

**Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

МАЛЬЦЕВА ВАЛЕНТИНА ЄВГЕНІВНА

УДК 576.7:57.044:616.711.6:57.084.1:546.815/.819

**ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБУДОВИ ХРЕБТОВОГО РУХОВОГО
СЕГМЕНТУ ПОПЕРЕКОВОГО ВІДДІЛУ ХРЕБТА ЩУРІВ ПІСЛЯ ДІЇ
СВИНЦЮ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Державній установі «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України».

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Дєдх Нінель Василівна,
Державна установа «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»,
провідний науковий співробітник відділу клінічної фізіології і патології опорно-рухового апарату

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Рибальченко Володимир Корнійович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України,
провідний науковий співробітник науково-дослідного сектору «Мембранології і цитології»

кандидат біологічних наук
Скрипченко Олена Володимирівна,
Інститут зоології імені І.І. Шмальгаузена
НАН України, науковий співробітник лабораторії біології розвитку

Захист відбудеться «24» жовтня 2018 року о 14-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект академіка Глушкова, 2, Навчально-науковий центр (ННЦ) «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.38.

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58, зал № 12.

Автореферат розісланий «___» _____ 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38,
доктор біологічних наук



К.О. Дворщенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На сьогоднішній день більш, ніж 85% людей у всьому світі страждають від болю в спині (Smith L. et al., 2011), причиною яких можуть бути дегенеративні захворювання хребта (Clarence F. et al, 2015; Izzo R. et al., 2016), остеопороз та його ускладнення (Поворознюк В.В. та ін., 2015). Основними складовими частинами хребтового рухового сегменту, що можуть бути задіяними у процесах виникнення болю є дегенерація міжхребцевого диску, деформації тіл хребців та артроз дуговідросткових суглобів. До цього часу дискутуються фактори, які викликають біль у спині, серед яких значення приділяють не тільки ендогенним, але й екзогенним факторам, одним з яких може бути вплив свинцю.

Кісткова тканина тіл хребців є своєрідним депо з накопичення свинцю, яка постійно в умовах фізіологічного ремоделювання, а особливо у разі підвищеного ремоделювання з віком у разі остеопорозу, стає джерелом надходження свинцю у кров, навіть за відсутності безпосереднього впливу з навколишнього середовища. Згідно з експериментальними (Escribano A. et al., 1997, Olchowik G. et al., 2014) та клінічними дослідженнями (Nash D. et al., 2003; Campbell J.R., 2007) існує взаємозв'язок між наявністю свинцю в кістковій тканині та розвитком остеопенії чи остеопорозу. Відомо, що свинець вбудовується в кристалічну решітку гідроксилапатиту аналогічно кальцію (Khalil N. et al., 2008), що призводить до зменшення розмірів кристалів гідроксил апатиту та впливає на процес формування зрілих колагенових волокон (Monir A. et al., 2010). У експериментальних дослідженнях частково розкрита роль свинцю в будові кісткової тканини. А саме, виявлено, що в результаті дії свинцю в концентраціях, що відповідає дії навколишнього середовища, в довгих кістках щурів та мишей відбувається зниження об'єму губчастої кістки і мінеральної щільності кісткової тканини (Carmouche J.J. et al., 2006; Monir A. et al., 2010), зменшуються темпи росту довгих кісток (Ronis M.J., 2001), знижується міцність кісткової тканини (Beier E.E. et al., 2013). У дослідженнях *in vitro* вивчено вплив низьких концентрацій свинцю на остеобласто- й остеокластогенез у щурів і мишей, однак не з'ясовані механізми його дії (Ma Y. et al., 2012; Beier E.E. et al., 2016). Крім того, вплив свинцю на структурно-метаболічні особливості диференційованих остеобластів, остеокластів та остеоцитів в умовах *in vivo* майже не вивчено. У клінічних дослідженнях було доведено пригнічення росту у дітей різного віку з рівнем свинцю в крові в межах верхньої межі норми (Yang H. et al. 2012; Fleisch A.F. et al., 2013).

Існують різні експериментальні дослідження впливу свинцю на хрящову тканину, в основному на гіаліновий хрящ, зокрема на епіфізарний (Hicks D. G. et al., 1996; Zuscik M. J. et al., 2002; Olchowik G. et al 2014), що пов'язано з вивченням дії цього елемента на процес росту кісток. Досліджень, присвячених вивченню впливу свинцю на волокнистий хрящ недостатньо. Останнім часом з'явилися дослідження, в яких розглядають наявність взаємозв'язку рівня свинцю в крові із розвитком артрозу, а також припускають, що свинець може

відігравати роль в патогенезі цього захворювання (Jordan J.M. et al., 2007; Meirer F. et al., 2011; Brodziak-Dopierała B. et al., 2011; Nelson A.E. et al., 2011; Roschger A. et al., 2013).

Незважаючи на велику кількість експериментальних та клінічних досліджень, механізм та морфологічні зміни негативного впливу свинцю на кісткову та хрящову тканини так і залишаються до кінця незрозумілими. Малочисельні дані щодо впливу свинцю на хребтовий руховий сегмент, а саме – міжхребцевий диск та дуговідросткові суглоби, кісткову тканину тіл хребців в нормі та у разі остеопорозу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної теми ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» «Вивчити ремоделювання кісткової тканини тіл хребців та структурну організацію міжхребцевих дисків в умовах остеопорозу, обтяженого дією несприятливих екологічних чинників» (№ д/р 0114U003015, 2014-2016 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було визначення особливостей перебудови тіл хребців, міжхребцевих дисків та дуговідросткових суглобів поперекового відділу хребта щурів різного віку після дії свинцю на основі остеометричного, гістологічного, гістохімічного, електронномікроскопічного та спектрометричного аналізів.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Дослідити особливості росту хребта щурів різного віку з урахуванням динаміки показників росту, маси тіла та остеометричних параметрів тіл хребців після впливу свинцю.
2. Проаналізувати морфологічні та ультраструктурні особливості складових хребтового рухового сегменту щурів після впливу свинцю.
3. Визначити структурні особливості матриксу кісткової тканини тіл хребців та хрящової міжхребцевих дисків щурів після дії свинцю.
4. Дослідити накопичення свинцю в тілах хребців і міжхребцевих дисках та мінеральну щільність кісткової тканини щурів різного віку після моделювання дії свинцю.

Об'єкт дослідження – перебудова тканин хребтового рухового сегмента у щурів різного віку в умовах впливу свинцю.

Предмет дослідження – складові компоненти хребтового рухового сегменту (тіла хребців, міжхребцеві диски та дуговідросткові суглоби) поперекового відділу хребта.

Методи дослідження: соматометричні, остеометричні, гістологічні, поляризаційно-оптичні, морфометричні, електронномікроскопічні, флуоресцентна спектрометрія, рентгенівська денситометрія, математичні методи статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше на моделі низькорівневого впливу свинцю встановлено структурно-функціональні зміни в складових хребтового рухового сегмента поперекового відділу хребта молодих щурів і щурів з остеопорозом як на тканинному, так і на клітинному рівнях. У молодих тварин показано вищу чутливість до дії свинцю кісткової тканини тіл

хребців і компонентів міжхребцевого диска, а у щурів зрілого віку з остеопорозом – суглобового хряща дуговідросткових суглобів. У щурів обох груп у тілах хребців відмічено зниження площі губчастої кісткової тканини (в 1,8; 1,5 раза), а в компактній кістковій тканині виявлено рарефікацію. У молодих щурів встановлено зниження мінеральної щільності кісткової тканини на рівні поперекового відділу хребта на 14,4%.

