

Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України»
Національна академія медичних наук України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАЛЬЦЕВА ВАЛЕНТИНА ЄВГЕНІВНА

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

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

03.00.11 - цитологія, клітинна біологія, гістологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ В.Є. Мальцева

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор Дедух Нінель
Василівна

Харків – 2018

АНОТАЦІЯ

Мальцева В.Є. Вікові особливості перебудови хребтового рухового сегменту поперекового відділу хребта щурів після дії свинцю. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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.

Важливою проблемою охорони здоров'я є дослідження факторів, що викликають біль в спині, причиною яких можуть бути дегенеративні захворювання хребта, остеопороз та його ускладнення. 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. Можливість накопичення його у кістковій тканині робить його одним з важливих факторів негативного впливу на складові скелету, зокрема на хребтовий руховий сегмент. Однак вплив свинцю на стан епіфізарного, суглобового та волокнистого хряща, кісткової тканини в рамках однієї системи залишається маловивченим.

Метою дисертаційного дослідження було визначити особливості перебудови тіл хребців, міжхребцевих дисків та дуговідросткових суглобів поперекового відділу хребта щурів різного віку після дії свинцю. Припускається, що вплив свинцю може бути однією з причин виникнення дегенеративних змін у хребті та посилюватися на фоні остеопорозу.

Для досягнення поставленої мети були використані методи, що дозволили оцінити особливості динаміки росту хребта (соматометричний) та параметри тіл хребців (остеометричний), виконати якісну та кількісну оцінку

особливостей перебудови та метаболізму кісткової та хрящової тканин, ультраструктурних особливостей будови, метаболізму клітин та матриксу тіл хребців, міжхребцевих дисків та дуговідросткових суглобів (світлова, електронна та поляризаційна мікроскопія), а також вміст свинцю у кістковій та хрящовій тканині цих структур (флуоресцентна спектрометрія) у молодих щурів та щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом.

Вивчення впливу свинцю на ріст хребта шляхом остеометричного вимірювання різних параметрів тіл хребців виявило, що вплив свинцю викликає пригнічення росту хребта в період активного росту. А саме, в тілах хребців молодих щурів зафіксовано зменшення усіх вимірюваних параметрів, в той час як у зрілих щурів з модельованим остеопорозом знизилася тільки висота тіл хребців ІІ, ІІІ, однак менш суттєво порівняно з щурами іншого віку.

У результаті проведеного дослідження встановлено, що вплив свинцю викликає структурно-функціональні зміни у складових хребтового рухового сегмента поперекового відділу хребта молодих щурів та щурів з остеопорозом як на тканинному, так і на клітинному рівні. У тілах хребців виявлено втрату кісткової маси у молодих щурів пов'язану пригніченням росту тіл хребців та посиленням резорбційної активності остеобластів, а у щурів з остеопорозом, внаслідок чутливості остеобластів до дії свинцю на фоні остеопорозу. Зафіксовано зниження висоти епіфізарного хряща у щурів обох серій та зниження відносної площі хрящових ділянок, внаслідок пригнічення процесів формування кісткової тканини у тварин обох вікових груп. 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, що свідчить про вікові особливості впливу свинцю на остеобласти з огляду на різні прояви деструктивних змін у клітинах. В обох серіях після дії свинцю виявлено остеобласти з вираженим

набряком мітохондрій та зруйнованою структурою крист. У щурів зрілого віку з остеопорозом зафіксовано виражене зниження щільності остеоцитів у компактній кістковій тканині, ніж у губчастій, а у молодих щурів ці показники практично не відрізнялися, що пов'язано з накопиченням свинцю в організмі максимально в компактній кістковій тканині, а з віком його концентрація в ній суттєво зростає. У міжхребцевому диску, особливо у молодих тварин, відзначено зниження висоти міжхребцевого диску в центральній частині та в крайових відділах пов'язане з порушенням структури матриксу (тріщинами та розволокненням колагенових пластинок у волокнистому кільці) та зниженням щільності клітин, внаслідок дистрофічних порушень. У волокнистому кільці тварин обох груп у хондроцитах виявлено схожі дегенеративні зміни, але з більшим проявом у молодих щурів. Так, у щурів зрілого віку з остеопорозом зафіксовано переважно деградацію органел з переважанням в цитоплазмі мікротрубочок та мікрофіламентів, тоді як у молодих – формування великих деструктивних порожнин та вакуолізацію цитоплазми. 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. У дуговідросткових суглобах щурів встановлено дегенеративні зміни, з більшим проявом на фоні остеопорозу, що пояснюється можливо зростанням свинцю у рівні крові та у суглобовій рідині, внаслідок резорбції кісткової тканини, а також порушеннями у субхондральній кістці, внаслідок остеопорозу. У поверхневій зоні суглобового хряща обох груп спостерігали вакуолізацію цитоплазми хондроцитів, траплялися загиблі клітини, що є ознакою початкової стадії остеоартрозу та супроводжується деградацією хрящового матриксу. 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.

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. 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. Найбільш виражені зміни зафіксовано у групі молодих щурів. Перерозподіл співвідношення різних типів колагену призводить до зміни товщини колагенових волокон, що ймовірно зменшує міцність матриксу, його можливість протистояти навантаженням та підвищує ризик появи тріщин.

У результаті спектрометричного аналізу встановлено накопичення свинцю як у кістковій тканині тіл хребців, так і в міжхребцевому диску молодих щурів після низькорівневого впливу свинцю, а у зрілих на фоні остеопорозу – лише у тілах хребців, ймовірно внаслідок активного процесу росту молодих тварин та більш швидкого накопичення свинцю у досліджених тканинах внаслідок цього.

У цілому результати проведеного дисертаційного дослідження свідчать, що низькорівнева дія свинцю викликає дегенеративні зміни у хребтовому руховому сегменті щурів обох груп, з більшим проявом у молодих щурів – в тілах хребців та міжхребцевих дисках, а у зрілих з модельованим остеопорозом – у дуговідросткових суглобах. Це можливо пов'язано з 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, внаслідок резорбційної активності остеобластів та впливу свинцю, що циркулює у рідинах організму на суглоби хребта.

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

SUMMARY

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

A dissertation submitted for acquiring of the degree of Candidate of Science in Biology, specialty 03.00.13 “Cytology, cell biology, histology”. – Kyiv National Taras Shevchenko University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

An important health problem is the study of factors that cause back pain, which can cause degenerative diseases of the spine, osteoporosis and its complications. The main components of the spinal motor segment that can be involved in the process of pain are degeneration of the intervertebral disc, deformation of the vertebral bodies and arthrosis of the facet joints. By this time, factors that cause back pain are discussed, among which values are given not only endogenous but also exogenous factors, one of which may be the effect of lead. The possibility of its accumulation in bone tissue makes it one of the important factors of negative influence on the components of the skeleton, in particular on the spinal motion segment. However, the influence of lead on the state of the epiphyseal, articular and fibrous cartilage, bone tissue within a single system remains poorly understood.

The purpose of the dissertation research was to determine the features of the realignment of vertebral bodies, intervertebral discs, and facet joints of the lumbar spine of rats of different ages after lead exposure. It is assumed that the effect of

lead may be one of the causes of degenerative changes in the spine and increase with the background of osteoporosis.

To achieve the goal, methods were used that allowed to evaluate of the spine growth in dynamics (somatometric) and the parameters of the vertebral bodies (osteometric), to perform a qualitative and quantitative assessment of the features of the reconstruction and metabolism of the bone and cartilage tissues, ultrastructural features of the structure, cell metabolism, and the matrix of vertebral bodies, intervertebral discs and facet joints (light, electron and polarization microscopy), as well as lead content in the bone and cartilaginous tissues of these structures (fluorescence spectrometry) in the young rats and the mature rats with modeled osteoporosis.

Study of the influence of lead on spinal growth by osteometric measurement of various parameters of the vertebral bodies revealed that the effect of lead causes the suppression of spine growth during the period of active growth. Namely, in the bodies of the vertebrae of young rats, there was a decrease in all measured parameters, whereas in mature rats with simulated osteoporosis, only the height of vertebrate bodies LI, LII, LIII decreased, however, less significantly compared with rats of another age.

As a result of the study, it was found that the effect of lead causes structural and functional changes in the spinal motion segment of the lumbar spine of young rats and rats with osteoporosis both at the tissue and at the cellular level. We found that the loss of bone mass in the vertebral bodies of young rats is associated with suppression of the growth of vertebral bodies and increased resorptive activity of osteoclasts, and in rats with osteoporosis, due to the sensitivity of osteoblasts to the action of lead on the background of osteoporosis. The decrease of the height of epiphyseal cartilage in the rats of both series and the decrease in the relative area of cartilage sites, as a result of inhibition of bone formation processes in animals of both age groups, were recorded. In osteoblasts of young rats, after the action of lead, the formation of destructive cavities, vacuolation of the cytoplasm was discovered, and in the mature rats with osteoporosis, the destruction of the cell

membrane, the violation of the structure of the granular endoplasmic net and the increase in the number of secondary lysosomes in the cytoplasm were observed, indicating age-related features of lead exposure on osteoblasts considering various manifestations of destructive changes in cells. In both series, after the action of lead, osteoblasts with pronounced edema of mitochondria and with damage of the structure of cristae were found. In rats of mature age with osteoporosis, a pronounced decrease in the density of osteocytes in a compact bone tissue was recorded, rather than in the trabecular bone, and in young rats, these indices practically did not differ, which is related to the accumulation of lead in the organism as much as possible in a compact bone tissue, and with age, its concentration it is growing significantly. 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 (cracks and fissures in the annulus fibrosus) and a decrease of cell density, due to dystrophic disorders. In the fibrous ring of animals of both groups in chondrocytes, similar degenerative changes were detected, but with a greater manifestation in young rats. Thus, in rats of mature age with osteoporosis, predominantly degradation of organelles with a predominance of microtubules and microfilaments in the cytoplasm was observed, whereas in young ones, the formation of large destructive cavities and vacuolation of the cytoplasm. In addition, in rats of mature age with osteoporosis, the formation of large residual corpuscles was observed, which the result of autophagy is, it is an adaptive reaction to the effects of negative factors and prevents cell death. Degenerative changes in the facet joints of rats have been established, with a greater manifestation against osteoporosis, due to the possible increase of lead blood level and in the joint fluid due to resorption of bone tissue, as well as abnormalities in the subchondral bone due to osteoporosis. In the superficial zone of the articular cartilage of both groups, vacuolation of the cytoplasm of chondrocytes was observed, the death of cells is occurred, which is a sign of the initial stage of osteoarthritis and is accompanied by degradation of the cartilage matrix. In the middle zone of the articular cartilage of rats of mature age

with osteoporosis, degenerative changes in the cells were more pronounced - the formation of destructive cavities, the death of mitochondria was observed, whereas in the young rats cytoplasm homogenization was detected. In young animals, the heterogeneity of the structure of the cartilage matrix in the middle zone of articular cartilage, its defibrination, which was not observed in elderly rats with osteoporosis was observed, which may explain the decrease in height in young rats due to violations of the cartilaginous matrix structure in this zone.

