящего раздела работы явилось изучение суммарной минеральной плотности бедренных костей крыс, а также содержания макро- микроэлементов в норме и после гипотермии.

7.1. Исследование минеральной плотности костной ткани у крыс различного возраста

На костном денситометре Explorer QDR (Hologic) была проведена оценка минеральной плотности костной ткани бедренных костей 6- и 24-месячных животных до воздействия холода и на 28-е сутки после гипотермии.

При изучении показателей контрольной группы было установлено, что минеральная плотность костной ткани бедренных костей у 6-месячных крыс в контроле была на 19,7 % меньше, чем у 24-месячных животных (табл. 7.1).

Это может быть связано с тем, что у 24-месячных крыс сохраняются функционально активные зоны роста и, соответственно, имеет место повышение костной массы. У 6-месячных животных, очевидно, еще не наступил пик формирования минеральной плотности костной ткани. Литературных данных о минеральной плотности костной ткани бедренных костей крыс мы не обнаружили.

Таблица 7.1

Показатели минеральной плотности костной ткани (г/см²) крыс разного возраста до и после холодого воздействия

Возраст крыс	Экспериментальные группы животных	
	Контроль	Опыт
6-месячные	0,177 ± 0,002	0,163 ± 0,003 P < 0,05
24-месячные	0,212 ± 0,003 P1 < 0,01	0,186 ± 0,004 P < 0,05 P1 < 0,05

Примечания:

1. P – достоверность отличий по отношению к контрольным показателям.
2. P1 – достоверность отличий относительно 6-месячных животных

Пребывание крыс в холодной камере в течение 5 суток по 5 часов ежедневно приводило к снижению минеральной плотности костной ткани, которое не восстанавливалось и на 28 сутки после действия холода. На 28 сутки после холодого воздействия минеральная плотность костной ткани у 6-месячных животных была снижена на 8 % по сравнению с контролем, а у 24-месячных – на 12,3 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что минеральный обмен костной ткани 24-месячных животных более подвержен гипотермическому влиянию.

7.2. Изучение макро- и микроэлементов бедренной кости крыс различного возраста

В связи с тем, что минеральная плотность костной ткани во многом зависит от макро- и микроэлементного состава кости в продолжение исследования было определено состояние макроэлемента фосфора (P) и соотношения Са/P, а также отдельных микроэлементов – Mg, Zn, Fe, Cu, в

бедренной кости 6- и 24-месячных крыс после гипотермии и без холодого воздействия.

Известно, что остеотропные макро- и микроэлементы являются важнейшими структурными составляющими костной ткани, а также регуляторами и непосредственными составляющими макромолекулярных компонентов биоорганических взаимодействий. Именно минеральная составляющая костного матрикса ответственна за сложную архитектуру кости. Многочисленными исследованиями установлено, что макро- и микроэлементный состав кости меняется с возрастом, а также под влиянием различных физических и химических факторов окружающей среды [47, 32, 55, 70]. Имеются также сведения и о том, что микроэлементный состав неодинаков в разных костях скелета [41]. Однако работ, в которых бы изучали указанные макро- и микроэлементы в восстановительном периоде после смоделированной гипотермии у крыс, мы не встретили.

При определении содержание фосфора в компактной кости, а также соотношение Ca/P (в норме составляет 1,67) установлено, что содержание фосфора у 6- и 24-месячных крыс различалось. У 6-месячных крыс его содержание было на 6,1 % больше, чем у крыс 24-месячного возраста (табл. 7.2).

Таблица 7.2

Содержание минеральных компонентов в бедренной кости крыс разного возраста (массовая доля элемента, %, масс.)

Микро-элементы	Возраст животных		Достоверность отличий	Процент отличий
	6 месяцев	24 месяца		
Ca/P	1,8834 ± 0,049	1,6503 ± 0,0321	t=4 P < 0,001	< на 12,4 %
Фосфор	13,3611 ± 0,2730	12,5510 ± 0,2441	t=2,2 P < 0,05	< на 6,1 %
Магний	0,7287 ± 0,0151	0,8192 ± 0,0251	t=2,8 P < 0,01	> на 12,4 %

Микро-элементы	Возраст животных		Достоверность отличий	Процент отличий
	6 месяцев	24 месяца		
Железо	0,0031 ± 0,0010	0,0062 ± 0,0010	t=2,2 P < 0,05	> на 200 %
Цинк	0,0166 ± 0,0010	0,0113 ± 0,0010	t=3,7 P < 0,001	< на 31,9 %
Медь	0,0024 ± 0,0010	0,0011 ± 0,0010	t=0,92 P > 0,05	НД

Примечание.

P – достоверность различия между группами

С возрастом отмечено значительное снижение отношения Ca/P. У 6-месячных животных оно было выше на 12,4 % (см. табл. 7.2). Такое снижение показателей соотношения Ca/P при незначительном уменьшении содержания фосфора может быть связано с более выраженным снижением содержания кальция в кости. Данные литературы свидетельствуют о том, что с возрастом, а именно до зрелого возраста количество кальция постепенно возрастает, а затем – в предстарческом и старческом возрасте – снижается [47, 70].

Спектр микроэлементов, определяемых в нашем исследовании, (железо, медь, цинк, магний) в костной ткани с возрастом изменялся по-разному. Так, количество железа и магния с возрастом повышалось, а содержание цинка и меди – снижалось.

Исследованиями установлено повышение на 12,3 % содержания магния с возрастом (см. табл. 7.2). Факт накопления магния и других микроэлементов в кости старых животных имеет важное значение, так как они могут заменять ионы кальция в кристаллической решетке, что ведет к утрате механической прочности кости [47]. Наши данные совпадают с исследованиями А.Н. Накоскина и М.И. Новикова (2008) которые также зафиксировали факт увеличения содержания магния в большеберцовых костях старых собак [43].

Однако в литературе имеются и другие сведения о динамике изменения магния в костях животных разного возраста. Так, В.З. Сикора (2013) сообщил об уменьшении содержания магния в костях скелета старых крыс [67].

При исследовании цинка в компактном веществе бедренных костей крыс нами установлено снижение его концентрации с возрастом на 31,9 % (см. табл. 7.2). Данные исследований свидетельствуют о том, что из определяемых микроэлементов наибольшее содержание в диафизе бедренной кости 6- и 24-месячных крыс было магния и цинка. Это указывает не только на их биохимическую роль, но и механическую.

Содержание меди по нашим данным снижалось, однако недостоверно (см. табл. 7.2).

В отличие от выше описанных микроэлементов, количество железа в компактной кости крыс с возрастом повысилось в 2 раза (см. табл. 7.2). Увеличение количества железа с возрастом было отмечено и другими авторами при исследовании костей голени крыс разного возраста [67], а также в большеберцовых костях собак [43].

Увеличение содержания железа в диафизе бедренной кости крыс 24-месячного возраста при значительном уменьшении уровня кальция, может быть обусловлено конкурирующими отношениями двухвалентного железа и кальция за места в кристаллической решетке оксиапатита [43].