Уперше виявлено, що низькорівневий вплив свинцю призводить до порушення структури матриксу міжхребцевого диска, у молодих тварин – до зниження його висоти (на 10-12,2%) і щільності клітин у ньому, у щурів з остеопорозом – до вдвічі меншого зниження висоти (на 6,2%). Встановлено, що в матриксі волокнистого кільця міжхребцевого диска та губчастої кісткової тканини тіл хребців під дією свинцю відбувається перерозподіл вмісту колагенів у структурі колагенових волокон, пов'язаний зі збільшенням вмісту колагену III типу та зменшенням колагену I типу, з більшим проявом у молодих тварин. Доведено, що під впливом свинцю у дуговідросткових суглобах щурів розвиваються дегенеративні зміни, більше виражені у щурів зрілого віку на фоні остеопорозу.

Уперше доведено, що після низькорівневого впливу свинцю підвищується його рівень у кістковій тканині тіл хребців у молодих щурів у 5,2 раза більше, ніж у зрілих на фоні остеопорозу, а значне збільшення рівня свинцю в міжхребцевому диску зафіксовано лише в молодих щурів.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведеного експериментального дослідження по вивченню впливу свинцю на хребтовий руховий сегмент у щурів різного віку можуть бути використані у курсі лекцій для фахівців, які вивчають кісткову та хрящову тканини. Отримані дані по впливу свинцю на щурів можуть бути теоретичним підґрунтям для уточнення розрахунків доз свинцю у розробці певних нормативних документів щодо шкідливої дії цього елемента на організм людини. Результати досліджень впроваджено у педагогічну та науково-дослідну роботу Харківської медичної академії післядипломної освіти (МОЗ України) та Сумського державного університету (МОН України).

Особистий внесок здобувача. Вибір теми, постановка мети та завдання дослідження, а також планування дослідження виконувалося сумісно з науковим керівником. Здобувачем було самостійно проведено аналіз наукової літератури та складання науково-патентного звіту, проведено всі експериментальні дослідження, особисто виконано обробку та аналіз експериментального матеріалу з використанням усіх вище зазначених методів, проведено статистичний аналіз та узагальнення отриманих результатів дослідження.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Кістково-м'язева система та вік» (м. Яремче, 2012); «Захворювання кістково-м'язевої системи та вік» (м. Київ, 2011, 2013); на конференції молодих вчених, присвяченій 20-річчю Академії медичних наук (м. Київ, 2013); на науково-практичній конференції «Морфогенез органів і

тканин під впливом екзогенних факторів» (м. Алушта, 2013); «Вікові аспекти захворювання кістково-м'язової системи» (м. Харків, 2014); «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології» (м. Харків, 2011, 2014); «Захворювання кістково-м'язової системи та вік» (м. Яремче, 2015); «Морфологічні дослідження – виклики сучасності» (м. Суми, 2015); «Актуальні проблеми ортопедії та травматології» (для молодих вчених) (с. Сновянка, Чернігівська область, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, із них 6 у фахових виданнях, серед яких 1 включена до міжнародної наукометричної бази даних Web of Science, 2 роботи в наукових журналах, 6 праць у матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій, конгресів та симпозіумів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, чотирьох розділів результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних літературних джерел, який складається з 210 найменувань. Дисертація викладена на 217 сторінках і проілюстрована 103 рисунками та 29 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Експериментальне дослідження по моделюванню впливу свинцю на щурів різного віку було виконано на 80 білих лабораторних щурах. Тварини були розподілені на 2 серії. У експерименті моделювали вплив свинцю на щурів у період активного росту у молодому віці (серія 1) та у зрілому віці після досягнення піку кісткової маси на фоні остеопорозу (серія 2).

Серія 1. На самцях вивчали дію свинцю на хребет в період активного росту. Для цього тварин віком 1,5 міс. розділили на дві групи – дослідну та контрольну. Щури дослідної групи терміном 10 тижнів отримували розчин ацетату свинцю (230 мг свинцю на 1 л дистильованої води) у якості питної води, а контрольної – дистильовану воду (Carmouche J.J. et al., 2005). В умовах використаної експериментальної моделі кожна тварина отримувала близько 9 мл розчину ацетату свинцю зазначеної концентрації на добу. Застосована експериментальна модель широко використовується у дослідженнях низькорівневого впливу свинцю (Jamieson J. A. et al., 2006; Payal B. et al., 2009; Monir A. et al., 2010). Використання в експерименті саме самців було обумовлено даними інших досліджень, згідно з якими самці є більш чутливими до дії свинцю (Ronis M.J. et al., 2001). На момент виведення з експерименту вік тварин складав 4 місяці.

Серія 2. У самиць (віком 6 міс.) моделювали остеопороз шляхом проведення оваріектомії (Lelovas P.P. et al., 2008). Для цього виконували премедикацію та вводили тварин у стан наркозу. Обробляли операційне поле (нижньої третини живота) розчином антисептику та виконували поперечний пошаровий розріз передньої черевної стінки глибиною до 1,5 см. Виділяли

пінцетом рога матки та яєчники, перев'язували їх шовної ниткою та відсікали останні, після чого пошарово ушивали розріз (Поворознюк В.В. и др., 2012).

Через 4 міс. після проведення оваріоектомії тварин розділили на 2 групи. Щури дослідної групи отримували розчин ацетату свинцю 10 тижнів, аналогічно експерименту у серії 1, а контрольні тварини – дистильовану воду. Після закінчення експерименту щури у віці 12,5 міс. були виведені з експерименту. В обох серіях тварин це виконували шляхом декапітації під ефірним наркозом. Для подальшого аналізу були виділені фрагменти поперекового відділу хребта LI-LIV.

Виконання експериментального дослідження затверджено комітетом з біоетики ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМНУ» (протоколи № 127 від 24.02.2014 р., 159 від 19.12.2016 р.) та проведено згідно з Європейськими законодавчими нормами та законом України.

З метою дослідження впливу свинцю на динаміку показників маси тіла з першого дня до закінчення експериментального дослідження по впливу свинцю проводили зважування щотижня. Крім того, у молодих щурів щотижня виконували вимірювання довжини тіла за допомогою металевої лінійки (ГОСТ 427-756) (від кінчика носа до проекції анального отвору). Проведення вимірювання довжини тіла тільки у групі молодих тварин було обумовлене даними, які свідчать про активний ріст у цьому віці, та пригніченням росту у щурів у віці після 10 міс, тобто вік у якому були щури зрілого віку з модельованим остеопорозом на початок проведення експерименту по впливу свинцю.

Для вивчення впливу свинцю на темпи росту хребта щурів була виконана остеометрія тіл хребців, яку проводили за допомогою штангенциркуля (ШЦ-1-125-0,1 ГОСТ 166-89). Вимірювали наступні параметри (Алексеев, В.П., 1966): висоту тіла хребця – відстань між серединними точками верхньої і нижньої поверхонь тіл хребців; краніальну ширину – відстань між найбільш віддаленими одна від одної крапками на бічних краях краніальної поверхні тіл хребців; краніальний сагітальний діаметр – відстань між точками перетину медіально-сагітальної площини з переднім і заднім краями краніальної поверхні тіл хребців; каудальну ширину – відстань між найбільш віддаленими одна від одної крапками на бічних краях каудальної поверхні тіл хребців; каудальний сагітальний діаметр – відстань між точками перетину медіально-сагітальної площини з переднім і заднім краями каудальної поверхні тіл хребців.

Для визначення вмісту свинцю у тілах хребців та міжхребцевих дисках після проведення експериментального дослідження по впливу цього елементу на щурів було виконано рентгенівську флуоресцентну спектрометрію зразків тіл хребців та міжхребцевих дисків на енерго-дисперсійному спектрометрі «Спрут»-К з SDD детектором X-123 (Amptek, США) на базі Національного технічного університету «Харківський політехнічний університет» (МОН України).