According to the conducted polarization-optical study in bone tissue, after the influence of lead, the proportion of collagen fibers with type III collagen increases, which are thinner and are placed less densely on collagen fibers with type I collagen. It is likely that the collagen matrix disturbance affects bone strength, the relative content of collagen fibers decreases in both groups, but the bigger manifestation of these changes is in adulthood in the background of modeling osteoporosis. A similar tendency was observed in the annulus fibrosus of the intervertebral disc to increase the content of collagen fibers with collagen type III, and to decrease the density of fibers with type I collagen. The most pronounced changes were recorded in the group of young rats.

Due to the influence of lead in the matrix of the annulus fibrosus of the intervertebral disc and trabecular bone, the redistribution of collagen content in the structure of collagen fibers, associated with an 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. Redistribution of the ratio of different types of collagen leads to a change in the thickness of collagen fibers, which probably reduces the strength of the matrix, its ability to withstand the load and increases the risk of cracks.

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 young rats after the low-level exposure of lead was determined, and in mature ones on the background of osteoporosis only in the vertebral bodies, probably due to the active

growth process of young animals and the faster accumulation of lead in the investigated tissues as a result of this.

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 young rats in the vertebral bodies and 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 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 osteoblasts and the influence of lead circulating in the body's fluids on joints of the spine.

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

Список опублікованих праць за темою дисертації

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

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

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

8. 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. (Web of Science).

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.

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів | 17 |
| Вступ | 18 |
| РОЗДІЛ 1 Вплив свинцю на хрящову та кісткову тканини | 25 |
| 1.1 Вплив свинцю на хрящову тканину | 26 |
| 1.1.1 Вплив свинцю на процес росту та епіфізарний хрящ | 27 |
| 1.1.2 Вплив свинцю на суглобовий хрящ | 31 |
| 1.2 Вплив свинцю на кісткову тканину | 34 |
| 1.2.1 Особливості накопичення свинцю в кістковій тканині | 34 |
| 1.2.2 Вплив свинцю на рівень кальцитропних гормонів | 38 |
| 1.2.3 Вплив свинцю на остеобласти, остеокласти, остеоцити та мезенхімальні клітини кісткового мозку | 39 |
| 1.2.4. Вплив свинцю та остеопороз | 42 |
| 1.2.5 Вплив свинцю на загоєння перелому | 46 |
| РОЗДІЛ 2 Матеріал і методи дослідження | 52 |
| 2.1 Матеріал дослідження | 52 |
| 2.2 Методи дослідження | 54 |
| 2.2.1 Соматометричні методи | 54 |
| 2.2.2 Остеометричні методи дослідження | 54 |
| 2.2.3 Рентгенівська флуоресцентна спектрометрія | 55 |
| 2.2.4 Денситометричне дослідження | 55 |
| 2.2.5 Гістологічний аналіз з морфометрією | 55 |
| 2.2.6 Метод електронної мікроскопії | 57 |
| 2.2.7 Поляризаційно-оптичний метод | 57 |
| 2.2.8 Статистичні методи | 58 |

| | |
|---|-----|
| РОЗДІЛ 3 Особливості впливу свинцю на ріст хребта щурів різного віку з урахуванням динаміки показників росту, маси тіла та остеометричних параметрів тіл хребців | 60 |
| 3.1 Особливості впливу свинцю на динаміку показників довжини та маси тіла у щурів різного віку | 60 |
| 3.1.1 Динаміка показників довжини та маси тіла у молодих щурів впродовж впливу свинцю | 60 |
| 3.1.2 Динаміка показників довжини та маси тіла щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом впродовж впливу свинцю | 63 |
| 3.2 Особливості впливу свинцю на ріст тіл хребців поперекового відділу хребта щурів різного віку | 65 |
| 3.2.1 Вплив свинцю на ріст тіл хребців молодих щурів | 65 |
| 3.2.2 Вплив свинцю на ріст тіл хребців щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом | 67 |
| РОЗДІЛ 4 Особливості впливу свинцю на хребтовий руховий сегмент щурів різного віку на тканинному та клітинному рівнях | 72 |
| 4.1 Гістологічний аналіз з ультрамікроскопією кісткової тканини тіл хребців щурів різного віку | 72 |
| 4.1.1 Структурні особливості кісткової тканини тіл хребців молодих щурів | 72 |
| 4.1.2 Структурні особливості кісткової тканини тіл хребців щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом | 89 |
| 4.1.3 Порівняльний аналіз впливу свинцю на кісткову тканину тіл хребців щурів різного віку | 107 |
| 4.2 Гістологічний аналіз з ультрамікроскопією міжхребцевих дисків щурів різного віку | 107 |
| 4.2.1 Структурні особливості міжхребцевих дисків молодих щурів | 107 |
| 4.2.2 Структурні особливості міжхребцевих дисків щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом | 123 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.3 Порівняльний аналіз впливу свинцю на міжхребцеві диски щурів різного віку | 137 |
| 4.3 Гістологічний аналіз з ультрамікроскопією дуговідросткових суглобів щурів різного віку | 138 |
| 4.3.1 Структурні особливості дуговідросткових суглобів молодих щурів | 138 |
| 4.3.2 Структурні особливості дуговідросткових суглобів щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом | 147 |
| 4.2.3 Порівняльний аналіз впливу свинцю на дуговідросткові суглоби щурів різного віку | 158 |
| РОЗДІЛ 5 Вплив свинцю на матрикс кісткової тканини тіл хребців на хрящовій тканини міжхребцевих дисків щурів різного віку | 162 |
| 5.1 Вплив свинцю на вміст колагенів у міжхребцевому диску та губчастій кістковій тканині тіл хребців щурів різного віку | 162 |
| 5.1.1 Вплив свинцю на вміст колагенів у міжхребцевому диску та губчастій кістковій тканині тіл хребців молодих щурів | 162 |
| 5.1.2 Вплив свинцю на вміст колагенів у міжхребцевому диску та губчастій кістковій тканині тіл хребців зрілих щурів з модельованим остеопорозом | 167 |
| 5.2 Вплив свинцю на вміст глікозаміногліканів у міжхребцевому диску щурів різного віку | 170 |
| 5.2.1. Вплив свинцю на вміст глікозаміногліканів у міжхребцевому диску молодих щурів в період активного росту | 170 |
| 5.2.2 Вплив свинцю на вміст глікозаміногліканів у міжхребцевому диску зрілих щурів з модельованим остеопорозом | 172 |
| РОЗДІЛ 6 Особливості накопичення свинцю в тілах хребців і міжхребцевих дисках та мінеральна щільність кісткової тканини щурів різного віку після моделювання дії свинцю | 174 |

| | |
|--|-----|
| 6.1 Особливості накопичення свинцю в тілах хребців та міжхребцевих дисках щурів різного віку після впливу свинцю | 175 |
| 6.1.1 Вміст свинцю у тілах хребців щурів в період активного росту та на фоні модельованого остеопорозу | 175 |
| 6.1.2 Вміст свинцю у міжхребцевих дисках щурів в період активного росту та на фоні модельованого остеопорозу | 176 |
| 6.2 Мінеральна щільність кісткової тканини у щурів різного віку після впливу свинцю | 178 |
| Аналіз результатів дослідження | 181 |
| Висновки | 185 |
| Список використаних джерел | 187 |
| Додатки | 213 |
| Додаток А | 213 |
| Додаток Б | 214 |

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

| | |
|--------------|---|
| aEPC | Агранулярна ендоплазматична сітка |
| ВООЗ | Всесвітня організація охорони здоров'я |
| гEPC | Гранулярна ендоплазматична сітка |
| ДІ | Довірчий інтервал |
| МЦКТ | Мінеральна щільність кісткової тканини |
| Bax | Ген, що регулює P53-опосередкований апоптоз, |
| BMP | Кістковий морфогенетичний білок |
| COMP | Олігомерний білок матриксу хряща |
| CP II | С-телопептид колагену II типу у сироватці крові |
| IGF-1 | Інсуліноподібний фактор росту-1 |
| MMP 13 | Попередник матриксної металопротеїнази 13 |
| NHANES II | National Health and Nutrition Examination Survey |
| P53 | Транскрипційний фактор, що регулює клітинний цикл, пригнічує ріст пухлин |
| RANKL | Ліганд рецептора, що активує ядерний фактор каппа-В |
| Runx 2 | Рант-пов'язаний фактор транскрипції 2 |
| Sox9 | Транскрипційний фактор, що регулює розвиток скелету |
| TGF- β | Некротичний фактор пухлин- β |
| uCTX-II | С-телопептид колагену II типу у сечі |
| uNTX-I | Н-телопептид колагену I типу у сечі |
| Wnt | Сигнальний шлях, що регулює ембріогенез, диференціювання клітин та розвиток пухлин |

ВСТУП

Актуальність теми. На сьогоднішній день більш, ніж 85 % людей у всьому світі страждають від болю в спині [1], причиною яких можуть бути дегенеративні захворювання хребта [2, 3], остеопороз та його ускладнення [4, 5]. 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 таких екзогенних факторів може бути вплив свинцю.