7.3. Изучение макро- и микроэлементов бедренной кости крыс различного возраста после холодового воздействия

На 14-е сутки после холодового воздействия у 6-месячных крыс отмечены изменения в макро- и микроэлементном составе в диафизе бедренной кости крыс. Так, зафиксировано достоверное повышение на 6,9 и 8,9 % уровня фосфора и магния в костной ткани, по сравнению с контролем (см. табл. 7.2., 7.3). При этом отношение Ca/P – снизилось на 9,2 %. Снижение показателя соотношения Ca/P может быть связано с увеличением концентрации фосфора в кости или снижением содержания кальция. По нашим данным повышение

содержания фосфора было не таким значительным при сравнении с показателями снижения соотношения Ca/P, поэтому можно предположить, что наблюдалось и снижение уровня Ca в кости.

Таблица 7.3

Содержание минеральных компонентов в бедренной кости крыс разного возраста (массовая доля элемента, %, масс) на 14 сутки после гипотермии

Макро- и микро-элементы	Возраст животных		Достоверность отличий	Процент отличий
	6 месяцев	24 месяца		
Ca/P	1,7103 ± 0,0321	1,5122 ± 0,0251	t=4,9 P < 0,001	> на 11,6 %
Фосфор	14,2870 ± 0,2520	13,7921 ± 0,2701	t=1,3 P > 0,05	НД
Магний	0,7936 ± 0,0201	0,9289 ± 0,0320	t=3,3 P < 0,01	< на 17 %
Железо	0,0049 ± 0,0010	0,0097 ± 0,0010	t=3,4 P < 0,001	< на 98 %
Цинк	0,0183 ± 0,0010	0,0135 ± 0,0010	t=3,4 P < 0,001	> на 26,2 %
Медь	0,0035 ± 0,0010	0,0039 ± 0,0010	t=0,28 P > 0,05	НД

Примечание.

P – достоверность различия между группами

Показатели железа, цинка и меди несколько повысились, но достоверной разницы с контрольными показателями не было установлено (см. табл. 7.3).

У животных 24-месячного возраста наблюдалась несколько иная картина. Так, более выраженным было повышение уровня фосфора по сравнению с контролем. Его концентрация увеличилась относительно контроля на 9,8 %, а показатели соотношения Ca/P – снизились на 8,4 % (см. табл. 7.3.). Они были

ниже показателей у 6-месячных животных на 11,6 %, что свидетельствует о выраженных изменениях в концентрации макроэлементов в бедренной кости животных 24-месячного возраста под влиянием гипотермии.

Были установлены и отличия в содержании в бедренной кости микроэлементов. Так, в кости зафиксировано достоверное повышение содержания магния, железа и меди по сравнению с контролем. Уровень магния увеличился в 1,17 раза, а железа и меди в 1,56 и 3,5 раза, соответственно (см. табл. 7.3).

При сравнении показателей содержания микроэлементов в кости 6- и 24-месячных животных после гипотермии было установлено, что содержание магния и железа превышало показатели 6-месячных животных на 17 и 98 %, соответственно. Показатели цинка у крыс 24-месячного возраста были ниже на 26,2 %, чем у 6-месячных крыс. По содержанию меди у 6- и 24-месячных животных различий не выявлено.

На 28-е сутки после холодового воздействия у **6-месячных** животных в кости отмечено повышение показателя соотношения Ca/P на 7,6 %, по сравнению с предыдущим сроком исследования (14 сутками), а при сравнении с контрольными показателями отличий не установлено (см. табл. 7.2, 7.3, 7.4).

Таблица 7.4

Содержание минеральных компонентов в бедренной кости крыс разного возраста (массовая доля элемента, %, масс.) на 28-е сутки после гипотермии

Макро- и микро-элементы	Возраст животных		Достоверность отличий	Процент отличий
	6 месяцев	24 месяца		
Ca/P	1,8423 ± 0,0431	1,5678 ± 0,0310	t=5,2 P < 0,001	< на 14,9 %
Фосфор	13,4891 ± 0,2710	13,969 ± 0,387	t=1 P > 0,05	НД
Магний	0,7333 ± 0,02701	0,8954 ± 0,035	t=3,7 P < 0,001	> на 22,1 %

Макро- и микро-элементы	Возраст животных		Достоверность отличий	Процент отличий
	6 месяцев	6 месяцев		
Железо	0,0046 ± 0,0011	0,0066 ± 0,0010	t=1,4 P > 0,05	НД
Цинк	0,0152 ± 0,0010	0,0128 ± 0,0010	t=1,7 P > 0,05	НД
Медь	0,0040 ± 0,0010	0,0027 ± 0,0010	t=0,92 P > 0,05	НД

Примечание.

P – достоверность различия с контрольной группой

Это может указывать на протекающие восстановительные процессы в кости. Уровень фосфора также не отличался от показателей контрольных животных и был ниже на 5,6 % по отношению к показателям, полученным на 14-е сутки (см. табл. 7.2, 7.3, 7.4). Не выявлено различий между контрольными животными по таким показателям, как: магний, железо, цинк и медь. По сравнению с 14 сутками уровень магния и цинка снизился на 7,6 и 17 %, соответственно. Эти данные также свидетельствуют о восстановительных процессах в костной ткани 6-месячных крыс.

У **24-месячных** животных зафиксировано повышенное на 11,3 % содержание фосфора относительно контроля и снижение показателей отношения Ca/P на 5 % (табл. 7.4). Сравнение указанных показателей с предыдущим сроком наблюдения (14-е сутки) не выявило отличий.

Наши данные совпадают с исследованиями Чистолиновой Л.И. (1992), которая также обнаружила повышение содержания фосфора в большеберцовых костях крыс после холодового воздействия (крысы в течение 90 суток по 6

часов ежедневно содержались в помещении при низкой температуре воздуха $-2...-4$ °C) [73].

Оставался высоким показатель содержания магния в кости. Относительно 14-х суток он не изменился, а по сравнению с контролем был выше на 9,3 % (см. табл. 7.2, 7.4). Зафиксировано снижение в 1,47 раза показателей железа по сравнению с 14-и сутками, однако от контроля отличий не выявлено. Достоверных отличий показателей цинка и меди относительно 14-х суток и контрольных животных не установлено.

Сравнительный анализ показателей макро- и микроэлементов в бедренной кости крыс 6-месячного и 24-месячного возраста показал, что в связи с тем, что содержание фосфора у 24-месячных животных не отличалось от 6-месячных, а показатели соотношения Ca/P было на 14,9 % снижены, можно предположить, что содержание кальция в бедренной кости 24-месячных крыс на данный срок наблюдения оставалось низким.

У крыс 24-месячного возраста показатели содержания магния превышали на 22,1 % показатели 6-месячных животных. Уровни железа, цинка и меди были незначительно меньшими.

Таким образом, в результате оценки минеральной плотности костной ткани и исследования макро- и микроэлементов, было установлено, что в бедренной кости крыс 6- и 24-месячного возраста имеются определенные отличия. Выявлено, что показатели минеральной плотности достоверно снижаются с возрастом, а также после гипотермии, что соответствует общим тенденциям старения костной ткани. Полученные данные о микроэлементном составе диафиза бедренных костей крыс 24-месячного возраста свидетельствуют, что на 28 сутки после гипотермии обнаруживаются значительные изменения в содержании макро- и микроэлементов. Выявленные изменения могут быть связаны с иволютивными процессами в нейроэндокринной системе, нарушением баланса гормонов после гипотермии. У животных 24-месячного возраста не происходит полного восстановления микроэлементного состава, характерного для контрольных животных.