З метою вивчення впливу свинцю на мінеральну щільність тіл хребців у поперековому відділі хребта після закінчення моделювання впливу свинцю

була проведена кісткова денситометрія фрагмента поперекового відділу LI-LIV з використанням двоенергетичного рентгенівського денситометра QDR4500 Explorer (Hologic) в режимі поперекового відділу хребта.

Фрагменти поперекового відділу хребта після виділення фіксували у 10% нейтральному формаліні, після чого проводили декальцинацію у 10% розчині мурашиної кислоти. Фрагменти хребта після декальцинації промивали проточною водою, зневоднювали у серії спиртів зростаючої концентрації та хлороформі, потім просочували парафіном (Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996). Гістологічні зрізи (6-10 мкм) виготовляли на санному мікротомі "Reichert", фарбували гематоксиліном Вейгерта та еозином, а також пікрофуксином за Ван-Гізоном, толуїдиновим синім та наносили полістерол. Дослідження гістологічних зрізів проводили з використанням світлового мікроскопу Olympus BX-63 (Japan).

Проведено морфометричний аналіз таких показників тіл хребців: висота епіфізарного хрящу (мкм); площа губчастої кісткової тканини (%); середня ширина кісткових трабекул (мкм); середня ширина міжтрабекулярних просторів (мкм); щільність остеоцитів у губчастій та компактній кістковій тканині (мм^2); відносна кількість розширених лакун у компактній та губчастій кістковій тканині (%); відносна довжина поверхні резорбції (%); ширина остеїду (мкм); відносна площа хрящових ділянок у кісткових трабекулах (%) у первинній спонгіозі.

Проведено морфометричний аналіз наступних параметрів міжхребцевого диску та дуговідросткового суглоба, а саме: висота міжхребцевого диску у крайових відділах (середні значення) та у центральній частині (мкм); ширина пластинок колагенових волокон волокнистого кільця міжхребцевого диску (мкм); щільність фіброхондроцитів у волокнистому кільці (мм^2); щільність нотохордальних клітин у драглистому ядрі (мм^2); висота суглобового хряща (мкм); відносна довжина поверхні суглобового хряща з ерозією (%).

Вимірювання проводили на мікрофотографіях, зроблених з 3 зрізів у 4 полях зору при збільшенні 100, 200, 400 і використанні програми ImageJ та cellSens (Olympus BX-63).

Для ультраструктурного дослідження виділяли фрагменти міжхребцевого диску та дуговідросткових суглобів, які розрізали на шматочки розміром $\approx 1 \text{ мм}^3$ і обробляли за стандартним методом електронної мікроскопії відповідно до рекомендацій Б. Уїклі (1975): префіксація в 5% фіксаторі Карновського, декальцинація (для мінералізованих тканин) в 3,7% розчині трилону Б, додаткова фіксація в 1% розчині чотириокису осмію (OsO_4), зневоднення в розчинах етилового спирту зростаючої міцності (від 50° до 96°) і в ацетоні, просочення у суміші епоксидних смол епона та аралдіта. Напівтонкі (1-2 мкм) та ультратонкі зрізи (0,05-0,09 мкм) виготовляли за допомогою скляних ножів на ультрамікротомі УМПТ-3М. Диференційне фарбування напівтонких зрізів проводили 1% розчином метиленового синього та 1% розчином основного фуксину за S. R. Aparicio (1969). Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю і уранілацетатом за методом R. Reynolds

(1963). Ультраструктурний аналіз проводили з використанням трансмісійного електронного мікроскопу ЕМВ-100БР (Суми, Україна).

З метою оцінки стану колагенів у матриксу кісткової тканини тіл хребців та хрящової тканини міжхребцевих дисків гістологічні зрізи фарбували 0,1% розчином пікросиріуса червоного (F3BA) (Lattouf R. et al., 2014). Відомо, що в кістковій тканині та волокнистому хрящі колаген I типу формує товсті волокна та набуває червоної рефракції у поляризованому світлі, колаген II типу має рефракцію жовтого кольору, а колаген III типу – зелену рефракцію. Враховуючи це, у поляризованому світлі підраховували частку (%) кожного з типів колагену у 3 полях зору поляризаційного мікроскопа Olympus BX51 при збільшенні 200 на 3 зрізах з використанням методики L. Rich та P. Whittaker (2005).

Для оцінки вмісту глікозаміногліканів у матриксі міжхребцевого диску гістологічні зрізи фарбували толуїдиновим синім виготовленому на оцтовому буфері (рН = 4), стабілізували осаджуючим розчином, що складався з 2% розчину калію йодиду та 2% розчину червоної кров'яної солі, після чого зрізи заключали у гуміарабік, а після його висихання у канадський бальзам (Modis L., 1991). Ця методика з вказаним рівнем рН дозволяє виявити тільки сульфатовані глікозаміноглікани, які переважають у компонентному складі диску. Аналізували зрізи з використанням мікроскопа Olympus BX-53 у світлому полі та поляризованому світлі.

Аналіз даних був виконаний з використанням програм «IBM SPSS Statistics 20». Для перевірки нормальності розподілу в групах використовували тест Колмогорова-Смирнова, а рівності групових дисперсій – тест Левіна. По кожній з ознак в досліджуваних групах визначали середню арифметичну величини (M) і помилку середнього (m). При порівнянні середніх значень і виявлення впливу певних факторів при нормальному розподілі і у випадку рівності групових дисперсій у двох незалежних вибірках використовували t-критерій Стюдента. У всіх видах статистичного аналізу розраховувався досягнутий рівень значимості (P), при цьому критичний рівень значимості у даному дослідженні приймався рівним 0,05 (Бююль А., 2005).

Результати досліджень та їх обговорення

Особливості впливу свинцю на ріст хребта щурів різного віку з урахуванням динаміки показників росту, маси тіла та остеометричних параметрів тіл хребців. Виявлено, що вплив свинцю викликає втрату маси тіла, як у молодих, так і у щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом. Однак молоді щури є більш чутливими до дії свинцю, про що свідчить зафіксоване зниження маси тіла починаючи з 4 тижня, а у щурів з остеопорозом з 6 тижня, а також більш суттєве зниження цього показника (12,3 проти 3,5% відповідно). Крім того у молодих щурів встановлено пригнічення росту тіла у довжину з 2-го тижня впливу свинцю. Вивчення впливу свинцю на ріст хребта шляхом остеометричного вимірювання різних параметрів тіл хребців виявило аналогічну тенденцію. А саме, в тілах хребців молодих щурів було зафіксовано зменшення усіх вимірюваних параметрів, в той час як у зрілих щурів з

модельованим остеопорозом знизилася тільки висота тіл хребців LI, LII, LIII, однак менш суттєво порівняно з щурами іншого віку. Це підтверджує, що вплив свинцю викликає пригнічення росту хребта в період активного росту.

Особливості впливу свинцю на хребтовий руховий сегмент щурів на тканинному та клітинному рівнях. У результаті проведеного гістологічного аналізу з морфометрією встановлено зниження площі губчастої кісткової тканини у щурів обох серій під впливом свинцю, з більшим проявом у молодих щурів (рис. 1а). Крім того зафіксовано зниження висоти епіфізарного хряща у щурів обох серій та зниження відносної площі хрящових ділянок, що свідчить про пригнічення процесів формування кісткової тканини у тварин обох вікових груп (рис. 1б, в). Ці результати підтверджуються показниками ремоделювання кісткової тканини – шириною остеоїду та відносною довжиною поверхні, що мала ознаки резорбції. У щурів обох дослідних груп встановлено пригнічення формування кісткової тканини та посилення резорбції (рис. 2). Показник довжини поверхні резорбції у молодих щурів був вищим, ніж у щурів зрілого віку з остеопорозом, що можливо пояснює більшу втрату кісткової маси у молодому віці (рис. 2б). Однак показник формування кісткової тканини у щурів зрілого віку з остеопорозом був більш зниженим порівняно з молодими щурами (в 1,7 та 1,6 раза відповідно) (рис. 2а).