Дослідження впливу свинцю на організм людини є актуальною проблемою охорони здоров'я. Вимоги по зменшенню викидів свинцю у навколишнє середовище, застосовані до різних видів підприємств призвели до зниження вмісту цього елемента у крові сучасних людей, у порівнянні з серединою 20-го сторіччя. Не дивлячись на це, згідно зі звітом ВООЗ за 2010 р., навіть низький рівень свинцю (0,05 мг/л) в крові спричиняє на молекулярному та клітинному рівні негативний вплив на здоров'я [6, 7].

За результатами сучасних клінічних досліджень відомо, що свинець впливає на стан здоров'я людини при рівні в крові у межах норми, таких як зниження інтелектуальних здібностей у дітей [8], гіпертонію [9], ішемічну хворобу серця [10], дисфункцію нирок [11], карієс зубів [12] і психічні порушення [13, 14]. Таким чином, постає проблема вивчення впливу низьких концентрацій свинцю на організм людини.

Тіла хребців є своєрідним депо з накопичення свинцю, а через достатньо великий термін напіврозпаду свинцю (25 років), кістка також стає джерелом надходження його у кров під час ремоделювання, навіть при відсутності безпосереднього впливу з навколишнього середовища. При цьому процеси, що відбуваються у кістці під впливом накопиченого свинцю потребують

подальшого вивчення, у зв'язку з тим, що вони можуть призводити до формування низького піку кісткової маси, а це – фактор ризику для виникнення остеопорозу у майбутньому. Відомо, що живлення диску відбувається завдяки судинам, які просякають тіла хребців та паравертебральні тканини. Це свідчить про можливість потрапляння свинцю з кісткової тканини до міжхребцевого диску разом з поживними речовинами.

Згідно з експериментальними [15, 16] та клінічними дослідженнями [17, 18] існує взаємозв'язок між наявністю свинцю в кістковій тканині та розвитком остеопенії чи остеопорозу. Так, за умов свинцевої інтоксикації збільшується частота компресійних переломів в поперековому відділі хребта [19] за рахунок зниження мінеральної щільності кістки, а також внаслідок порушення нервово-м'язової функції індивідуумів, що призводить до падіння та переломів [20]. В експериментальному дослідженні, проведеному на щурах з оваріоектомією, встановлено, що вплив свинцю викликає зниження об'єму губчастої кісткової тканини у стегновій кістці [21], але досліджень стану тканин хребта не проводилося. Відомо, що свинець вбудовується в кристалічну решітку гідроксилапатиту аналогічно кальцію, що обумовлено подібною атомною та іонною структурою цих двох елементів [20], викликає зменшення розмірів кристалів гідроксилапатиту і прискорює ремоделювання кісткової тканини (як формування, так і резорбцію), а також порушує процес дозрівання колагену [22]. Крім того існують дані, які підтверджують, що вплив свинцю призводить до раннього настання менопаузи, що також збільшує ризик втрати кісткової маси [23, 24].

На сьогодні існують різні експериментальні дослідження, в яких частково розкрита роль свинцю в патології кісткової тканини. А саме, виявлено, що в результаті дії свинцю в концентраціях, що відповідає дії навколишнього середовища, на довгі кістки у щурів та мишей відбувається зниження об'єму губчастої кістки і мінеральної щільності кісткової тканини [22, 25, 26], зменшуються темпи росту довгих кісток [27-30], знижується міцність кісткової тканини (біомеханічні дослідження) [26]. У дослідженнях *in vitro*

вивчено вплив різних низьких концентрацій свинцю на остеобласто- і остеокластогенез у щурів і мишей, однак не з'ясовані механізми його дії [25, 26, 31, 32]. Так, виявлено, що свинець призводить до порушення остеобластогенеза, шляхом стимуляції диференціації мезенхімальних стовбурових клітин в адипоцити, замість остеобластів, що викликає зниження кількості цих клітин на поверхні трабекул [26]. Впливу свинцю на остеокластогенез не виявлено [25], але встановлено, що за умов підвищення рівня впливу свинцю відбувається зростання резорбційної активності остеокластів [31]. Однак вплив свинцю на структурно-метаболічні особливості вже диференційованих остеобластів, остеокластів та остеоцитів *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 [33-36].

Існують різні експериментальні дослідження впливу свинцю на хрящову тканину, в основному на гіаліновій хрящ, зокрема на епіфізарній [15, 27, 37], що пов'язано з вивченням дії цього елемента на процес росту кісток. Досліджень, присвячених вивченню впливу свинцю на волокнистий хрящ нами не виявлено. Останнім часом з'явилися дослідження, в яких розглядають наявність взаємозв'язку рівня свинцю в крові і розвитку остеоартрозу, а також припускають, що свинець може відігравати роль в патогенезі цього захворювання [38-42].

Незважаючи на велику кількість експериментальних та клінічних досліджень, механізм негативного впливу свинцю на кісткову тканину так і залишається до кінця незрозумілим. Так, проведено експериментальні дослідження впливу свинцю на стегнову та великогомілкову кістки, та клінічні, в яких вивчали дію свинцю на епіфізарний хрящ довгих кісток та втрату кісткової маси на фоні остеопорозу у жінок та чоловіків. Маловивченою залишається дія свинцю на структурно-метаболічні показники клітин та матриксу кісткової тканини тіл хребців. Малочисельні дані щодо впливу свинцю на міжхребцевий диск та дуговідросткові суглоби,

однак встановлено можливість накопичення свинцю у тканинах міжхребцевого диску [43], а також експериментально виявлено негативний вплив свинцю на суглобовий хрящ колінних суглобів. Крім того, досліджень щодо впливу свинцю на хребтовий руховий сегмент на фоні остеопорозу недостатньо, однак виявлено, що на фоні остеопорозу під дією свинцю відбувається втрата кісткової маси у стегновій кістці щурів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно плану науково-дослідної роботи ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» за темою «Вивчити ремоделювання кісткової тканини тіл хребців та структурну організацію міжхребцевих дисків в умовах остеопорозу, обтяженого дією несприятливих екологічних чинників» держреєстрація № 0114U003015, 2014-2016 рр. У рамках теми автор виконав експериментальне дослідження, проаналізував та узагальнив результати, здійснив інтерпретацію отриманих даних щодо впливу свинцю на хребтовий руховий сегмент поперекового відділу хребта щурів.

Мета роботи: визначити особливості 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.

Завдання дослідження:

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 – для визначення маси тіла тварин та для оцінки росту тіла тварин у довжину у ході експериментального дослідження; остеометричні – для вивчення росту тіл хребців; гістологічні, поляризаційно-оптичні та морфометричні – для якісної та кількісної оцінки особливостей перебудови та метаболізму кісткової та хрящової тканин тіл хребців, міжхребцевих дисків та дуговідросткових суглобів; електронно-мікроскопічний – для вивчення ультраструктурних особливостей будови, метаболізму клітин, а також матриксу тіл хребців, міжхребцевих дисків та дуговідросткових суглобів; флуоресцентної спектрометрії – для встановлення вмісту свинцю у тілах хребців та міжхребцевих дисках після проведення експериментального дослідження; рентгенівської денситометрії – для визначення мінеральної щільності кісткової тканини у сегменті L_I-L_{IV} поперекового відділу хребта; статистичні – для верифікації отриманих результатів дослідження.

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 рази 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 систему. 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 упроваджено 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 результати дисертації було оприлюднено та обговорено на науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Кістково-м'язева система та вік» (Яремче, 2012), «Захворювання кістково-м'язевої системи та вік» (Київ, 2011, 2013), на конференції молодих вчених, присвяченій 20-річчю Академії медичних наук (Київ, 2013), на науково-практичній конференції «Морфогенез органів і тканин під впливом екзогенних факторів» (Алушта, 2013), «Вікові аспекти захворювання кістково-м'язевої системи» (Харків, 2014), «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології (Харків, 2011, 2014), «Захворювання кістково-м'язевої системи та вік (Яремче, 2015) «Морфологічні дослідження – виклики сучасності (Суми, 2015), «Актуальні проблеми ортопедії та травматології» (для молодих вчених) (с. Сновянка, Чернігівська область, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць: 7 публікацій у наукових виданнях України, серед яких 1 включена до міжнародної наукометричної бази даних Web of Science, 6 тез у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, конгресів та симпозіумів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 217 сторінках. Робота містить анотацію, вступ, аналітичний огляд літератури, розділ «Матеріал і методи досліджень», чотири розділи власних досліджень, аналіз й узагальнення результатів, висновки, список використаної літератури з 210 джерел, із яких 27 викладені латиницею та 183 – кирилицею. Робота ілюстрована 29 таблицями та 103 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ВПЛИВ СВИНЦЮ НА ХРЯЦОВУ ТА КІСТКОВУ ТКАНИНИ

Свинець міститься в ґрунті, повітрі та воді. В результаті природного емісії в атмосферу щорічно надходить в середньому 27 тисяч тонн свинцю, однак все ж велика його частина потрапляє в навколишнє середовище в результаті діяльності людини, тобто з антропогенних джерел [44]. Основними антропогенними джерелами викиду свинцю в атмосферу є горновидобувна, металургійна (виробництво кольорових металів і чавуну і сталі) та переробна промисловість, використання етильованої фарби та бензину, спалювання викопного палива на теплоелектростанціях, а також виробництво цементу і спалювання сміття [45]. Приблизно $\frac{3}{4}$ світового використання свинцю задіяне у виготовленні автомобільних акумуляторів. Крім того свинець використовують у виробництві пігментів, фарб, припою, вітражів, кришталю, зброї, керамічної глазури, ювелірних виробів, іграшок, деяких косметичних засобів та традиційних лікарських препаратів. Таке широке використання цього металу призвело до забруднення навколишнього середовища та його впливу на організм людини [7].