ВЫВОДЫ

На 202 белых крысах 6- и 24-месячного возраста проведено комплексное морфологическое исследование структурной организации костной ткани после гипотермии, которое привело к снижению температуры тела у 6-месячных животных на 2,29 °С, а у 24- месячного возраста на 4,04 °С, что соответствует легкой гипотермии (по классификации J.S. Tuli, 2009). На основе результатов изучения структурных и ультраструктурных изменений клеток и матрикса компактной и губчатой кости животных разного возраста, определения морфометрических показателей, характеризующих состояние костной ткани, а также исследования минеральной плотности и микроэлементного состава кости у крыс после гипотермии решена актуальная научная медико-биологическая задача по раскрытию особенностей ремоделирования костной ткани в условиях общей легкой гипотермии. В связи с многообразными функциями костной ткани особенности ее ремоделирования находились в фокусе работы.

При проведении сравнительного анализа влияния легкой гипотермии на организм крыс 6- и 24-месячного возраста доказано, что температура тела снижалась интенсивнее у животных 24-месячного возраста, кроме того, у последних имело место удлинение восстановительного периода.

Установлено, что даже небольшое снижение (на 2-4 °С) температуры тела животных приводит к развитию деструктивных изменений в клетках кости – остеоцитах, остеобластах и остеокластах. В цитоплазме остеоцитов зафиксировано присутствие очагов деструкции в виде гомогенных масс, лизиса участков плазматической мембраны, преобладание слабо развитых мембранных органелл. В ядре остеоцитов формируются расширенные перинуклеарные пространства, заполненные тканевой жидкостью. Ядра остеоцитов представлены преимущественно гетерохроматином, в части остеоцитов отмечены электронноплотные фрагментированные ядра. Гипотермия вызывает гибель

остеоцитов, что подтверждается достоверным превышением над контрольными показателями количества лакун без остеоцитов у опытных 6- и 24-месячных животных на все сроки исследования. Наблюдается явления остеоцитарного лизиса, что обуславливает достоверно выраженное расширение лакун остеоцитов. Площадь лакун остеоцитов у опытных животных 6- и 24-месячного возраста на 28-е сутки после гипотермии была большей, соответственно на 29,3 % и на 31,3 % по сравнению с контролем.

Изменение ультраструктурной организации клеток и матрикса костной ткани, вследствие действия гипотермии, обуславливает нарушение процесса ремоделирования костной ткани. Об этом свидетельствуют морфометрические показатели, характеризующие этот процесс: наблюдается снижение ширины костных трабекул, увеличение количества пустых лакун остеоцитов, появление очагов остеолизиса, уменьшение площади костных трабекул и расширение межтрабекулярных пространств. Выявлена активация резорбционных процессов, о чем свидетельствуют результаты исследования ультраструктурной организации остеокластов и численности резорбционных полостей на костных трабекулах, заполненных активными остеокластами. У животных 24-месячного возраста перечисленные явления были выражены в большей степени.

Зафиксированы структурные изменения клеток костного мозга межтрабекулярных пространств и мозгового канала, а также нарушение колониобразующей способности стромальных клеток костного мозга крыс после действия гипотермии. Установлена интегративная связь нарушений сосудистого русла и костной ткани.

Под действием гипотермии снижаются показатели минеральной плотности костной ткани, а также имеет место дисбаланс минерального состава (P, Ca/P, Mg, Zn, Cu, Fe) кости в результате действия гипотермии.

Выявленные нарушения костной ткани характерны для остеопении и остеопороза. Чаще такие изменения прослеживаются у людей пожилого и старческого возраста. Из анализа литературы известно, что проблема гипотермии особенно актуальна для пожилых людей, так как доказано, что внутренняя

температура тела снижается с возрастом (в физиологических пределах). Это происходит в связи с уменьшением способности организма вырабатывать тепло (по разным причинам), снижением активности термогенеза в бурой жировой ткани, сужением периферических сосудов. Есть данные о том, что у пожилых людей температура тела может быть $35,5^{\circ}\text{C}$ и даже ниже. В проведенном M. Mallet (2002) исследовании пациентов с гипотермией (легкая гипотермия – температура тела до 35°C) указывается, что у 85 % из них был возраст старше 60 лет [127]. Эти данные указывают на важность исследования влияния гипотермии на костную ткань, как фактора риска развития остеопении и остеопороза.

В диссертационной работе на основе комплексного исследования решена актуальная научная задача – раскрыты основные особенности нарушения ремоделирования костной ткани в условиях общей легкой гипотермии у крыс разного возраста.

1. итературных источников свидетельствует, что гипотермия оказывает отрицательное влияние на структурно-метаболические показатели костной ткани. Выраженность действия гипотермии на костную ткань зависит от ее продолжительности и тяжести, то-есть границы снижения температуры тела. В литературе имеются лишь единичные исследования относительно структурных изменений компактной и губчатой кости, ультраструктурной организации клеток кости после действия гипотермии. Практически отсутствуют данные об особенностях ремоделирования костной ткани крыс разного возраста в условиях гипотермии.

2. Отработана экспериментальная модель легкой гипотермии у крыс разного возраста и доказано, что пребывание крыс в холодовой камере (-20°C) в течение 5 суток по 5 часов ежедневно приводит к снижению температуры тела у 6-месячных крыс на 5-е сутки на $2,29^{\circ}\text{C}$, а у 24-месячных животных – на $4,04^{\circ}\text{C}$. Восстановление температуры тела у 6-месячных животных наблюдается на 3 сутки после окончания эксперимента, а у 24-месячных крыс – через 6 суток после окончания холодового воздействия.

3. Гипотермия приводит к развитию структурных и ультраструктурных изменений в клетках и матриксе губчатой и компактной кости как у 6-и, так и у 24-месячных крыс, и оказывает отрицательное влияние на ремоделирование костной ткани, про что свидетельствуют качественные и количественные показатели, которые характеризуют этот процесс. Площадь костных трабекул в опытных 6- и 24-месячных крыс на 28-е сутки после гипотермии была на 16,0 и 16,6 % ниже по сравнению с контролем. Количество остеоцитов на костных трабекулах у опытных 6-месячных животных также было ниже, чем в контроле на 16,9 %, а число пустых лакун без остеоцитов, повышено в 7,5 раза. У 24-месячных животных эти показатели достоверно превышали показатели опытных 6-месячных животных.

4. Гипотермия негативно влияет на ремоделирование кости, активизируя деятельность остеокластов, что приводит к достоверному увеличению (по сравнению с контролем) численности пустых полостей резорбции на костных трабекулах у животных обеих возрастных групп. На 28-е сутки после гипотермии у 24-месячных животных количество полостей резорбции с остеокластами превышает показатели 6-месячных животных на 33,1 %, а число резорбционных полостей, заполненных остеобластами и макрофагами, было снижено на 46 %, что указывает на дисбаланс ремоделирования кости за счет повышения процесса резорбции. У 6-месячных животных, в отличие от 24-месячных, отмечается сдвиг процесса ремоделирования кости в сторону костеобразования, о чем свидетельствует увеличение количества резорбционных полостей, заполненных активными остеобластами и макрофагами.