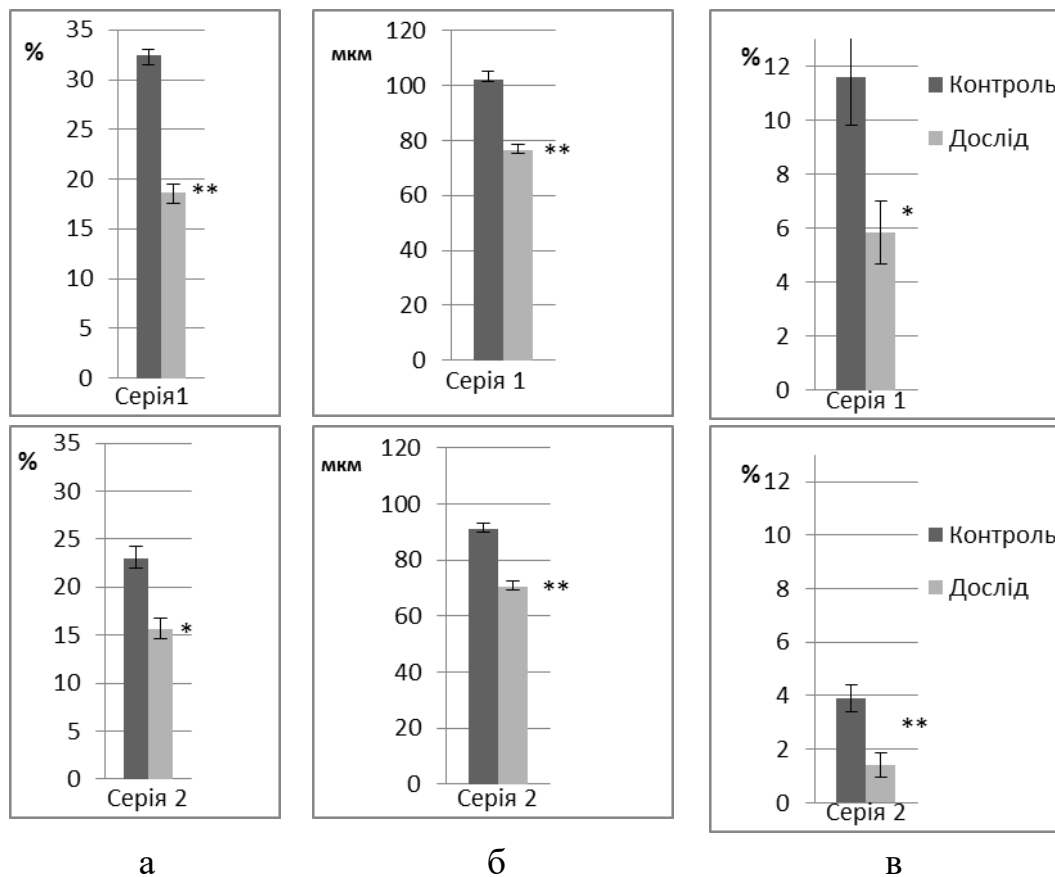


Рис. 1. Показники кісткової маси та росту тіл хребців щурів після дії свинцю: а) площа губчастої кісткової тканини (%), б) висота епіфізарного хряща (мкм), в) відносна площа хрящових ділянок (%). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Під час електронно-мікроскопічного аналізу в остеобластах молодих щурів після дії свинцю виявлено формування деструктивних порожнин, вакуолізацію цитоплазми, а у щурів з зрілого віку остеопорозом спостерігали руйнування клітинної мембрани, порушення структури гранулярної ендоплазматичної сітки та збільшення кількості вторинних лізосом у цитоплазмі. Це можливо свідчить про вікові особливості впливу свинцю на остеобласти з огляду на різні прояви деструктивних змін у клітинах.

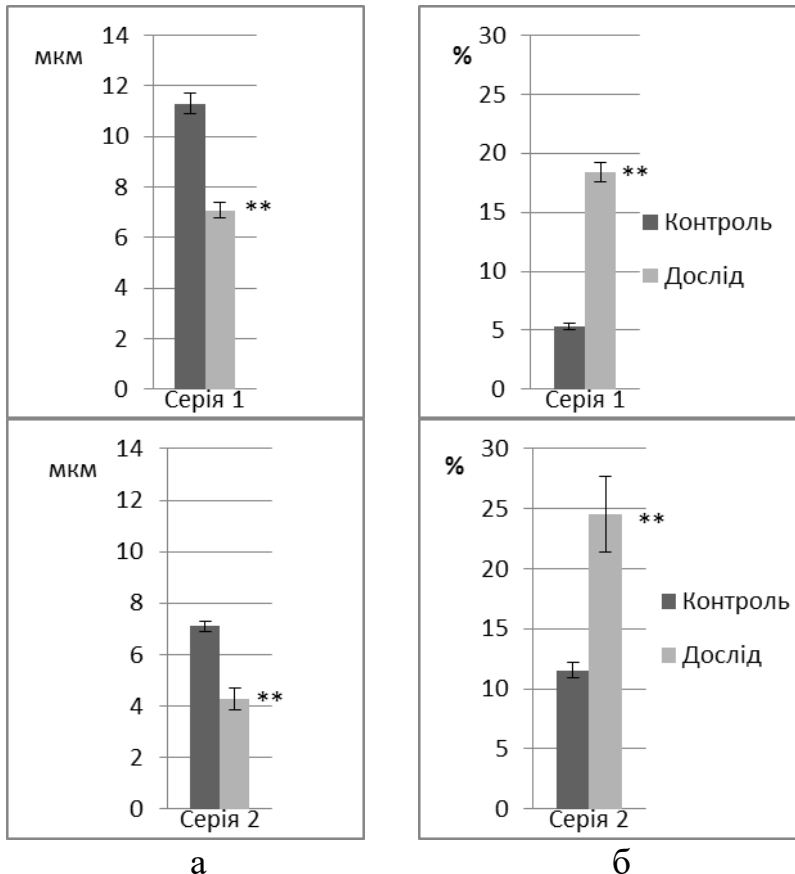
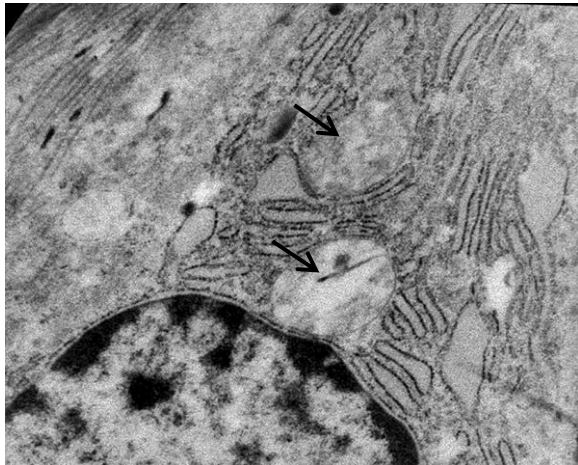


Рис. 2. Показники ремоделювання губчастої кісткової тканини тіл хребців щурів після дії свинцю: а) ширина остеїду (мкм), б) відносна довжина поверхні резорбції (%). ** – $p < 0,01$.