Хоча за останній час зафіксовано зниження рівня свинцю в бензині, фарбі, у водопровідно-каналізаційній системі, однак, незважаючи на це, залишаються невирішеними питання щодо відмови від неосновних видів використання свинцю, наприклад в фарбах; забезпечення безпечної рециркуляції відходів, що містять свинець; надання інформації населенню щодо важливості безпечної утилізації свинцево-кислотних акумуляторних батарей і комп'ютерів; контроль над рівнем вмісту свинцю в крові дітей, жінок дітородного віку і робітників [7]. За оцінкою ВООЗ свинець включений в список 10 провідних чинників ризику захворюваності в Україні, що призводять до скорочення тривалості життя у населення [46].

Свинець потрапляє в організм людини переважно з їжею, водою, під час паління та через шкіру. У результаті сучасного зниження вмісту свинцю у атмосфері воду розглядають як головне джерело потрапляння свинцю в організм людини, крім того водорозчинні сполуки свинцю краще абсорбуються, ніж нерозчинні. Всмоктування свинцю у кишково-шлунковому тракті дітей відбувається у 4-5 раз швидше порівняно з дорослими [47]. Таким чином організм дітей є найбільш сприйнятливим до впливу свинцю. Однак при посиленні кісткового ремоделювання, що спостерігається після 50 років, свинець накопичений у кістковій тканині, вивільняється у кров і його негативна дія на організм може зростати [48]. Саме тому навіть за умов зниження рівня свинцю у оточуючому середовищі та відповідно у крові, вміст цього елемента у кістковій тканині залишиться істотним, отже буде зберігатися і його негативний вплив на організм [49, 50].

Більшість фундаментальних досліджень про негативний вплив свинцю, виконаних раніше, стосуються вивчення високих доз свинцю, в той же час вплив свинцю в концентрації, прийнятої за норму (10 мкг/дл, у крові) вивчено недостатньо. Крім того є думка, що безпечного рівня свинцю не існує [6, 51, 52].

У більшості клінічних та експериментальних дослідженнях вивчалася дія свинцю на кісткову тканину у молодому віці, однак останнім часом з'явилися дослідження його впливу на хрящову тканину, та вивчається його дія у похилому віці та на фоні остеопорозу.

Нижче у тексті представлені результати впливу свинцю на кісткову та хрящову тканини.

1.1 Вплив свинцю на хрящову тканину

Існують різні дослідження впливу свинцю на хрящову тканину, в основному на гіаліновий хрящ, зокрема на епіфізарний хрящ, що пов'язано з вивченням впливу свинцю на процес росту кісток. Досліджень, присвячених вивченню впливу свинцю на волокнистий хрящ або на міжхребцевий диск

недостатньо, що обумовлює необхідність проведення подальших досліджень у цьому напрямку.

1.1.1 Вплив свинцю на процес росту та епіфізарний хрящ

Одним з найбільш вивчених та значущих негативних ефектів впливу свинцю на скелет є пригнічення росту у дітей. Проведено чимало клінічних та популяційних досліджень, присвячених вивченню цієї проблеми.

В результаті ретроспективного аналізу даних National Health and Nutrition Examination Surveys II (NHANES II) 1976-1980 рр., проведеного J. Schwartz зі співавторами [53], виявлено зворотний зв'язок між рівнем свинцю в крові, ростом, і окружністю грудної клітини у дітей молодше 7 років. Ці дані підтверджені іншими ретроспективними дослідженнями. Так, у дослідженні проведеному в Греції (522 дитини віком 6-9 років) виявили, що у дітей з рівнем свинцю в крові 10 мкг/дл і вище ріст був менше на 0,86 см (95% ДІ = 0,14, 1,16; $p = 0,020$), а окружність грудної клітки – на 0,40 см (95% ДІ = -0,22, 1,02; $p = 0,0207$) [36]. За даними NHANES II и NHANES III (1998-1994 рр.) вплив свинцю пригнічує ріст кісток незалежно від таких факторів, як якість харчування, соціально-економічний статус чи соматична патологія [35]. Виражений вплив на процес росту свинцевої інтоксикації зафіксовано навіть при невеликій концентрації свинцю в крові – 4 мкг/л [35].

У дослідженні 246 дітей віком 3-8 років, проведеному в Китаї, була виявлена негативна кореляція між зростом, вагою і рівнем свинцю в крові (7,30 мкг/дл), а також позитивна кореляція з вмістом маркерів кісткової резорбції в крові [34]. Наведене дослідження підтверджує, що свинець впливає на ріст скелета навіть при концентрації в крові в межах існуючої норми (до 10 мкг/дл). У дослідженні мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) променевої та ліктьової кісток у 278 дітей віком 6-7 років з рівнем свинцю в крові 6,9 мкг/дл було виявлено 13,7% випадків зниження цього показника [54].

Результати іншого дослідження також підтверджують вплив свинцю на ріст скелета при концентрації його в крові в межах норми [33]. Так, у дослідженні, за участю 349 хлопчиків віком 8-13 років була виявлена негативна кореляція між рівнем свинцю і рівнем інсуліноподібного фактору росту-1 (IGF-1) у сироватці крові. Також було відзначено посилення даної кореляції з віком. На думку авторів такий взаємозв'язок може пояснюватися впливом свинцю на ріст шляхом порушення функціональної активності гіпоталамо-гіпофізарної системи, що виражається в зниженні чутливості гіпоталамуса до соматотропіну [55]. У дослідженні *in vitro* було доведено, що свинець блокує приєднання соматоліберина, що синтезується гіпоталамусом, до рецептора в гіпофізі, порушуючи, таким чином, синтез соматотропіна, який впливає на синтез IGF-1 [56]. В дослідженні на щурах також спостерігалось зниження рівня IGF-1 в сироватці крові під впливом свинцю [57].

У дослідженні *in vitro* M.J. Zuscik зі співавторами [58] оцінили вплив свинцю на мезенхімальні стовбурові клітини зачатків кінцівок плодів мишей лінії C57/B6 за умов наявності або відсутності у культурі клітин таких речовин, як BMP-2 (50 нг/мл) і TGF- β (5 нг/мл). Встановлено посилення хондрогенезу на 3 день впливу свинцю, що виражалось у збільшенні формування хрящових вузликів в 2 рази при концентрації свинцю 1 μ M, і в 3 рази – при 10 μ M. При концентрації свинцю 1 μ M в присутності BMP-2 хондрогенез посилювався в 4,5 рази, а з TGF- β – в 3 рази, що вказувало на те, що свинець збільшує дію цих двох факторів росту на індукування процесу хондрогенезу. Також свинець індукував експресію агрекана, колагену II типу і транскрипційного фактору Sox9. *In vivo* виконали моделювання ектопічного формування кісткової тканини у мишей C57/B6 віком 6 тижнів, яким давали розчин ацетату свинцю (50 і 230 мг/л) в якості питної води протягом 6 тижнів. На термін проведення операції, вміст свинцю у сироватці крові склав 15 та 40 мкг/дл, відповідно. Ектопічне формування кісткової тканини моделювали шляхом внутрішньом'язового введення субстрату, насиченого

клітинами C9, які експресують BMP-2 і отриманими в результаті культивування мезенхімальних стовбурових клітин C3H10T1/2. При цьому в праву кінцівку ввели C9 клітини, а в ліву – C3H10T1/2, в якості негативного контролю. У дослідженні *in vivo* хондрогенез був виявлений в кінцівці з клітинами C9 на 5 день, тоді як в кінцівці з клітинами C3H10T1/2 цього не було виявлено. Площа хрящової тканини в кінцівці з клітинами C9 під впливом свинцю (230 мг/л) також була більше. Дані *in vivo* дослідження підтверджують, що свинець підсилює дію BMP-2 на хондрогенез дозозалежним чином.

У більш ранньому дослідженні цих же авторів епіфізарного хрящу курчат було виявлено, що свинець і TGF- β схожим чином пригнічують експресію колагену X типу, який є маркером зрілості хондроцитів [37]. Однак при поєднанні TGF- β і свинцю цього не спостерігається. Поєднання TGF- β і свинцю індукує експресію BMP-6, чого не відбувається при впливі цих факторів окремо. Таким чином, вплив свинцю на хондрогенез і диференціацію хондроцитів частково залежить від присутності TGF- β . У іншому дослідженні *in vitro* хондроцитів епіфізарного хряща було встановлено, що свинець змінює фенотип хондроцитів, при цьому пригнічується проліферація клітин, знижується експресія і біосинтез колагену II та X типу [27]. Свинець також впливає на мембрани органел хондробластів, що сприяє пригніченню внутрішньоклітинних метаболічних процесів, а саме знижується вміст глікогену, пригнічується метаболізм сульфатованих протеогліканів і біосинтез глікозаміногліканів. Проникаючи в хондробласти свинець пригнічує їх проліферацію, тим самим сповільнюючи ріст [59].

Крім того було виявлено особливості впливу свинцю на ріст щурів в залежності від статі. За результатами дослідження Ronis M.J. зі співавторами [28] скелет самців 9-тижневих щурів більш чутливий до впливу свинцю, ніж скелет самок в період інтенсивного росту при статевому дозріванні.

Отримані дані узгоджуються з результатами дослідження про більш виражений ефект свинцю на ріст самців щурів в цей період розвитку [57].

Одним з факторів, що впливають на ріст кісток, є адекватне надходження поживних речовин в організм. В одному з досліджень було виявлено, що вплив свинцю викликає зниження апетиту шляхом впливу на рецептори в шлунково-кишковому тракті, що призводить до пригнічення росту у молодих щурів на 17 % [60].

В експериментальних дослідженнях впливу свинцю на епіфізарний хрящ стегнової кістки щурів було встановлено зниження висоти епіфізарного хряща та порушення мінералізації хрящового матриксу [29, 30]. Escribano A.C. зі співавторами [15] виявили зниження висоти 5-го тіла хребця поперекового відділу хребта у самок щурів віком 2,5 місяці в умовах свинцевої інтоксикації. Ці результати свідчать про можливий негативний вплив даного елемента на ріст не тільки довгих кісток, але і формування хребетного стовпа у щурів.