5. Нарушение процесса ремоделирования кости связано и с негативным влиянием гипотермии на структурную организацию клеток кости – остеоцитов и остеобластов. В цитоплазме остеоцитов зафиксировано присутствие очагов деструкции в виде гомогенных масс, лизиса участков плазматической мембраны. В ядрах остеоцитов и остеобластов повышается содержание гетерохроматина, нарушается структура кариолеммы за счет формирования обширных перинуклеарных полостей, заполненных жидкостью. Снижается

биосинтетическая активность остеобластов, на что указывает преобладание в цитоплазме слабо развитой эндоплазматической сети, деструктивные изменения в ядре, а также в митохондриях – набухание и лизис мембран и крист.

6. Нарушение процесса ремоделирования под влиянием гипотермии наблюдается и в компактной кости. Во всех слоях кортекса опытных крыс как 6-и, так, и 24-месячного возраста отмечена низкая плотность остеоцитов, а количество лизированных остеоцитов и остеоцитов с пикнозом ядра, а также лакун без остеоцитов было увеличено. Количество остеоцитов в кортексе опытных 24-месячных крыс на 7, 14 и 28 сутки было ниже, соответственно на 18,6; 17,9 и на 23,5 %, чем в аналогичные сроки у 6-месячных животных, а процент пустых лакун, соответственно, выше на 21,6; 23,5; 21,9 %.

7. Гипотермия негативно влияет на состояние МСК КМ, подавляя их пролиферативную активность и способность образовывать клеточные колонии. Количество клеточных колоний в культурах КМ опытных 6-месячных животных, а также их площадь на 7-е сутки после гипотермии было ниже по сравнению с контролем на 34,5 и 40,1 %, соответственно. В культуре клеток КМ 24-месячных опытных животных выявляли лишь небольшие клеточные колонии. На 28-е сутки в клеточных колониях как 6-и, так и 24-месячных животных наблюдаются восстановительные процессы, что подтверждается повышением количества клеточных колоний и увеличением их размеров.

8. Гипотермии приводит к снижению показателей минеральной плотности костной ткани и нарушение ее минерального состава (P, Ca/P, Mg, Zn, Cu, Fe) как у 6-и, так и в 24-месячных крыс. На 14-е сутки у 6-месячных крыс наблюдается повышение, относительно контроля, содержания P и Mg, соответственно на 6,9 и 8,9 %, а также снижение на 9,2 % показателей соотношения Ca/P. У 24-месячных крыс отмечено увеличение показателей P – на 9,8 %, Mg – на 13,4 %, Fe – на 56,6 % по сравнению с контролем. Отношение Ca/P снизилось на 8,4 %. На 28-е сутки содержание макро-и микроэлементов у 6-месячных крыс нормализовалось, а у 24-месячных – показатель соотношения Ca/P снизился на 5,0 %. Содержание P –

превышало контрольные показатели на 11,3 %, а Mg – на 9,3 %. Показатели остальных микроэлементов не отличаются от контроля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 381 с.

3. Антиокислительная активность крови у пришлого и коренного населения Крайнего Севера / Казначеев В.П. [и др.] // Механизмы адаптации человека на территории строительства БАМа. Материалы Российской научной конференции. – Благовещенск: Вести, 1993. – С. 20–22.

4. Астаева М.Д. Влияние гипотермии на интенсивность окислительной модификации белков плазмы крови сусликов / М.Д. Астаева, В.Р. Абдуллаев, Н.К. Кличханов // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 3. – С. 254–260.

5. Бабак С.В. Изменения в структуре каналов и кровеносных сосудов бедренных костей крыс при снятии опорной нагрузки / С.В. Бабак // Український морфологічний альманах. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 5–7.

6. Бабийчук В.Г. Количественная оценка антиген-специфических клеток в крови человека после ритмических холодовых воздействий / В.Г. Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 2. – С. 143–153.

7. Батура І.О. Морфологічні характеристики остеонних конструкцій в умовах високих концентрацій глюкокортикоїдів в організмі експериментальних тварин / І.О. Батура // Український морфологічний альманах. – 2005. – №1. – С. 107.

8. Безух М.С. Нейровегетативная блокада и гипотермия в системе нейрохирургического лечения больных с травмой черепа и головного мозга: Дис. д-ра мед. наук / Ленинград, 1982. – С. 437.

9. Бельская Л.В. Оптимизация методики синтеза гидроксилapatита для биомедицинских целей / Л.В. Бельская, О.А. Голованова, А.П. Солоненко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія: фізика. – 2009. – Т. 22(61), №1. – С. 170–181

10. Бруско А.Г. Функциональная перестройка костей и ее клиническое значение / А.Г. Бруско, Г.В. Гайко. – Луганск: ЛГМУ, 2005. – 212 с.

11. Венцовская Е.А. Терморегуляция, сон и температурные воздействия / Е.А. Венцовская, А.В. Шило, Г.А. Бабийчук // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 4. – С. 363 - 378.

12. Виноградова Т.П. Регенерация и пересадка костей / Т.П. Виноградова, Г.И. Лаврищева. – М.: Медицина, 1974. – 247 с.

13. Влияние эмоционально-холодового стресса на фосфорно-кальциевый обмен в пульпе зубов крыс / Т.П. Вавилова, А.В. Митронин, И.Г. Островская, Ю.Г. Гаверова // Российская стоматология. – 2008. – № 1. – С. 12–14.

14. Возрастные изменения в популяции стромальных остеогенных клеток-предшественников / Ю.Ф. Горская, Н.В. Лациник, Е.Ю. Шуклина, В.Г. Нестеренко // Российск. иммунол. журн. – 2000. – Т. 5, № 2. – С. 149–155.

15. Возрастные изменения количества стромальных клеток-предшественников в костном мозге животных / О.В. Лебединская, Ю.Ф. Горская, Е.Ю. Шуклина [и др.] // Морфология. – 2004. – Т. 126, № 4. – С. 46–49.

16. Воронин Н.И. Холодовое воздействие на живые организмы. Морфологические изменения в костной ткани / Н.И. Воронин, В.И. Кириченко // Травматология и ортопедия России: Сб. тр. Санкт-Петербург, 1995. – С. 19–21.

17. Гречин А.Б. Морфофункціональний стан кровоносних судин, гемомікроциркуляторного русла і паренхіми сім'яників в нормі та після дії загальної глибокої гіпотермії / А.Б. Гречин // Дис... канд. мед. наук: 14.03.01 – Івано-Франківськ. – 2002.