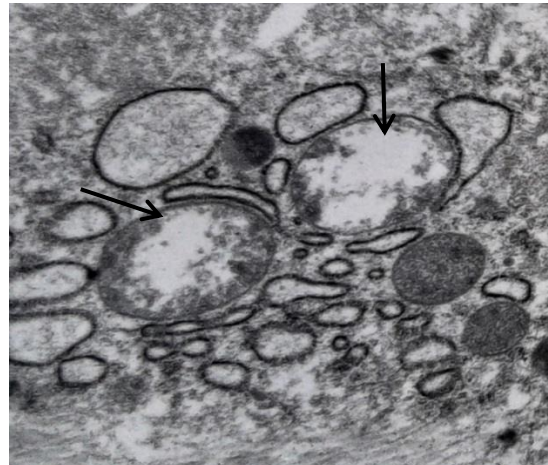
В обох серіях після дії свинцю спостерігали остеобласти з вираженим набряком мітохондрій та зруйнованою структурою крист, що можна пояснити тим, що ці органоїди найпершими реагують на патологічні зміни у клітині у випадку інтоксикації (Meyer J.N. et al, 2013) (рис. 3).

В остеокластах молодих щурів було зафіксовано наявність включень у мітохондріях, що з огляду на можливість накопичення свинцю у цих органелах, може порушувати синтез АТФ та посилювати резорбційну активність остеокластів (Miyazaki T. et al., 2012). У щурів зрілого віку з остеопорозом структурних змін в остеокластах після дії свинцю не було виявлено. Однак підвищення загиблих остеоцитів зафіксоване в обох групах може бути причиною посилення резорбції (Szczęsny G. et al., 2015). Остеоцити щурів обох дослідних груп мали схожі деструктивні зміни: спостерігали вакуолізацію цитоплазми, редукцію мембранних органел та переважання у клітинах компонентів цитоскелету. Схожою рисою впливу свинцю було посилення остеоцитарного остеолізису в обох групах. Так встановлено підвищення

кількості розширених лакун у губчастій кістковій та компактній кістковій тканинах у молодих щурів, а у щурів зрілого віку з остеопорозом – тільки у губчастій. У щурів зрілого віку з остеопорозом виражене зниження щільності остеоцитів зафіксовано у компактній кістковій тканині, ніж у губчастій, а у молодих щурів ці показники практично не відрізнялися. Можливо це пов'язано з накопиченням свинцю в організмі максимально в компактній кістковій тканині, а з віком його концентрація в ній суттєво зростає (Miculescu F. et al., 2011).



а



б

Рис. 3. Мікрофотографії електронограм. Набряк мітохондрій та порушення структури крист у остеобластах молодих щурів (а) та щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом (б). Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення: а) 15000; б) 24200.

У міжхребцевому диску щурів обох груп спостерігали дегенеративні зміни після впливу свинцю. Так, як у молодих, так і у щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом було виявлено зниження висоти у крайових відділах міжхребцевого диска, що вірогідно пов'язано з тріщинами та розволокненням колагенових пластинок у волокнистому кільці (рис. 4а). У молодих щурів також було встановлено вірогідне зниження висоти у центральній частині міжхребцевого диска, ширини пластинок волокнистого кільця, а також зниження щільності клітин у волокнистому кільці та драглистому ядрі (рис. 4б).

У волокнистому кільці тварин обох груп у хондроцитах також спостерігали схожі дегенеративні зміни, але з більшим проявом у молодих щурів. Так, у щурів зрілого віку з остеопорозом відзначали переважно деградацію органел з переважанням в цитоплазмі мікротрубочок та мікрофіламентів, тоді як у молодих – формування великих деструктивних порожнин та вакуолізацію цитоплазми (рис. 5а).

Крім того, у щурів зрілого віку з остеопорозом спостерігалось формування великих залишкових тілець, що є результатом аутофагії, яка є адаптаційною реакцією на дію негативних факторів та попереджує загибель клітини (Jiang L. et al., 2014; Gruber H. E. et al., 2015). Цим можливо пояснюється

відсутність достовірного зниження щільності клітин у цій частині диску тварин з остеопорозом.

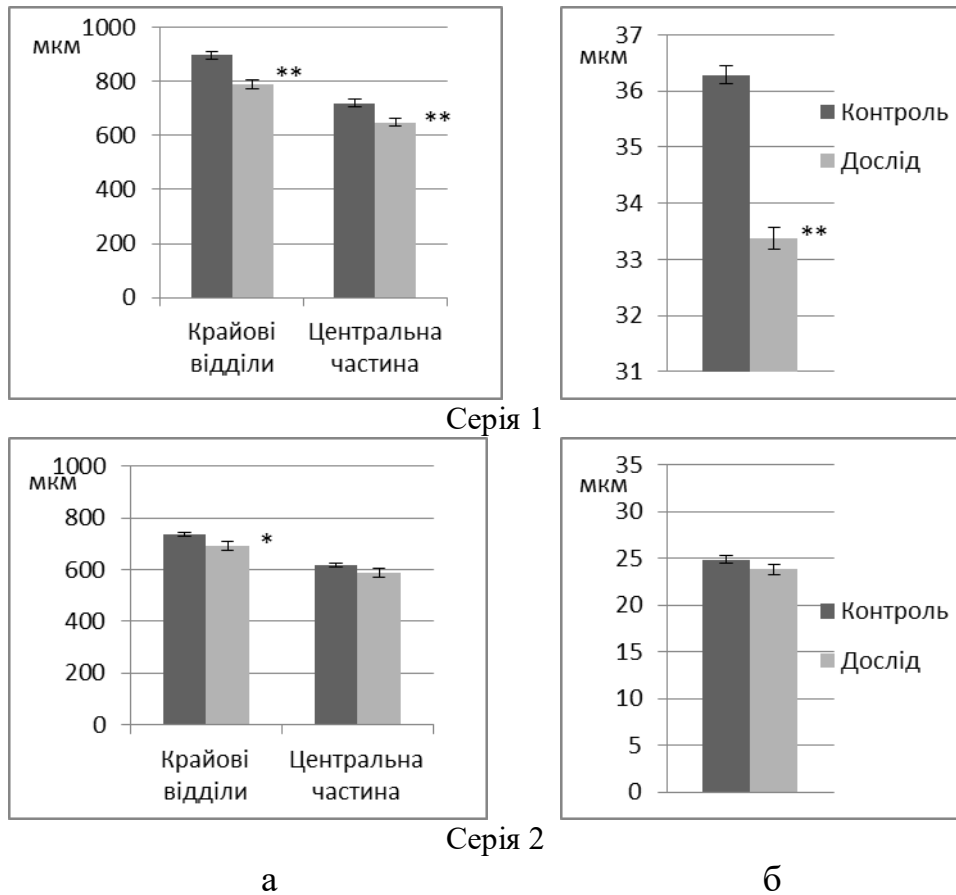
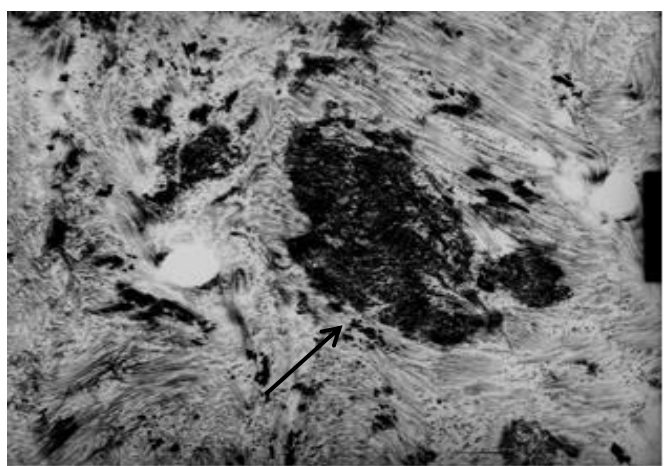


Рис. 4. Показники стану міжхребцевого диска щурів після впливу свинцю: а) висота міжхребцевого диска у крайових та центральній частині (мкм), б) ширина волокнистих пластинок (мкм). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.