Таким чином, свинець навіть за нормальної концентрації в крові впливає на епіфізарний хрящ, викликаючи пригнічення росту скелету у дітей різного віку. Серед системних процесів, які можливо задіяні у механізмі впливу свинцю на пригнічення процесу росту, називають порушення функціонування системи гіпоталамус-гіпофіз, що викликає пригнічення синтезу соматотропіну. У експериментальних дослідженнях встановлено, що вплив свинцю призводить до зниження висоти епіфізарного хряща у довгих кістках, що викликано пригніченням проліферації клітин, затримкою дозрівання хондроцитів, що в свою чергу може викликати порушення мінералізації хрящового матриксу. Однак повністю механізм дії свинцю на епіфізарний хрящ не з'ясований. При цьому свинець накопичується в скелеті, має можливість, виділяться в кров протягом подальшого життя і впливати на весь організм в цілому. Інтоксикація свинцем в дитинстві перешкоджає досягненню піку кісткової маси, що може провокувати виникнення остеопорозу в майбутньому.

1.1.2 Вплив свинцю на суглобовий хрящ

Дослідженню впливу свинцю на суглобовий хрящ присвячено значно менше робіт у порівнянні з епіфізарним хрящем, проте в останнє десятиліття інтерес до даної проблеми зріс, внаслідок збільшення числа захворюваності на остеоартроз.

Проведено декілька клінічних досліджень присвячених вивченню накопичення свинцю у великих суглобах людини. Згідно з даними цих досліджень у людини в суглобовому хрящі свинець накопичується в зоні лінії tidemark [38, 61], крім того його концентрація в цій зоні тісно пов'язана з концентрацією цинку, і не залежить від концентрації кальцію і стронцію. Слід зазначити, що вміст свинцю в даній частині суглобового хряща був в 13 разів більше, ніж у субхондральній кістці, що, на думку авторів, пов'язано з більш високою метаболічною активністю хондроцитів в зоні лінії tidemark. У іншому дослідженні в зоні лінії tidemark було виявлено, що вміст свинцю в сформованій давно ділянці лінії tidemark в 2,6 рази вище, ніж в сформованій нещодавно [39]. При цьому вміст свинцю вище в 35 разів в сформованій раніше ділянці лінії tidemark, і в 12 разів – в сформованій нещодавно ділянці, в порівнянні з вмістом в кістці, тобто зона лінії tidemark може виступати джерелом свинцю у випадку її руйнування.

У дослідженні вмісту свинцю у післяопераційному матеріалі, отриманому під час тотального ендопротезування кульшових суглобів пацієнтів з діагностованим коксартрозом, було виявлено, що найбільший вміст свинцю міститься в субхондральній губчастій і компактній кістковій тканині головки стегнової кістки (0,75 мг/г), а найменшу кількість виявили в капсулі кульшового суглоба – 0,19 мг/г Також авторами була виявлена статистично значуща кореляція між вмістом кальцію і свинцю в суглобовому хрящі, що може вказувати на залучення обох елементів в процес патологічної перебудови хряща при коксартрозі [40]. Крім того нещодавно встановлено, що вміст свинцю у суглобовому хрящу при остеоартрозу є вищим, ніж у дегенеративному міжхребцевому диску [43].

Існують певні дані щодо впливу свинцю на суглоби у робочих на ливарних виробництвах. Так, тривале перебування під впливом свинцю корелює з частотою випадків болю в суглобах [62]. Крім того виявлено зниження ширини суглобового хрящу у чоловіків з професійним впливом свинцю [63]. Також встановлено взаємозв'язок у випадках вогнепальних поранень, коли кулі залишалися в організмі, і наявністю дегенерації суглобового хряща [64, 65].

Згідно з даними клінічного дослідження проведеного А.Е. Nelson зі співавторами [41] існує кореляція між рівнем свинцю в сироватці крові жінок і рівнем в сечі біомаркерів кальцифікації хряща і кісткового метаболізму (перехресно зв'язаним N-телопептидом колагену I типу (uNTX-I), C-телопептидом колагену II типу в сечі (uCTX-II), і олігомерним білком матриксу хряща (COMP)). Тоді як у чоловіків встановлено кореляцію з рівнем uCTX-II, COMP та C-телопептидом колагену II типу (CPII). При цьому рівень свинцю в крові у учасників дослідження знаходився в межах норми: 2,2 мкг/дл – у чоловіків і 1,9 мкг/дл – у жінок. Ці дані вказують на існування взаємозв'язку між розвитком остеоартрозу і рівнем свинцю в крові, а також на наявність гендерних відмінностей впливу свинцю на рівень біомаркерів кісткового і хрящового метаболізму. В іншому дослідженні (Johnston County Osteoarthritis Project) також була виявлена кореляція між наявністю гонартроза (за рентгенологічними ознаками) і рівнем свинцю в крові чоловіків та жінок [42].

Для виявлення механізмів впливу свинцю на суглобовий хрящ проводили окремі експериментальні дослідження *in vivo* та *in vitro*. М.І. Zuscik зі співавторами [66] виявили, що дія свинцю на суглобові хондроцити виражається в набутті ними більш примітивного фенотипу, їх гіпертрофії, деградації суглобового матриксу та формуванні осередків його мінералізації, а також пригніченні сигнального шляху фактору некрозу пухлин- β (TGF- β). Як відомо сигнальний шлях TGF- β в суглобових хондроцитах забезпечує стабільний стан фенотипу і метаболічні функції, такі як біосинтез колагену II

типу, формування колагенових волокон і глікозаміногліканів в суглобовому хрящі, і пригнічення синтезу колагену X типу і ферментів, які беруть участь в деградації матриксу [67].

У *in vivo* дослідженні вивчали вплив свинцю на суглобовий хрящ курчат, які отримували розчин ацетату свинцю в питній воді в концентрації 50 мг/л на протязі 18 місяців, при цьому концентрація свинцю в сироватці крові протягом експерименту складала 9 мкг/дл [67]. В результаті було виявлено, що вплив свинцю в концентрації 50 мг/л викликає зниження концентрації протеогліканів, колагену II типу та збільшення колагену X типу в поверхневій зоні суглобового хряща, а також збільшення кількості ушкоджень і фібриляцію суглобової поверхні на 22,2 % в порівнянні з контролем. Крім того встановили порушення функціонування TGF- β сигнального шляху, про що свідчило зниження вмісту P-Smad 3 в хрящі. Автори припускають, що, так як свинець міститься в синовіальній рідині і субхондральній кістці, то він може впливати на суглобовий хрящ [67].

Дослідження *in vitro* впливу різних концентрацій свинцю (0,08-10 μ M) було проведено на хондроцитах ізольованих з суглобових поверхонь стегнової і великогомілкової кісток курчат віком 4-6 тижнів протягом доби. При дослідженні дії свинцю на хондроцити в концентрації 10 μ M не було виявлено зміни життєздатності клітин, однак спостерігалось зниження в 5 разів синтезу колагену II типу, і збільшення в 35 разів синтезу колагену X типу у порівнянні з контролем [67]. Встановлено, що вплив свинцю викликає дозозалежне зростання в 2-4 раза активності ферментів MMP13, які беруть участь в деградації хрящового матриксу. Активація каспази3 в хондроцитах в пробірці збільшилася на 15 % за умов впливу свинцю в концентрації 0,08 μ M, на 20% – при 2 μ M, на 30 % – при 10 μ M, подібним чином зростала активація каспази 8. Виявлено пригнічення шляху TGF- β на 80 % при концентраціях свинцю 0,08 μ M, і на 93 % – при 10 μ M.

Результати цього дослідження свідчать, що свинець у таких низьких концентраціях (у дослідженні *in vitro*) не викликає загибелі клітин, однак

порушує їх здатність до біосинтезу компонентів матриксу та підвищує активність ферментів, що призводить до деградації хрящового матриксу. А також викликає такі зміни в суглобовому хрящі і в експресії білків, які спостерігаються у разі енхондральної осифікації в умовах остеоартрозу [67]. Дане дослідження підтверджує, що свинець пригнічує TGF- β шлях, що призводить до підвищення біосинтезу колагену X типу, який є маркером гіпертрофії хондроцитів, та пригнічує синтез протеогліканів та колагену II типу, які є основними компонентами хрящового матриксу. Проте механізми впливу свинцю на цей процес до кінця не з'ясовані.

1.2 Вплив свинцю на кісткову тканину

Відомо, що свинець накопичується в скелеті в процесі розвитку і локалізується в зонах мінералізації та росту кісток [30, 68]. Згідно з даними наукової літератури вплив свинцю на організм дітей після його кумуляції в кістках триває в період статевого дозрівання внаслідок її ремоделювання. Інші дослідження показали, що у матерів зі свинцевою інтоксикацією свинець починає накопичуватися вже у кістках плоду. В експериментальних дослідженнях доведено, що свинець швидко проникає через плаценту, і обумовлює деформацію скелета у мишей, щурів і хом'яків [69]. При нестачі кальцію в їжі, вплив свинцю посилюється, і може призводити до затримки осифікації плода.

1.2.1 Особливості накопичення свинцю в кістковій тканині

Розгляд особливостей накопичення свинцю в організмі людини є важливим для з'ясування періодів в житті людини, в яких збільшується ризик впливу цього елемента.