18. Даценко Г.В. Морфофункциональные изменения в организме в ответ на общую и локальную гипотермию (обзор литературы) / Г.В. Даценко, Е.Н. Шаповал // Вісник морфології. – 2001. – № 2. – С. 305–307.
19. Дєдх Н.В. Регенерація кістки при аліментарному остеопорозі (експериментальне дослідження) / Н.В. Дєдх, О.А. Нікольченко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2009. – № 2. – С. 34–40.
20. Дмитренко А.С. Гісто-, ультраструктурні зміни гемомікроциркуляторного русла (ГМЦР) та скелетних м'язів у ранні терміни після дії загальної глибокої гіпотермії / А.С. Дмитренко // Вісник морфології. – 2003. – Т. 2. – С. 294–295.
21. Дутчак У.М. Морфофункціональний стан суглобового хряща на висоті дії загальної глибокої гіпотермії / У.М. Дутчак // Вісник морфології. – 2003. – Т. 2. – С. 229 - 230.
22. 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 (URL): http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137
23. Загальна глибока гіпотермія / Б.В. Шутка, О.В. Саган, У.М. Дубчак [та ін.]; за ред. Б.В. Шутки. – Івано-Франківськ, 2006. – 298 с.
24. Золотова-Гайдамака Н.В. Морфологические изменения в остеocyтах в условиях моделированной гипокинезии / Н.В. Золотова-Гайдамака, Н.В. Родионова // Український морфологічний альманах. – 2010. – Т.8, № 2. – С. 66–68.
25. Золотова-Гайдамака Н.В. Морфологические особенности остеocyтов бедренной кости белых крыс при воздействии гипокинезии / Н.В. Золотова-Гайдамака, М.А. Иславава // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 2, Т. 1. – С. 70–74.

26. Ильина В.К. Клеточно-генетические особенности стромальных клеток костного мозга при различных формах остеопороза / В.К. Ильина, Е.В. Прохорова // 3-й симп. по остеопорозу: Тез. докл. – СПб., 2000. – С. 65.
27. Калетина Н. Микроэлементы – биологические регуляторы / Н. Калетина, Г. Калетин // Наука в России. – 2007. – № 1. – С. 2–24.
28. Киреев А.А. Регенерация костной ткани при холодовой травме в условиях лечения изотиорбамином. Автореф. дис. на соискание уч. степени канд. мед. наук: спец. 14.00.22 – травматология и ортопедия / А.А. Киреев. – Якутск, 2006. – 21 с.
29. Ковешников В.Г. Биомеханические методы исследования в функциональной морфологии трубчатых костей / В.Г. Ковешников, В.И. Лузин // Український морфологічний альманах. – 2003. – Т. 1, № 2. – С. 46–51.
30. Количественные показатели содержания некоторых микроэлементов в костях висцерального черепа крыс на фоне введения антиоксиданта / О.Ю. Шарапов, В.И. Ионцев, А.В. Лемещенко, Ю.А. Парфенов // Фундаментальные науки. – 2012. – № 10. – С. 356–358.
31. Колінко Я.О. Стан провідникового апарату та мікроциркуляторного русла сідничного нерва щура на сьому добу після дії загальної глибокої гіпотермії / Я.О. Колінко // Український морфологічний альманах – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 91–94.
32. Кутя С.А. Возрастные особенности фазового состава костного минерала крыс при воздействии гравитационных перегрузок / С.А. Кутя // Укр. морф. альм. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 71–72.
33. Лабораторные животные / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захаоия, Б.В. Западнюк // Киев: Вища школа, 1983. – 391с.
34. Ланг Т.А. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т.А. Ланг, М.М. Сесик // М.: Практическая медицина, 2011. – 480 с.

35. Лапач С.Н. Статистические методы в биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич // К.: Морион, 2000. – 320 с.
36. Ломако В.В. Вплив ритмічного охолодження та біохімічні показники щурів з експериментальною депресією / В.В. Ломако, Л.М. Самохіна // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 22–33.
37. Малова Н.Г. Влияние гипотермии в различных температурных режимах на морфогенез регенерата кости: автореф. дис на получение науч. степени канд. биол. наук / Н.Г. Малова. – Харьков, 1988. – 18 с.
38. Методические рекомендации по получению, культивированию и использованию в научных и производственных ветеринарных лабораториях первичных, перививаемых и диплоидных культур клеток живого происхождения. – М., 1978. – 30 с.
39. Методы оценки параметров функциональной системы кровообращения и компонентного состава тела при декомпенсированном циррозе печени / Ю.Н. Шанин, Б.Н. Котив, В.Н. Цыган, В.И. Ионцев // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2010. – № 4. – С. 216 – 221.
40. Мищук Н.Е. Холодовая болезнь (гипотермия) / Н.Е. Мищук // Медицина неотложных состояний. – 2006. – Т. 4, № 5. – С. 42–47.
41. Мікроелементний склад довгих та мішаних кісток скелета в нормі / Є.В. Гусак, М.В. Погорелов, Г.Ф. Ткач [та ін.] // Український морфологічний альманах. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 51–55.
42. Морфологічні зміни кровоносних судин, гемо капілярів і паренхіми простати на висоті дії холодового фактора та на першу добу постгіпотермічного періоду / Б.В. Шутка, О.Г. Попадинець, В.М. Іваночко, О.В. Саган // Карповські читання: Матеріали II Всеукраїнської наукової морфологічної конференції. – Дніпропетровськ: Пороги, 2005. – 93 с.
43. Накоскин А.Н. Содержание макро- и микроэлементов в онтогенезе и в условиях репаративной регенерации кости у собак / А.Н. Накоскин, М.И. Новиков // Травматология и ортопедия России. – 2008. – № 1 (47). – С. 38–44.

44. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботі з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, Г.А. Сайдетдінова // К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
45. Некачалов В.В. Патология костей и суставов / В.В. Некачалов. – Санкт-Петербург: Сотис, 2000. – 288с.
46. Новиков В.С. Иммунофизиологические механизмы адаптации к экстремальным воздействиям / В.С. Новиков // Физиология человека. – 1996. – Т. 22, №2. – С. 25–34.
47. Новиков М.И. Динамика накопления биогенных макро- и микроэлементов в костной ткани собак в постнатальном онтогенезе и в условиях чрезкостного дистракционного остеосинтеза: автореф. дис на получение науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия» / М.И. Новиков. – Нижний Новгород, 2008. – 23 с.
48. Новиков М.И. Динамика накопления микроэлементов в большеберцовых костях собак / М.И. Новиков, А.Н. Накоскин // Известия Челябинского научного центра. – 2006. – Вып. 3 (33). – С. 148–151
49. О'Делл Б. Биохимические основы клинического эффекта дефицита меди / Б. О'Делл // Нью-Йорк, 2002. – С. 301–310.
50. Оноприенко Г.А. Васкуляризация костей при переломах и дефектах / Г.А. Оноприенко. – М.: Медицина, 1995.–223 с.
51. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение / Н.А. Корж, В.В. Поворознюк, Н.В. Дедух, И.В. Зупанец. – Х: Золотые страницы, 2002. – 646 с.
52. Перестройка минерального матрикса костной ткани / А.С. Аврунин, Н.В. Корнилов, И.Д. Иоффе, В.Г. Емельянов // Морфология. – 2001. – № 2. – С. 37–40.
53. Пикалюк В.С. Современные представления о биологии и функции костной ткани / В.С. Пикалюк, С.О. Мостовой // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Т. 9, №3. – С. 186–194.