а



б

Рис. 5. Мікрофотографії електронограм. Дегенеративні порушення у клітинах та матриксі міжхребцевого диска молодих щурів після дії свинцю. А) Вакуолізація у цитоплазмі хондроцитах волокнистого кільця. Б) Неоднорідність щільності колагенових фібрил. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення: а) 8000, б) 10000.

У матриксі волокнистого кільця щурів обох груп виявлено наявність електроно-щільних ділянок, що можуть вказувати на мінералізацію матриксу та можливе накопичення свинцю (Rutges J. et al., 2010) (рис. 5б). Зафіксовано дистрофічні змін у нотохордальних клітинах молодих щурів, чого не виявлено у щурів зрілого віку з остеопорозом, що можливо пояснює достовірне зниження висоти диску у центральній частині молодих щурів. У суглобовому хрящі дуговідросткових суглобів виявлені зміни у щурів обох дослідних груп, однак у щурів зрілого віку з остеопорозом вони мали більший прояв. Так, зафіксовано зниження висоти суглобового хряща у щурів зрілого віку з остеопорозом в 1,4 раза, а у молодих – в 1,3 раза (рис. 6а). Довжина ерозованої суглобової поверхні збільшилася у щурів зрілого віку з остеопорозом після впливу свинцю також більш суттєво, ніж у молодих тварин (рис. 6б). Це пояснюється можливо зростанням рівня свинцю у крові внаслідок резорбції кістки, а також порушеннями у субхондральній кістці, внаслідок остеопорозу (Findlay D.M., Atkins G.J., 2014).

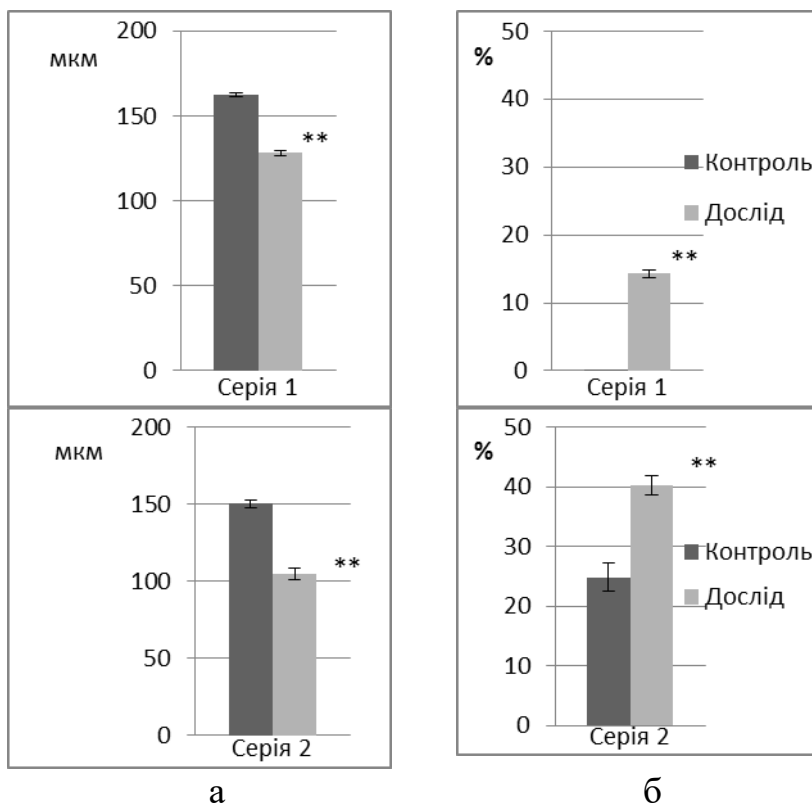


Рис. 6. Показники стану дуговідросткових суглобів щурів після дії свинцю: а) висота суглобового хряща (мм), б) відносна довжина поверхні з ознаками ерозії (%). ** – $p < 0,01$

У поверхневій зоні обох груп спостерігали вакуолізацію цитоплазми хондроцитів, траплялися загиблі клітини, що є ознакою початкової стадії остеоартрозу та супроводжується деградацією хрящового матриксу (Thomas C. M. et al., 2010; Hwang H., Kim H., 2015). У середній зоні суглобів щурів зрілого віку з остеопорозом дегенеративні зміни в клітинах були більш виражені – спостерігали формування деструктивних порожнин, загибель мітохондрій, тоді як у молодих щурів виявлені ділянки гомогенізації цитоплазми. У молодих тварин встановлено неоднорідність будови хрящового матриксу у проміжній зоні суглобового хряща, його розволокнення, чого у

щурів зрілого віку з остеопорозом не спостерігали, що можливо пояснює зниження висоти у молодих щурів внаслідок порушень структури хрящового матриксу цієї зони.

Вплив свинцю на матрикс кісткової тканини тіл хребців та хрящової тканини міжхребцевих дисків щурів різного віку. За даними проведеного поляризаційно-оптичного дослідження у кістковій тканині після впливу свинцю зростає частка колагенових волокон з колагеном III типу, які є тоншими та розміщуються менш щільно за колагенові волокна з колагеном I типу. Вірогідно, порушення колагенової матриці впливає на міцність кістки, відносний вміст колагенових волокон знижується в обох групах, але більший прояв ці зміни мають у зрілому віці на фоні модельованого остеопорозу (рис. 7а). У волокнистому кільці міжхребцевого диску зафіксовано аналогічну тенденцію до підвищення вмісту колагенових волокон з колагеном III типу, та зниженню щільності волокон з колагеном I типу (рис. 7б). Найбільш виражені зміни зафіксовано у групі молодих щурів. Такі зміни у компонентному складі колагенів збільшують ризик переломів у кістковій тканині та є ознакою дегенеративних змін в міжхребцевому диску (Postacchini F., 1999).

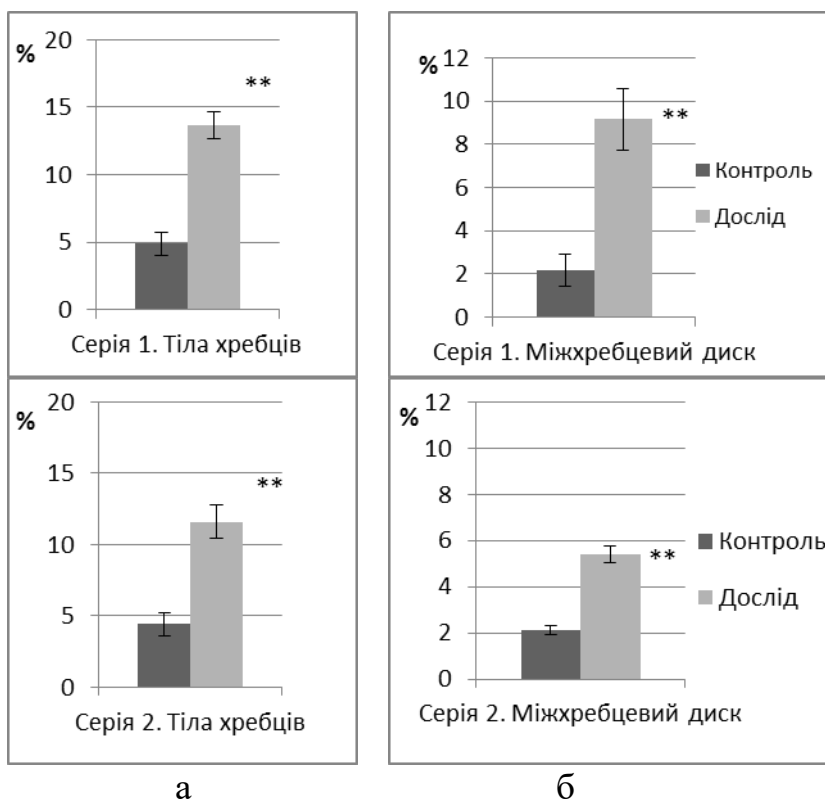


Рис. 7. Відносний вміст колагенових волокон з колагену III типу у матриксі тіл хребців (а) та міжхребцевих дисків (б) у щурів після дії свинцю (%).
** – $p < 0,01$