Існує два основних шляхи абсорбції свинцю – споживання свинцю з їжею, водою та під час дихання [70-72]. Абсорбція свинцю з їжею залежить від виду хімічних сполук свинцю, при цьому наявність в дієті таких катіонів, як залізо і цинк, а також жирів в раціоні знижує абсорбцію свинцю [73], тоді

як вживання води з високим вмістом фтору сприяє акумуляції свинцю в кістковій тканині [74]. На молекулярному рівні свинець з'єднується з багатьма протеїнами, особливо з тіольною і карбоксильною групами, та імітує кальцій в багатьох метаболічних процесах [75, 76]. Відомо, що свинець може впливати на клітинну систему вторинних посередників, шляхом заміщення в ній іонів Ca^{2+} , які є поширеним вторинним посередником. Рівень кальцію у клітині забезпечується потраплянням іонів кальцію внаслідок відкриття кальцієвих каналів, чи у результаті вивільнення внутрішньоклітинного кальцію, накопиченого у ендоплазматичній сітці. Позаклітинний кальцій після входження у клітину після деполяризації мембрани, викликаної G-білком, зв'язується з кальмодуліном. Однак, свинець має більшу спорідненість до зв'язування з кальмодуліном та утворює більш міцний зв'язок з цим білком, але причина цього маловивчена. Конформація кальмодуліну у випадку приєднання кальцію стимулює різні функції клітини, такі як запалення, метаболізм, апоптоз, скорочення гладкої мускулатури, внутрішньоклітинний тиск та інші. Отже у разі приєднання свинцю постає проблема опосередкованого впливу свинцю на ці процеси внаслідок зміни структури кальмодуліну [77]. Крім того свинець блокує кальцієві канали, кальцій-натрієвий насос та конкурує з кальцій-зв'язуючим білком [78].

Впродовж доби близько 15 % циркулюючого в крові свинцю вбудовується в структуру кісткової тканини [76], де він заміщає кальцій в гідроксилапатиті в процесі мінералізації кісткової тканин. Більша частина свинцю (90-95 %) у дорослих накопичується в кістках і виділяється в кров і навколишні м'які тканини, а з віком його концентрація в тканинах зростає [79, 80]. Близько 70 % в організмі свинцю міститься у компактній кістковій тканині [81]. В компактній кістковій тканині період напіврозпаду складає десятиліття, а в губчастій кістковій тканині – від року до десяти [82, 83]. У здорових чоловіків період напіврозпаду свинцю в великогемілковій кістці становить 27 років [84].

Надходження свинцю в кістку забезпечується остеобластичною активністю, тоді як остеокластична – вивільняє його в кров. У жінок середньої вікової групи свинець, накопичений в кістках, може виділятися в кров в процесі нормального ремоделювання кістки, в періоди посиленої резорбції кістки при певних захворюваннях (наприклад, при гіпертиреозі), а також протягом вагітності і лактації [85-88]. При цьому кістка виступає джерелом свинцю навіть за відсутності забруднення навколишнього середовища. [89]. Також є дані про можливість накопичення свинцю у кістковому мозку [76].

Одним із можливих механізмів накопичення свинцю у клітинах є те, що кальцієві канали Ca^{2+} - K^{+} мають більш високу чутливість і проникність до іонів Pb^{2+} , а не до іонів Ca^{2+} майже у 10 разів порівняно з йонами кальцію [77]. Мітохондрії є місцями накопичення іонів Ca^{2+} в клітині. На внутрішній мембрані вони мають переносники іонів Ca^{2+} для перенесення їх із цитоплазми в мітохондріальний матрикс. Свинець пригнічує таке накопичення іонів Ca^{2+} , що доведено в експериментальних дослідженнях на ізольованих мітохондріях і на зрізах тканини.

На накопичення свинцю в кістковій тканині можуть впливати цинк та стронцій. Так, при дослідженні головок стегнових кісток людини, найбільший вміст свинцю, як і цинку, було виявлено в цементних лініях кісткової тканини [90]. Рівень свинцю та стронцію помітно зростає зі ступенем мінералізації матриксу. Накопичення свинцю в цементних лініях пов'язують або з його вбудовою в структуру гідроксилапатиту, або з приєднанням до остеокальцину, який більш сприйнятливий до приєднання свинцю порівняно з кальцієм, навіть при низьких концентраціях свинцю [91, 92]. Також встановлено, що вплив свинцю призводить до зниження розміру та довжини с-вісі (с-axis) кристалів гідроксилапатиту [78]. Крім того, дія свинцю призводить до перерозподілу мінерального складу у компактній кістковій тканині молодих щурів, а саме до збільшення вмісту карбонатів, що звичайно відбувається за умов старіння [93].

Є дані про накопичення свинцю в зубах. Так, J.D. Arruda-Neto зі співавт. [94] виявили, що у дітей віком 5-10 років вміст свинцю на 30 % більше в молярах уражених карієсом, ніж у здорових зубах. Ці дані, можуть вказувати на те, що свинець призводить до дестабілізації структури кісткової тканини, внаслідок чого зростає чутливість зубів до захворювання карієсом. Також свинець називають фактором ризику втрати зубів у дорослих [95].

Встановлено, що вміст свинцю в кістковій тканині залежить від раси [96]. Так, в дослідженні, яке включало 1140 учасників віком 50-70 років, було виявлено, що в афроамериканців вміст свинцю у великогомілковій кістці на 28 % вище, ніж у представників європеїдної раси. Рівень свинцю в крові у обстежених склав 3,5 мкг/дл.

У кількох дослідженнях проведено оцінку кількості свинцю в крові жінок, що знаходилися в зонах підвищеного вмісту свинцю, та виявлено, що вік, куріння, тривалість годування грудьми і кількість вагітностей є факторами, що провокують виділення свинцю з кісток [89, 97-99]. Паління також є предиктором для накопичення свинцю в кістках у чоловіків, ймовірно за рахунок свинцю, що міститься в сигаретах [100].

У дослідженні на щурах лінії Вістар дослідники вивчили ступінь накопичення в кістках різних сегментів скелета в залежності від віку тварин за допомогою рентгенівського флуоресцентного аналізу [101]. Автори виявили, що максимальне накопичення свинцю в скелеті щурів відбувається в таких кістках: череп, стегова, великогомілкова і клубова кістки, а швидкість цього процесу уповільнюється з віком.

При дослідженні впливу ацетату свинцю (30 мг/л) на вагітних щурах лінії Wistar протягом всієї вагітності і подальшого впливу на їх новороджених самців протягом 28 або 60 днів після народження було виявлено 5-кратне збільшення вмісту свинцю в великогомілковій кістці тварин 60-денної групи в порівнянні з 28-денними, тоді як в крові подібних відмінностей не було виявлено [102]. Ці результати та результати клінічного

дослідження підтверджують, що кістка є більш надійним показником вмісту свинцю в організмі [103].

1.2.2 Вплив свинцю на рівень кальцитропних гормонів

Для вивчення дії свинцю на кісткову тканину на системному рівні було проаналізовано наукову літературу щодо його впливу на кальцитропні гормони.

За даними Doumouchtsis К.К. зі співав. [55] дія свинцю змінює рівень кальцитропних гормонів (вітамін Д, кальцитонін, глюкокортикоїди (альдостерон). Доведено, що рецептори вітаміну D (VDR) беруть участь у абсорбції та накопиченні свинцю в організмі [104], а генетичний поліморфізм цього рецептору може змінювати чутливість людини до дії свинцю [105].

У кількох дослідженнях було виявлено значний вплив свинцю на рівень вітаміну D, який необхідний для нормального росту і мінералізації кістки у дітей. Спостерігали стійку негативну кореляцію між рівнем циркулюючого 1,25-дигідроксिवітаміну D₃, і рівнем свинцю в крові у дітей [69]. Рівень 1,25-дигідроксивітаміну D₃ в плазмі у дітей з інтоксикацією свинцем був знижений до рівня, порівнянного з таким у пацієнтів з метаболічними захворюваннями кістки, уремією і гіпотиреозом.

Клінічні спостереження, підтверджуються експериментальними дослідженнями, в яких встановлено зниження в плазмі крові рівня 1,25-дигідроксивітаміну D₃ у щурів при вживанні ними в їжі 0,82 % ацетату свинцю [106].

У дітей, які зазнали впливу свинцю, знижений рівень остеокальцину в плазмі крові, що може бути пов'язано зі зниженням циркулюючого 1,25-дигідроксивітаміну D₃; підвищенням деградації остеокальцину або зниженням його біосинтезу остеобластами [107]. У дослідженні *in vitro* на остеобластоподобних клітинах щурів (культура штаму ROS 17/2,8) було підтверджено, що свинець знижує рівень 1,25-дигідроксивітаміну D₃, який стимулює біосинтез остеокальцину.

Перехресне дослідження працівників з інтоксикацією свинцем, виявило кореляцію між впливом свинцю і рівнем циркулюючого паратиреоїдного гормону, який регулює рівень кальцію в сироватці крові і кісткову резорбцію [108].

Також відомо про вплив свинцю на щитовидну залозу шляхом дії на метаболізм тироксину або на зв'язуючий його протеїн. У недавньому популяційному дослідженні, проведеному в США, було виявлено, що рівень свинцю ($1,52 \pm 1,20$ мкг/дл) в крові негативно корелює із загальним рівнем тироксину, проте немає значимої кореляції ні з тироксин-стимулюючим гормоном, ні з загальним або вільним трийодотироніном, ні з вільним тироксином. Ці результати, на думку авторів, вказують на те, що даний рівень свинцю в крові може не впливати на функцію щитовидної залози, проте знижує рівень тироксин-зв'язуючих пептидів [109].

Отже вплив свинцю викликає зниження рівня 1,25- дигідроксिवітаміну D3 та остеокальцину у дітей, а також підвищує рівень паратиреоїдного гормону у дорослих з професійною інтоксикацією свинцем.

1.2.3 Вплив свинцю на остеобласти, остеокласти, остеоцити та мезенхімальні клітини кісткового мозку

Функціонування кісткової тканини забезпечується остеобластами, які її формують, та остеокластами, що виконують резорбцію. Саме тому є важливим аналіз наукової інформації щодо впливу свинцю на ці клітини.