54. Поворознюк В.В. Остеопороз / В.В. Поворознюк // Лікування та діагностика. – 1997. – № 3. – С. 20–26.
55. Погорелов М.В. Ріст, будова та формоутворення кісток скелета під впливом загального опромінення та солей важких металів (анатомо-експериментальне дослідження): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук. – Сімф., 2005. – 22 с.
56. Пределы обнаружения примесей в легком наполнителе в рентгенофлуоресцентной схеме с вторичным излучателем / И.Ф. Михайлов, А.А. Батулин, А.И. Михайлов, Л.П. Фомина // ПТЭ. – 2012. - № 4. – С. 80 – 85.
57. 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>
58. Ревелл П.А. Патология кости / П.А. Ревелл. – М.: Медицина, 1993. – 367 с.
59. Рентгенофлуоресцентный анализ / К.Х. Кляйнштюк, Б. Венер, К. Рихтер [и др.]; под ред. Х. Эрхардта; пер. с нем. В.А. Федоровича. – М.: Металлургия, 1985. – С. 255.
60. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе / Н.В. Родионова. – Киев: Наук. думка, 1989. – 186 с.
61. Родионова Н.В. Цитологічні механізми перебудов у кістках при гіпокінезії та мікрогравітації / Н.В. Родионова. – К.: Наукова думка, 2006. – 238 с.
62. Рожинская Л.Я. Системный остеопороз. Практическое руководство для врачей / Л.Я. Рожинская. – М.: Из-во Макеев, 2000. – 195 с.
63. Сагаловски С. RANK-RANKL-OPG система и ремоделирование кости: новые подходы к лечению остеопороза / С. Сагаловски, М. Шенерт // Клінічна та експериментальна патологія. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 146–153.
64. Сагаловски С. Клеточно-молекулярные механизмы регуляции ремоделирования кости: новые концепции в лечении остеопороза /

С. Сагаловски, М. Шенерт // Практикуючому лікарю. – 2011. – № 2. – С. 209–214.

65. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника. Руководство / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

66. Симон М. Клинические и биохимические исследования йодопатического гемохроматоза / М. Симон, М. Боурел // Метаболизм транспорта металла в человеке. – 2009. - Т. 2. – С. 82 – 87.

67. Сікора В.З. Вікові зміни мінеральної щільності кісток скелета щурів у віковому аспекті / В.З. Сікора, Г.Ф. Ткач. – 2013. – [Електронний ресурс]. – Точка доступу: ftp://lib.sumdu.edu.ua/rfo/2013/teor_med.doc.

68. Сундукова Н.В. Влияние повышенной температуры воздуха и инъекций гидроксилapatита на показатели минерального обмена костной ткани / Н.В. Сундукова, В.Г. Подковкин // Вестник Сам-ГУ – Естественнонаучная серия. – 2007. – № 8 (58). – С. 7–15

69. 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.

70. Ткач Г.Ф. Вікові особливості структурно-функціонального стану кісток скелета тварин, які знаходилися в умовах впливу гіпоосмолярної гіпергідратації та динамічних фізичних навантажень / Г.Ф. Ткач // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 1. – С. 248–252.

71. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли // М.: Мир, 1975. – 324 с.

72. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах // М.: Медицина. – 1975. – 295 с.

73. Чистолинова Л.И. особенности роста, строения и формообразования костей скелета при различных температурных режимах: автореф. дис на получение науч. степени канд. мед. наук: спец. 14.00.02 «Анатомия человека» / Л.И. Чистолинова. – Харьков, 1992. – 23 с.

74. Шабанов П.Д. Гипоксия и антигипоксанты / П.Д. Шабанов // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2003. – № 1 (9). – С. 111–121.
75. Шалимов В.А. Некоторые особенности межклеточных цитоплазматических, ядерно-цитоплазматических и ядерно-ядерных соединений в костном мозге контрольных крыс, подвергающихся воздействию гиподинамии / В.А. Шалимов. – Киев: Знание Украины, 2004. – 28 с.
76. Ших Е.В. Взаимодействие железа и кальция / Е.В. Ших // Человек и лекарство. – 2006. – Т. 14. № 4. – С. 256.
77. Aisha M.D. The effects of hypo- and hyperthermia on sparc in normal human osteoblast cells / M.D. Aisha, M.N. Nor-Ashikin, A.B. Sharaniza // Regenerative Research. – 2012. – Vol. 1, №1. – P. 62–65.
78. Apoptosis. – [Электронный ресурс]. – Точка доступа: <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch6G.htm>
79. Asanami S. Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells / S. Asanami, K. Shimono // Mutat Res. – 1997. – Vol. 393, № 1-2. – P. 91–98.
80. Aubin J.E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption / J.E. Aubin, E. Bonnellye. // Medscape Womens Health. – 2000. – Vol. 5, № 2. – P. 5.
81. Baljit S.M. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro / S.M. Baljit, W.D. David // Journal of Bone and Mineral Research. – 1995. – Vol. 10, № 3. – P. 453–457.
82. Basal metabolic rate and thyroid hormones of late-middle-aged and older human subjects / N. Meunier, J. Beattie, D. Ciarpica [et al.] // Eur. J. of Clinical Nutrition. – 2005. – Vol. 59, Suppl. 1-2. – P. 53–57.
83. Baylor K. Peripheral nerve at extreme low temperatures: pharmacologic modulation of temperature effects / K. Baylor, M.M. Stacker // Cryobiology. – 2009. – Vol. 59. – № 1. – P. 12–21.

84. Bone biology. Part II: Formation, modeling, remodeling, and regulation of cell function / J.A. Buckwalter, M.J. Glimcher, R.R. Cooper, R. Recker // JBJS. – 1995. – Vol. 77-A, № 8. – P. 1276–1289.
85. Bonewald L.F. The Amszing osteocyte / L.F. Bonewald // J. Bone Mineral Res. – 2011. – Vol. 26, №2. – P. 229–238.
86. Boning up on Wolff's Law: Mechanical regulation of the cells that make and maintain bone / Chen Jan-Hung, Chao Liu, Lidan You, C.A. Simmons // Journal of Biomechanics. – 2010. – Vol. 43. – P. 108–118.
87. Boutilier R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia / R.G. Boutilier // J. Exp. Biol. – 2001. – Vol. 204, Pt. 18. – P. 3171–3181.
88. Cardiovascular effects of epinephrine during rewarming from hypothermia in an intact animal model / T.V. Kondratiev, E.S. Myhre, O. Simonsen [et al.] // J. Appl. Physiol. – 2006. – Vol. 100. – P. 457–464.
89. Cellular responses to mechanical loading in vitro / A.J. El Haj, S.L. Minter, C.F. Rawlinson [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 1990. – № 5. – P. 923–932.
90. Cold injuries / W.B. Long, R.F. Edlich, K.L. Winters, L.D. Britt // J. Long Term Eff. Med Implants. – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 67–78.
91. Cold stress facilitates calcium mobilization from bone in an ovariectomized rat model of osteoporosis / N. Islam, S. Chanda, T.K. Ghosh, C. Mitra // Jpn J Physiol. – 1998. – Vol. 48, № 1. – P. 49–55.
92. Collins K.J. Urban hypothermia: preferred temperature and thermal perception in old age / K.J. Collins, A.N. Exton-Smith, C. Dore // Br Med J. – 1989. – Vol. 282. – P.175–177.
93. Compton A.H. Quantum theory of the scattering of X-rays by light elements / A.H. Compton // Phys. Rev. – 1923. – Vol. 21. – P. 483–502.
94. Danilchenko S.N. Some features of thermo-activated structural transformation of biogenic and synthetic Mg-containing apatite with β -tricalcium-magnesium phosphate formation / S.N. Danilchenko, I.Y. Protsenko, L.F. Sukhodub // Cryst. Res. Tech-nol. – 2009. – Vol. 44, № 5. – P. 553–560