Особливості накопичення свинцю в тілах хребців і міжхребцевих дисках та мінеральна щільність кісткової тканини щурів різного віку після моделювання дії свинцю. За результатами спектрометричного аналізу встановлено, що вміст свинцю в кістковій тканині був вищим майже в 5 разів в групі молодих тварин, порівняно з тваринами зрілого віку з модельованим остеопорозом. Ці результати свідчать, що накопичення свинцю відбувається більш активно в процесі росту тіл хребців, ймовірно через його властивість до

вбудовування у структуру гідроксилапатиту кісткової тканини (Leonas R. et al., 2016). Встановлено достовірне зростання рівня свинцю в тканинах міжхребцевого диска у молодих тварин в період активного росту після впливу свинцю в 4,6 раз, тоді як у тварин зрілого віку з модельованим остеопорозом достовірної різниці між дослідною та контрольною групами не виявлено.

Згідно з результатами проведеного денситометричного аналізу тіл хребців у молодих щурів показник мінеральної щільності кісткової тканини після впливу свинцю достовірно знизився на 14,4%, що може призводити до формування низького піка кісткової маси, збільшуючи ризик виникнення остеопорозу в майбутньому. У щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом отримані протилежні результати, які суперечать даним проведеного нами морфометричного дослідження, однак їх можна пояснити особливістю накопичення свинцю з віком та завищенням показника мінеральної щільності кісткової тканини внаслідок цього. В літературі також представлено дані щодо підвищення цього показника під дією свинцю, однак порушується якість кістки (Escrignano A. et al, 1997; Gruber H.E. et al., 1997; Bagchi D., & Preuss, H.G., 2005).

ВИСНОВКИ

1. Із використанням моделі низькорівневого впливу свинцю встановлено структурно-функціональні зміни у складових хребтового рухового сегмента поперекового відділу хребта та проведено їх порівняння в молодих щурів та щурів зрілого віку з остеопорозом як на тканинному, так і на клітинному рівнях. У молодих тварин продемонстровано вищу чутливість до дії свинцю кісткової тканини тіл хребців і компонентів міжхребцевого диска, а у щурів зрілого віку з остеопорозом – суглобового хряща дуговідросткових суглобів.

2. Під впливом свинцю пригнічується ріст тіл хребців поперекового відділу хребта в молодих щурів і щурів зрілого віку з остеопорозом. Вплив свинцю на хребет молодих щурів більш виражений – зафіксовано зменшення розмірів тіл хребців у всіх площинах, а у щурів зрілого віку з остеопорозом – лише у висоту.

3. У результаті дії свинцю розвиваються дегенеративні зміни у структурах хребтового рухового сегмента щурів як молодого віку, так і зрілого віку на фоні остеопорозу. В обох групах встановлено у тілах хребців зменшення площі губчастої кісткової тканини (в 1,8 і 1,5 раз відповідно), а в компактній кістковій тканині виявлено рарефікацію. Ультрамیکроскопічно в остеоцитах та остеобластах щурів обох груп встановлено дистрофічні зміни переважно у вигляді вакуолізації цитоплазми та набряку мітохондрій з руйнуванням структури крист.

4. У молодих щурів після дії свинцю зареєстровано майже вдвічі більше зниження висоти міжхребцевого диска (на 10-12,2%) порівняно зі щурами зрілого віку на фоні остеопорозу (на 6,2%). При цьому встановлено мінералізацію матриксу волокнистого кільця та порушення структури клітин: у молодих щурів негативні зміни в хондроцитах цієї зони проявлялися вакуолізацією, деструкцією цитоплазми та зменшенням кількості цистерн гЕПС, а у щурів зрілого віку з остеопорозом руйнування були менш

вираженими і пов'язані з деградацією органел. Крім того, у молодих щурів визначено зниження щільності клітин і деструктивні зміни в нотохордальних клітинах.

5. У дуговідросткових суглобах щурів обох досліджуваних груп під впливом свинцю відмічено зниження висоти суглобового хряща (в 1,3 раза у молодих тварин і в 1,4 – у зрілих з остеопорозом). Деструктивні зміни були більш вираженими у щурів зрілого віку з остеопорозом, в яких виявлено збільшення довжини розшарованої суглобової поверхні в 1,6 раза, дегенеративні порушення хондроцитів зі загибеллю мітохондрій. У хондроцитах молодих тварин мітохондрії зберігалися, проте були гіпертрофованими з порушеною структурою крист.

6. Вплив свинцю у молодих і щурів зрілого віку з остеопорозом призводить до порушення структурної організації матриксу, а саме до перерозподілу типів колагену в колагенових волокнах у губчастій кістковій тканині тіл хребців та міжхребцевому диску з тенденцією до зростання вмісту колагену III типу (у кістковій тканині у 2,8 і 2,6 раза відповідно; у міжхребцевому диску – в 4,2 та 2,6 раза відповідно) та зниження колагену I типу (у кістковій тканині – на 9,6 та 10,5%; у міжхребцевому диску – на 9,8 та 4,1% відповідно).

7. Унаслідок вживання свинцю в концентрації $230 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$ у питній воді протягом 10 тижнів експерименту виникає значуще підвищення рівня цього елемента в кістковій тканині тіл хребців у молодих щурів (у 6,4 раза) порівняно зі зрілими на фоні остеопорозу (в 1,2 раза). Підвищення рівня свинцю в міжхребцевому диску зафіксовано лише в молодих щурів.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Мальцева В.Е. Структурные нарушения в позвоночнике неполовозрелых крыс в условиях свинцовой интоксикации / В.Е. Мальцева // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 152-155.
2. Мальцева В.Є. Вікові особливості остеометричних параметрів тіл хребців щурів після впливу свинцю / В.Є. Мальцева // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 4, Т.1 (124) – С. 115-119.
3. Мальцева В.Є. Вплив свинцю на структурно-функціональний стан кісткової тканини хребта щурів на фоні остеопорозу / В.Є. Мальцева // Фундаментальні проблеми медицини та біології. – 2016. – № 1 (127). – Р. 4-7.
4. Мальцева В.Є. Вплив свинцю на клітини кісткової тканини тіл хребців щурів на фоні остеопорозу / В.Є. Мальцева // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 2, Т. 3, – С. 265-269.
5. Мальцева В.Є. Вплив свинцю на вміст колагенів у міжхребцевому диску та губчастій кістковій тканині тіл хребців щурів різного віку / В.Є. Мальцева // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип. 3, Т. 1 (131). – С. 211-215.

6. Maltseva V. Effect of Pb exposure on the cells and matrix of the intervertebral disc of rats / V. Maltseva // *Regulatory mechanisms in biosystems*. – 2017. – Vol. 8 (2). – P. 217-224.

7. Мальцева В.Е. Влияние свинцовой интоксикации на межпозвонковый диск (экспериментальное исследование) / В.Е. Мальцева // *Боль. Суставы. Позвоночник*. – 2012. – № 1 (6). – С. 37-41.