У *in vitro* дослідженні було проаналізовано вплив свинцю на остеобласти і остеокласти мишей лінії C57/B6 [25]. Остеобласти культивували із клітин кісткового мозку великогомілкової кістки, а остеокласти – із спленоцитів селезінки мишей, які піддавалися впливу ацетату свинцю (230 мг/л) протягом 6 тижнів. Автори виявили, що після впливу свинцю відбувається пригнічення остеобластогенеза, що, на їх думку, з пов'язано зі зменшенням кількості остеогенних клітин-попередників. Ці дані були підтверджені результатами дослідження впливу ацетату свинцю на

мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку мишей. Було встановлено, що дія свинцю викликає апоптоз, а також порушує функції мітохондрій, збільшує експресію Вах, каспази 3 і каспази 9, і активує Р53 [110]. У той же час не було виявлено негативного впливу свинцю на остеокластогенез [25]. Однак у іншому дослідженні у разі поєднання впливу свинцю на молодих щурів з дієтою з високим вмістом жирів було встановлено підвищення кількості активних остеокластів [111].

В іншому недавньому дослідженні *in vitro* на мезенхімальних стовбурових клітинах людини, отриманих з гребеня клубової кістки, було відзначено, що вплив свинцю в різних концентраціях (10-160 μM) протягом доби викликає пригнічення остеобластогенеза, що підтверджує дані про вплив свинцю на остеобласти [112].

In vitro дослідження Е.Е. Веіер зі співавт. [26] також підтверджує негативний вплив низьких концентрацій свинцю (0,8-5 μM) на остеобластогенез в культурі клітин-попередників, які отримані із склепіння черепа 3-денних щурів. Автори виявили зниження кількості сформованих кісткових вузликів, зниження експресії колагену I типу, лужної фосфатази та остеокальцину. Також спостерігали скорочення зниження преостеобластичних транскрипційних факторів – бета-катеніну, Runx2 і остерікса, а експресія склеростину навпаки зросла.

У *in vitro* дослідженні на культурі остеобластів щурів Sprague Dawley було виявлено, що вплив свинцю у концентрації 0-80 μM викликає апоптоз клітин дозозалежним шляхом, що пов'язано, на думку дослідників, зі встановленим збільшенням концентрації внутрішньоклітинного кальцію, накопичення якого і активує сигнальний шлях апоптоза [32].

Мікроскопічні дослідження свідчать, що остеокласти більш чутливі до дії свинцю, ніж остеобласти [69]. Вонуссі Е. зі співавт. [113] виявили, що при отруєнні свинцем зменшується кількість остеокластів, їх розміри, при цьому в клітинах спостерігається каріопікноз, а остеокласти розташовуються відокремлено від кісткового матриксу. Свинець накопичується в цитоплазмі і

ядрах остеокластів у вигляді включень. Присутність таких включень в клітинах, можливо, пояснює вплив свинцю на них.

Остеокласти можуть піддаватися більшій інтоксикації свинцем в процесі їх резорбційної активності [69]. Свинець здатний взаємодіяти з вуглецьвмісною ангідразою II і Na^+ , K^+ -АТФазою в результаті чого знижується кислотність у позаклітинному просторі, оптимальна для активності кислих гідролаз остеокластів, і, таким чином, порушується процес кісткової резорбції.

У дослідженні з використанням високих доз свинцю (500 мг/л у питній воді та вище) у молодих мишей було встановлено збільшення кількості остеокластів, але пригнічення їх активності [31]. В іншому дослідженні свинець (50 μM) викликав підвищення резорбційної активності остеокластів в органній культурі [114].

У недавньому дослідженні на самках щурів, на яких впливали ацетатом свинцю (50 мг/л у питній воді) відповідно до його впливу в навколишньому середовищі, отримали нові дані про стан кісткової тканини після тривалої дії свинцю (18 місяців) [26]. Виявлено зниження кількості остеобластів і скорочення кількості ділянок хрящової тканини в кісткових трабекулах великогомілкової кістки під впливом свинцю, що свідчило, на думку авторів, про пригнічення формування кісткової тканини. Апоптоз остеоцитів в губчастій і компактній кістковій тканині не спостерігали під впливом свинцю, а число остеокластів на поверхні трабекул не відрізнялося від контролю. Цікавою особливістю було збільшення на 52 % кількості адипоцитів в кістковому мозку після впливу свинцю. Для вивчення причин пригнічення формування кістки і посилення адипоцитоза автори досліджували експресію склеростіна і Runx2, маркерів зрілих остеобластів і остеоцитів, бета-катеніну, що міститься у остеогенних клітинах-попередниках. Виявлено, що у тварин після тривалого впливу свинцю зростала експресія склеростину в остеоцитах і матриксі губчастої кісткової тканини епіфізів великогомілкової кістки; знижувалася частота та

інтенсивність експресії бета-катеніну і Runx2 в клітинах-попередниках. На думку авторів порушення експресії цих білків вказує на пригнічення Wnt-шляху, який є одним з активних анаболічних шляхів у кістковій тканині, і регулює метаболічну активність остеобластів і остеобластогенез. Таким чином, тривалий вплив свинцю навіть у концентрації, яка вважалася раніше безпечною, може призводити до остепенічних змін в кістці.

У зв'язку з тим, що вплив свинцю *in vivo* та *in vitro* у мишей викликає підвищення рівня склеростину, білку, що пригнічує Wnt-шлях та формування кісткової тканини шляхом пригнічення остеобластогенезу. У недавньому дослідженні на мишах, у яких відсутній ген, який експресує склеростин, автори виявили посилення кісткової резорбції внаслідок впливу свинцю. Так, терапія глюкокортикоїдами викликає підвищення як кісткової резорбції, так і рівню склеростину [115], тож склеростин можливо впливає на остеокласти через механізм, який потребує дослідження [116]. З огляду на це Veier E.E. зі співавторами [117] припускають, що свинець впливає на кісткову тканину через той самий шлях, що і склеростин, можливо діючи на остеокласти.

1.2.4. Вплив свинцю та остеопороз

Свинець може відігравати важливу роль у етіології остеопорозу, шляхом порушення ремоделювання кісткової тканини [118].

Після 40 років у жінок спостерігається швидша втрата кісткової маси порівняно з чоловіками, що може привести до зниження МЦКТ більш ніж на 50 % у віці 80 років [96]. Після менопаузи швидкість втрати кістки зростає в чотири рази, в перименопаузальний період її втрата складає в середньому від 0,5-1 % щорічно, а після менопаузи – до 2-3% щорічно. На думку М. Роровіс зі співавторами [99] менопауза є головним фактором, що впливає на метаболізм свинцю в кістковій тканині.

Дослідження підтвердили, що зміни кісткового обміну, які відбуваються з віком, можуть також впливати на кінетику свинцю в крові і кістковій тканині [18, 48, 96, 119]. Це може призводити до вивільнення

великої кількості свинцю з кісток і збільшувати його накопичення в критичних органах-мішенях, таким чином, збільшуючи ризик виникнення захворювань, пов'язаних з отруєнням свинцем [96].

Ранній вік менопаузи є фактором ризику для виникнення переломів. У недавньому дослідженні була вивчена наявність взаємозв'язку між раннім настанням менопаузи і накопиченим протягом життя свинцю (411 пацієнток, вік менопаузи $50,8 \pm 3,6$ років) [23]. Згідно з отриманими результатами в групі жінок з менопаузою, що настала до 45 років і великим рівнем свинцю в кістці, менопауза наступила на 5,3 років раніше (95% ДІ; 1,42, 19,78) в порівнянні з пацієнтками з меншим рівнем свинцю в кістковій тканині. Тоді як у жінок з більш високим вмістом свинцю в великогомілкової кістки вік настання менопаузи був на 1,21 рік менше (95% ДІ; -2,08, -0,35), ніж у пацієнток з меншим вмістом свинцю в кістки. При цьому не було виявлено кореляції між вмістом свинцю в наколіннику, сироватці крові і віком настання менопаузи. Дане дослідження підтверджує, що свинець, накопичений протягом життя, може чинити опосередкований вплив на кісткову тканину, викликаючи передчасне настання менопаузи. А саме, свинець вивільняється у кров, внаслідок резорбційної активності остеокластів, викликаючи підвищення його рівня у крові та діючи на яєчники.

Вплив свинцю на раннє настання менопаузи навіть при низькій концентрації в крові підтверджено в ще одному дослідженні, в якому взяли участь 3221 жінки віком 45-55 роки [24].

Дослідження М. Роровіс зі співав. [99] показали, що свинець може викликати передчасну менопаузу у жінок, які потрапляли під вплив високих доз свинцю на виробництві, таким чином, підвищуючи ризик більш раннього зниження МЦКТ.

Silbergeld E.K. зі співав. [85] вивчили рівень свинцю у 2981 жінки, використовуючи базу даних NHANES II за 1976-1980 рр., і визначили у них підвищення після менопаузи рівня свинцю в сироватці крові. Ці результати

показали, що кістка не є інертним накопичувачем свинцю. А також те, що свинець може взаємодіяти з іншими чинниками, що викликають постменопаузальний остеопороз, так як відомо, що свинець пригнічує активацію вітаміну D, надходження кальцію з їжею, і впливає на деякі аспекти регуляції функції клітин кістки.

Згідно з аналізом бази даних NHANES 1999-2002 рр. проведеним Jackson L. зі співав. [120] у пременопаузальному і постменопаузальному періоді підвищується рівень свинцю в крові, що пов'язано зі збільшенням темпу ремоделювання кістки, тоді як присутність в дієті кальцію і вітаміну D зменшує концентрацію свинцю в крові.

У ретроспективному дослідженні (Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2008-2011 рр.) виявлено, що підвищення рівня у крові свинцю позитивно корелює з низькою мінеральною щільністю серед жінок постменопаузального віку ($n = 2429$) [121]. На думку авторів, це пов'язано з дією свинцю на нирки, що порушує мальабсорбцію кальцію, а також викликає дефіцит заліза, та в свою чергу призводить до посилення абсорбції важких металів.