95. Danzl D.F. Accidental hypothermia / D.F. Danzl, R.S. Pozos // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – Vol. 331. – P. 1756–1760.
96. Dempster D.W. Bone remodeling / D. Dempster // *Disorders of bone and mineral metabolism.* – New York: Raven Press, 1992. – P. 355–380.
97. Early strain related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo / T.M. Skerry, L. Bitensky, J. Chaayen [et al.] // *Calcif. Tissue Int.* – 1990. – Vol. 45. – P. 34–40.
98. Effect of induced and spontaneous hypothermia on survival time of uncontrolled hemorrhagic shock rat model / K.-R. Lee, S.-P. Chung, I.-C. Park, S.H. Kim // *Yonsei Medical Journal.* – 2002. – № 4. – P. 511–517.
99. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity and cytoskeletal structure of hepatocytes / P. Stefanovich, R.M. Ezzel, S.J. Sheehan [et al.] // *Cryobil.* – 1995. – Vol. 32. – P. 389–403.
100. Effects of pH management during deep hypothermic bypass on cerebral microcirculation: alpha-stat versus pH-stat / L.F. Duebener, I. Hagino, T. Sakamoto [et al.] // *Circulation.* – 2002. – Vol. 106. – P. 1103–1108.
101. Effects of zinc supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise / C. Seco, M. Revilla, E.R. Hernandez [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research.* – 1998. – Vol. 13, № 3. – P. 508–512.
102. Experimental hypothermia: effects of core cooling and rewarming on hemodynamics, coronary blood flow, and myocardial metabolism in dogs / T. Tveita, E. Mortensen, O. Hevroy [et al.] // *Anesth Analg.* – 1994. – Vol. 79. – P. 212–218.
103. Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechanism following major challenge / M. Frink, S. Flone, M. van Griensven [et al.] // *Mediators of inflammation.* – 2012.<http://dx.doi.org/10.1155/2012/762840>.
104. Faust G. Bone remodeling: a new approach / G. Faust // *University of Stuttgart.* – 2000. – P. 210.
105. Fiore C.E. The effect of muscle building exercise on forearm bone mineral content and osteoblast activity in drug-free and anaerobic steroids self-

administering young men / C.E. Fiore, E. Cottine, C. Fargetta // *Bone Miner.* – 1991. – Vol. 13. – P. 77–83.

106. Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease / H. Fleisch. – London: The Panthenon Publishing Group Inc., 1997. – 184 p.

107. Franz-Odenaal T.A. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes/ T.A. Franz-Odenaal, B.K. Hall, P.E. Witten // *Dev.Dyn.* – 2006. – Vol. 235, № 1. – P. 176–190.

108. Frost H.M. The Biology of Fracture Healing. An Overview for Clinicians. Part I / H.M. Frost // *Clin. Orthop. and Rel. Res.* – 1989. – Vol. 248. – P.283–293.

109. High resolution image in bone biology II. Review of the literature / J. Cano, J. Campo, J.J. Vaquero [et al.] // *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* – 2008. – Vol. 13, № 1. – P. 31–35.

110. Hofbauer L. Die role des RANK/ RANKL / OPG-Signalweg in Knochenstoffwechsel / L. Hofbauer, T. Racher // *Fortbildung Osteologie.* – 2010. – Vol.3, № 5. – P. 118–121.

111. Hansford R.G. Bioenergetics in aging / R.G. Hansford // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 26, № 1. – P. 41–80.

112. Huang C. Mechanotransduction in bone repair and regeneration / C. Huang, O. Rei // *FASEB J.* – 2010. – Vol. 24, № 10. – P. 3625–3632.

113. Human chaperonin 60 (Hsp60) stimulates bone resorption: structure/function relationships/ S. Meghji, M. Lillicrap, M. Maguire [et al.] // *Bone.* – 2001. – Vol. 33, Issue 3. – P. 419–425.

114. Hume D.A. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system / Hume D.A. // *Mucosal Immunology.* – 2008. – Vol. 1. – P. 432–441.

115. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling / D. Yang, S. Guo, T. Zhang, H. Li // *FEBS Letters.* – 2009. – Vol. 583, № 15. – P. 2500–2506.

116. Hypothermia inhibits osteoblast differentiation and bone formation but stimulates osteoclastogenesis / J.J. Patel, J.C. Utting, M.L. Key [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 2012. – Vol. 318, № 17. – P. 2237–2244.

117. Hypothermia stimulates osteoclastogenesis but inhibits osteoblast differentiation and bone formation / J. Patel, I. Orriss, M. Key [et al.] // *Done.* – 2009. – Vol. 44, № 2. – P. 305.

118. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption / T.R. Arnett, D.C. Gibbons, J.C. Utting [et al.] // *Journal of Cellular Physiology.* – 2003. – Vol. 196. – P. 2–8.

119. Influence of osteoporosis on fracture fixation – a systematic literature review / J. Goldhahn, N. Suhm, S. Goldhahn [et al.] // *Osteoporos Int.* – 2008. – Vol. 19, № 6. – P. 761–772.

120. Investigation the effects of hypothermic storage on chondrocyte survival apoptosis in human articular cartilage / S. Hunter, N. Schachar, S. Timmermann, K. Muldrew // *J.B.J.S.* – 2008. – Vol. 90-B. – № 1. – P. 104.

121. Iron deficiency negatively affects vertebrae and femurs of rats independently of energy intake and body weigh / D.M. Medeiros, B. Stoecker, A. Plattner [et al.] // *J. Nutr.* – 2004. – Vol. 134. – P. 3061–3067.

122. Islam M.N. Effects of different intensities of cold stress on certain physiological phenomena related to skeletal health in a hypogonadal rat model / M.N. Islam, S. Chanda, C. Mitra // *J of Physiology and Pharmacology.* – 2000. – Vol. 51, № 4. – P. 857–870.

123. Jakob F. Pathophysiology of bone methabolism / F. Jakob, L. Seefried, R. Ebert // *Internist.* – 2008. – Vol. 49, № 10. – P. 1159–1169.

124. Kaufmann S.H. Programmed cell death: alive and well in the new millennium / S.H. Kaufmann, M. Hengartner // *Trends Cell Biol.* – 2001. – Vol. 11. – P. 526–534.