8. Мальцева В.Є. Вплив свинцю на клітини кісткової та хрящової тканин (огляд літератури) / В.Є. Мальцева // *Молодий вчений*. – 2017. – №7(47). – С. 5-10.

9. Мальцева В.Е. Морфологические изменения в костной ткани тел позвонков при свинцовой интоксикации / В.Е. Мальцева : мат. наук.-практ. конф. (Сучасні дослідження в ортопедії та травматології (перші наукові читання, присвячені пам'яті акад. О.О. Коржа)) (Харків, 6-7 жовтня 2011 р.). – С. 85-86.

10. Мальцева В.Є. Забруднення свинцем як чинник виникнення морфологічних порушень в міжхребцевому диску / В.Є. Мальцева // *Журнал Національної академії медичних наук України. Конф. молод. вчених, присвяч. 20-річчю Національної академії медичних наук України*. – 2013. – Т. 19, Додаток. – С. 85.

11. Мальцева В.Е. Влияние ацетата свинца на минеральную плотность костной ткани молодых крыс / В.Е. Мальцева : матер. всеукр. наук.-практич. конф. (Сучасні дослідження в ортопедії та травматології) (Харків, 30-31 жовтня 2014 р.). – С. 167-168.

12. Мальцева В.Е. Влияние свинца на дугоотростчатые суставы молодых крыс / В.Е. Мальцева : збір. тез доповідей наук.-практ. конф. (Морфологічні дослідження – виклики сучасності) (Сумський державний університет) (Суми, 22-23 квітня 2015 р.). – С. 32-35.

13. Maltseva V.E. Osteometric parameters of rat spine vertebrae with osteoporosis after lead exposure / V.E. Maltseva // *Osteoporosis International*. – 2016. – Vol. 27. – Suppl. 1. – P. 644.

14. Мальцева В.Є. Перебудова дуговідросткових суглобів молодих щурів та з остеопорозом після впливу свинцю : матер. конф. (Прикладні аспекти морфології) (Тернопіль, 20-21 жовтня, 2016). – С. 103-105.

АНОТАЦІЯ

Мальцева В.Є. Вікові особливості перебудови хребтового рухового сегменту поперекового відділу хребта щурів після дії свинцю. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

У дисертаційній роботі представлено результати експериментального дослідження із використанням моделі низькорівневого впливу свинцю та встановлено структурно-функціональні зміни у складових хребтового рухового

сегмента поперекового відділу хребта, проведено їх порівняння в молодих щурів та щурів зрілого віку з остеопорозом як на тканинному, так і на клітинному рівнях. У молодих тварин продемонстровано вищу чутливість до дії свинцю кісткової тканини тіл хребців і компонентів міжхребцевого диска, а у щурів зрілого віку з остеопорозом – суглобового хряща дуговідросткових суглобів. Це обумовлено віковими особливостями: у молодих тварин активний ріст тіл хребців сприяє швидкому накопиченню свинцю в їх структурі та прилеглих тканинах, а у щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом – резорбційною активністю остеокластів та дією свинцю, який циркулює в рідинах організму, на суглоби хребта.

Вплив свинцю у молодих і щурів зрілого віку з остеопорозом призводить до порушення структурної організації матриксу тіл хребців і міжхребцевих дисків, а саме до перерозподілу типів колагену в колагенових волокнах із тенденцією до зростання вмісту колагену III типу.

Ключові слова: свинець, тіло хребця, міжхребцевий диск, дуговідростковий суглоб, кісткова тканина, хрящова тканина, мікроскопія, остеопороз, щури.

АННОТАЦИЯ

Мальцева В.Е. Возрастные особенности перестройки позвоночного двигательного сегмента поясничного отдела позвоночника крыс после воздействия свинца. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 - цитология, клеточная биология, гистология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2018.

В диссертационной работе представлены результаты экспериментального исследования с использованием модели низкоуровневого воздействия свинца и установлены структурно-функциональные изменения в составляющих позвоночного двигательного сегмента поясничного отдела позвоночника, проведено их сравнение у молодых крыс и крыс зрелого возраста с остеопорозом как на тканевом, так и на клеточном уровнях. У молодых животных продемонстрирована более высокая чувствительность к действию свинца костной ткани тел позвонков и компонентов межпозвонкового диска, а у крыс зрелого возраста с остеопорозом – суставного хряща дугоотростчатых суставов. Это обусловлено возрастными особенностями: у молодых животных активный рост тел позвонков способствует быстрому накоплению свинца в их структуре и прилегающих тканях, а у крыс зрелого возраста с моделированным остеопорозом – резорбционной активностью остеокластов и воздействием свинца, циркулирующего в жидкостях организма, на суставы позвоночника.

Влияние свинца у молодых и крыс зрелого возраста с остеопорозом приводит к нарушению структурной организации матрикса тел позвонков и межпозвонковых дисков, а именно к перераспределению типов коллагена в

коллагеновых волокнах с тенденцией к повышению содержания коллагена III типа.

Ключевые слова: свинец, тело позвонка, межпозвонковый диск, дугоотростчатый сустав, костная ткань, хрящевая ткань, микроскопия, остеопороз, крысы.

SUMMARY

Maltseva V.E. Age-related features of the realignment of the spinal motion segment of the lumbar spine of rats after lead exposure. – Manuscript.

Thesis for obtaining the Candidate of Science degree in Biology, specialty 03.00.13 – Cytology, cell biology, histology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The dissertation presents the results of the experimental study of the influence of lead on the reconstruction of the vertebral bodies, intervertebral discs and facet joints that make up the vertebral motor segment of the lumbar spine in the young rats and the mature rats with modeled osteoporosis both at the tissue and cell levels. In addition, the results of lead exposure on the redistribution of types of collagen fibers in the matrix of the vertebral bodies and the intervertebral discs are presented, and the accumulation of lead in these structures is analyzed.

We found that the loss of bone mass in the vertebral bodies of young rats is associated with suppression of the growth of the vertebral bodies and increased resorptive activity of osteoclasts, and in the rats with osteoporosis, due to the sensitivity of osteoblasts to the action of lead on the background of osteoporosis. In the intervertebral disc, especially in young animals, observed a decrease in the height of the intervertebral disc in the central and outer regions is associated with a violation of the matrix structure and a decrease of cell density, due to dystrophic disorders. Degenerative changes in the facet joints of rats have been established, with a greater manifestation in mature rats with osteoporosis.

Due to the influence of lead in the matrix of the annulus fibrosus of the intervertebral disc and the trabecular bone, increase in the content of collagen fibers of type III and a decrease in the number of fibers with collagen type I, with a greater manifestation in young animals, was noted.

As a result of the spectrometric analysis, the accumulation of lead in both the bone tissue of vertebral bodies and in the intervertebral disc of the young rats after the low-level exposure of lead (230 mg/L in the water) was determined, and in mature ones on the background of osteoporosis only in the vertebral bodies.

In general, the results of the conducted dissertation research indicate that the low-level lead exposure causes degenerative changes in the spinal motion segment of the rats of both groups, with a greater manifestation in the young rats in the vertebral bodies and the intervertebral discs, and observed a greater manifestation in the facet joints in the mature rats with modeling osteoporosis. This is probably due to age-related features: in the young animals, the active growth of the vertebral bodies contributes to the rapid accumulation of lead in their structure and adjacent tissues, and in the mature rats with modeled osteoporosis, due to the resorptive activity of

osteoclasts and the influence of lead circulating in the body's fluids on facet joints of the spine.

Key words: lead, vertebral body, intervertebral disc, facet joint, bone tissue, cartilage tissue, microscopy, osteoporosis, rat.