125. Lewinson D. Differential of hypothyroidism on the cartilage and the osteogenic process in the mandibular condyle: recovery by growth hormone and

thyroxine / D. Lewinson, G.M. Bialik, Z. Hochberg // *Endocrinology*. – 1994. – Vol. 135. – P. 1504–1510.

126. Li P. Mitochondrial activation of apoptosis / P. Li, D. Nijhawan, X. Wang // *Cell*. – 2004. – Vol. 116, № 2. – P. 57 – 59.

127. Mallet M.L. Pathophysiology of accidental hypothermia / M.L. Mallet // *QJM*. – 2002. – Vol. 95, № 12. – P. 775–785.

128. Martiniakova M. Histological analysis of compact bone tissue in adult laboratory rats / M. Martiniakova, R. Omelka, B. Grosskopf // *Slovak J. Anim.Sci.* – 2009. – Vol. 42. – P. 56–59.

129. Marx J. Rosen's emergency: concepts and clinical practice / J. Marx. – Mosby/Elsevier, 2006. – P. 2239.

130. Mechanical loading biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone / P. Noble, B. Stevens [et al.] // *American J. physiology – cell physiology*. – 2003. – Vol. 2849, № 4. – P. 934–943.

131. Meghji S. Osteoblasts respond to mild-heat stress by change in OPG/RANKI ratio / S. Meghji, A. Maddi, G. Vinayahah // *Amer. Soc. Bone Mineral Res.* – 2006. – Vol. 3, № 3. – P. 1155–1158.

132. Moderate hypothermia induces growth arrest in normal human osteoblast cells but retained mitochondrial metabolism in vitro / M.D. Aisha, M.N. Nor-Ashikin, R. Sharanisa [et al.] // *Bone*. – 2013. – № 1. – P. 192.

133. Motyl K.J. Temperatures rising: brown fat and bone / K.J. Motyl, C.J. Rosen // *Discov. Med.* – 2011. – Vol. 11, № 58. – P. 179–185.

134. Newby A.C. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability / A.C. Newby // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P. 2108–2114.

135. Normal human osteoblast cells exerts an adaptive effect towards moderate hypothermia by retaining bone metabolism and cellular function in vitro / M.D. Aisha, M.N. Nor-Ashikin, R. Sharanisa [et al.] // *Bone*. – 2013. – № 1. – P. 193.

136. Osteopontin is strongly expressed by alveolar macrophages in the lungs of acute respiratory distress syndrome / F. Takahashi, K. Takahashi, K. Shimizu [et al.] // *Lung*. – 2004. – Vol. 182. – P. 173–185.

137. Profound hypothermia decreases cardiac apoptosis through AKT survival pathway / F. Shuja, M. Tabbara, Y. Li [et al.] // *J of the American College of Surgeons*. – 2009. – Vol. 209, № 1. – P. 89–99.

138. Raggatt L.J. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling / L.J. Raggatt, N.C. Partridge // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 25103 – 25108.

139. Raisz L.G. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis / L.G. Raisz // *N Engl J Med.* – 1988. – Vol. 318, № 13. – P. 818–828.

140. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis / P. Collin-Osdoby, L. Rothe [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 23. – P. 20659–20672.

141. Regional mild hypothermia in the protection of the ischemic brain / M.N Prandini, S.N. Lacanna, P.R. Valente, J.N. Stavale // *Acta Cir. Bras.* – 2002. – Vol. 17, № 4. – P. 123–127.

142. Regulation of plasma osteocalcin by corticosterone and norepinephrine during restraint stress / P. Patterson–Buckendahl, R. Kvetnansky, K. Fukuhara [et al.] // *Bone*. – 1995. – Vol. 17, № 5. – P. 467–472.

143. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // *J. Cell Biol.* – 1963. – Vol. 17. – P. 208–212.

144. Riesenfeld A. Compact bone changes in cold-exposed rats / A. Riesenfeld // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 2005. – Vol. 4. – P. 111–112.

145. Role of simple cold storage in preventing growth plate impairment after replantation surgery in immature rats / T. Sunagawa, O. Ishida, Y. Ikuta [et al.] // *J. Reconstr. Microsurg.* – 2005. – Vol. 21, № 7 – P. 483–489.

146. Selective hypothermic perfusion of canine brain / T. Ohta, T. Kuroiwa, I. Sakaguchi [et al.] // *Neurosurgery*. – 1996. – Vol. 38. – P. 1211–1215.

147. Sieber R. Akzidentelle hypothermie / R. Sieber // Schweiz Med Forum. – 2006. – Vol. 6. – P. 939–944.
148. Steinberg B. The effect of cold-stress, hibernation, and prolonged inactivity on bone dynamics in the golden hamster, *Mesocricetus auratus* / B. Steinberg, I.J. Singh, O.G. Mitchell // J. of Morphol. – 2005. – Vol. 167, № 1. – P. 43–51.
149. Stress-concentrating effect of resorption lacunae in trabecular bone / L.M. McNamara, J.C. Van der Linden, H. Weinans, P.J. Prendergast // J. Biomech. – 2006. – Vol. 39, № 4. – P. 734–741.
150. TGF-B1 induces migration of bone mesenchymal stem cells to couple bone resorption and formation / Y. Tang, X. Wu, W. Lei [et al.] // Nature Medicine. – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 757–765.
151. The effect of cerebral hypothermia on white and grey matter injury induced by severe hypoxia in preterm fetal sheep / L. Bennet, V. Roelfsema, S. George [et al.] // J. Physiol. – 2007. – Vol. 578, Pt. 2. – P. 491–506.
152. The effects of cold upon bone growth: a preliminary study / B. Bierens de Haan, M.R. Wexler, S. Porat [et al.] // Ann. Plast. Surg. – 1996. – Vol. 16, № 6. – P. 509–515.
153. The effects of hypothermic storage on chondrocyte survival and apoptosis in human articular cartilage / S. Hunter, S. Timmermann, N. Schachar, K. Muldrew // Cell preservation technology. – 2006. – Vol. 4, № 2. – P. 82–87.
154. Tuli J.S. Hypothermia in animals / J.S. Tuli, R.C. Gilbert. – [Электронный ресурс]. – Точка доступа: <http://www.hypothermia.org/animalhypo.htm>.
155. Vega D. Clinical review: the role of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK / RANKL ligand / osteoprotegerin: clinical implications / D. Vega, N.M. Maalouf, K. Sakhaee // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2007. – Vol. 92, № 12. – P. 4514–4521.
156. Wolff J. The Law of Bone Remodeling / J. Wolff. – Berlin Heidelberg New York: Springer, 1986.

157. Wong K.C. Physiology and pharmacology of hypothermia / K.C. Wong // West J Med. – 1983. – Vol. 138. – P. 227–232.

158. Yamazaki T. Effect of hypothermia on the merocyanine 540-mediated purging of hematopoietic cells / T. Yamazaki, F. Sieber // J. Hematother. – 1997. – Vol. 6, № 1. – P. 31–39.

159. Ziros P.G. RUNX2: of bone and stretch / P.G. Ziros, E.K. Basdra, A.G. Papavassilion // Int. J. Biochem. and Cell. Biol. – 2008. – Vol. 40, № 9. – P. 1659–1663.