Необхідно відзначити, що у молодих жінок і жінок пременопаузального віку накопичення свинцю відбувається активніше, а його виділення в кров повільніше, ніж у чоловіків, тоді як у жінок після менопаузи ця відмінність зникає [99]. Підвищення рівня свинцю в крові жінок пременопаузального віку супроводжується збільшенням вмісту маркерів кісткового метаболізму в крові, таких як N-телопептиду колагену I типу (NTx), кістково-специфічної лужної фосфатази і остеокальцину, що свідчить про збільшення виділення свинцю в кров при активному ремоделюванні кісткової тканини в даному періоді [122]. Однак у недавньому дослідженні, в яке було включено 248 жінок віком 18-44 роки автори не виявили кореляції між рівнем свинцю в крові (0,86 мкг/дл) і показником МЦКТ [123], що пов'язано з низьким рівнем ремоделювання кістки.

Khalil N. зі співав. [20] виявили, що свинцева інтоксикація може збільшувати ризик нехребетних переломів шляхом впливу на мінеральну щільність кістки і за рахунок порушення нервово-м'язової функції індивідуумів, призводячи до падінь. У проведеному перехресному дослідженні (5994 чоловіків віком $79,5 \pm 5$ років) Khalil N. та ін. [124] вперше підтвердили існування негативної кореляції між низьким рівнем свинцю в крові ($2,25 \pm 1,20$ мкг/дл), МЩКТ шийки стегнової кістки та загальним МЩКТ стегнової кістки.

Аналогічні результати отримані у дослідженні за участю жінок постменопаузального віку (76 ± 8 років). Було встановлено негативну кореляцію між рівнем свинцю у великогомілковій кістці, товщиною кортекса та загальним МЩКТ, що свідчить про негативний вплив свинцю на кісткову тканину у жінок цієї вікової групи [125]. Також було виявлено негативну кореляцію між рівнем впливу свинцю у 17 років та показником МЩКТ у віці старше 50 років на основі аналізу бази даних NHANES III. Це підтверджує, що дія свинцю може бути предиктором остеопорозу [17].

За даними дослідження, проведеного Sun Y. зі співав. [126], вплив свинцю на робочих фабрики з виробництва батарей викликає зниження кісткової маси. В даному дослідженні взяли участь 191 чоловік і 58 жінок. Виявили, що вираженість ознак остеопорозу зростає з підвищенням рівня свинцю в сечі ($P < 0,01$), а також достовірну кореляцію між підвищеним рівнем свинцю в крові і вираженістю остеопорозу ($P < 0,01$). Це свідчить про наявність дозо-залежного взаємозв'язку між рівнем свинцю і вираженістю остеопорозу. Результати іншого дослідження також підтверджують наявність зниження кісткової маси у таких працівників [127]. Раніше Sun Y. зі співавторами [19] виявили, що за умов свинцевої інтоксикації знижується мінеральна щільність кістки і збільшується частота компресійних переломів у поперековому відділі хребта.

Дослідження на тваринах продемонстрували, що збільшення впливу свинцю пов'язано зі зниженням МЩКТ [15, 127, 128] та її міцності [16, 28].

Крім того встановлено зниження МЩКТ на 4,7% у стегновій кістці самок щурів у разі використання невеликих доз свинцю (50 мг/л) але протягом тривалого часу (18 місяців) [26]. Крім того, спостерігали зниження на 56 % об'єму губчастої кістки у великогомілкової кістці. Авторами також доведено зниження міцності тіла хребця L_{IV} і стегнової кістки.

В іншому дослідженні, проведеному на самках мишей лінії C57/BL6 віком 2 місяці, тварини отримували ацетат свинцю (250 мг/л у питній воді) протягом 4 місяців [22]. Після впливу свинцю у тварин спостерігали зниження МЩКТ у діяфізі та метафізі стегнової кістки, збільшення медулярного каналу діяфіза, зниження міцності кістки, скорочення показника співвідношення мінерали/матрикс в періості і зниження зрілості колагенових волокон. При цьому рівень вмісту остеокальцину в кістковій тканині не відрізнявся від контролю, тоді як в сироватці крові його рівень був підвищений, також як і P1NP (маркер кісткоутворення) і СТХ (маркер резорбції), що вказує, на думку авторів, на інтенсифікацію процесу ремоделювання кісткової тканини під впливом свинцю.

При дослідженні впливу ацетату свинцю (30 мг/л) на вагітних щурах Wistar протягом всієї вагітності і подальшого впливу на їх новонароджених (самців) спостерігали скорочення їх маси тіла на 17 % і маси великогомілкової кістки на 25 % [102], що свідчить про втрату кісткової маси після впливу свинцю.

У дослідженні впливу свинцю на щурах з оваріоектомією було зафіксовано зниження об'єму губчастої кісткової тканини стегнової кістки порівняно з щурами з оваріоектомією без впливу свинцю та інтактними тваринами [21]. Це свідчить про можливе збільшення чутливості до негативної дії свинцю на фоні остеопорозу.

1.2.5 Вплив свинцю на загоєння перелому

З огляду на результати експериментальних досліджень, в яких встановлено, що вплив свинцю викликає зменшення кісткової маси,

важливим є розгляд його впливу на регенерацію кістки, бо як відомо втрата кісткової маси є важливим фактором ризику переломів.

Деякі автори пов'язують наявність патологічних переломів та порушення їх загоєння у собак з накопиченням свинцю у кістковій тканині [130].

У проведеному дослідженні було вивчено впливу ацетату свинцю на загоєння перелому великогомілкової кістки у мишей [131]. Авторами було виявлено пригнічення мінералізації хондроїду, а також скорочення рівня бета-катеніну і підвищення рівня склеростину у регенераті під впливом свинцю. На думку дослідників, причиною є пригнічення свинцем бета-катенин шляху, що в свою чергу призводить до порушення енхондральної осифікації.

Проведено дослідження з впливу ацетату свинцю (в концентрації 230 мг/л протягом 6 тижнів) на загоєння закритого перелому великогомілкової кістки на мишах лінії C57/B6 [25]. Гістологічний аналіз було проведено на 7, 14 і 21 добу з моменту перелому. Виявлено, що під впливом свинцю в регенераті відбувається зниження експресії колагену II типу та підвищення експресії колагену X типу на 7 добу, збільшення площі хрящової тканини в 5 разів на 14 добу в порівнянні з регенератом контрольних тварин. При цьому навіть на 21 добу у мишей цієї групи все ще зберігається хондроїд, тоді як у мишей контрольної групи відбувається формування кісткової тканини. Збереження хрящової тканини в регенераті протягом тривалого часу автори пов'язують з трьома можливими причинами: 1) порушенням механізму апоптозу хондроцитів, 2) низьким рівнем ангіогенезу і 3) пригніченням остеобластогенеза. При цьому пригнічення остеобластогенеза авторами дійсно було підтверджено *in vitro*. Чи викликає вплив свинцю порушення цих трьох процесів в момент процес перебудови хрящової мозолі або тільки на якийсь один залишається невідомо.

Таким чином проблема вивчення впливу свинцю на органи та системи організму є актуальною у зв'язку з цими незворотними порушеннями, які він викликає. Це пов'язано з тим, що свинець накопичується у різних кістках скелету, а також у зубах, особливо в період активного росту та може вивільнятися в період активного ремоделювання кісткової тканини (вагітність, лактація, постменопаузальний період). З огляду на те, що напіврозпад свинцю складає десятиліття, його негативний вплив на організм може бути досить тривалим.

Дослідження останніх років спрямовані на виявлення впливу низьких доз свинцю на метаболічні показники людини, а також дослідження його дії на рівні тканин, зокрема кісткової та хрящової. Вивчення цієї проблеми проводяться у кількох напрямках: у віковому аспекті, в умовах метаболічних захворювань, зокрема на фоні остеоартрозу та остеопорозу, в умовах перелому.

Найбільша кількість досліджень пов'язана з вивченням впливу свинцю на епіфізарний хрящ довгих кісток та, відповідно, процеси росту. Вважають, що зони росту кісток є одними з найбільш чутливих тканин-мішеней для дії свинцю. Доведено, що вплив свинцю навіть у низьких дозах порушує структурну організацію епіфізарного хряща. Стосовно епіфізарного хряща тіл хребців є лише одне дослідження спрямоване на оцінку стану L_v . Фундаментальних досліджень стосовно впливу свинцю на ріст та перебудову тіл хребців недостатньо.

В останні роки в центрі уваги дослідників та клініцистів знаходиться вивчення суглобового хряща в умовах впливу свинцю, так як отримані дані про порушення його структурної організації. Встановлено, що вплив свинцю на епіфізарний хрящ та суглобовий хрящ має схожі та відмінні риси. Встановлено, що в обох випадках свинець викликає порушення функціонування тканин, викликаючи пригнічення росту скелету та розвитку дегенеративних змін у суглобах. Так, у епіфізарному хрящі вплив свинцю призводить до затримки гіпертрофії хондроцитів, пригнічення їх

проліферації, порушення мінералізації хрящового матриксу, що супроводжується пригніченням синтезу колагену X типу, тоді як у суглобовому хрящі під впливом свинцю спостерігається гіпертрофія хондроцитів, посилення синтезу колагену X типу та ферментів, що деградують матрикс. Однак в обох випадках спостерігається пригнічення біосинтезу хондроцитами колагену II типу та протеогліканів, які є основними компонентами хрящового матриксу. Однак, досліджень цих хрящових тканин в системі хребтового рухового сегменту у віковому аспекті та в умовах остеопорозу маловивчено.

Отже, вплив свинцю на епіфізарний хрящ на організаційному рівні призводить до пригнічення росту скелету, але більшість досліджень з цієї проблеми вивчали довгі кістки, але досліджень епіфізарного хрящу хребців не проводили. Дослідження суглобового хряща є малочисельні, присвячені вивченню великих суглобів та не розкривають особливостей впливу свинцю на структуру хондроцитів та хрящового матриксу.

Детальні дослідження кісткової тканини, які проведені в основному на довгих кістках, дозволяють інтерполювати їх на зміни, які мають місце у разі остеопорозу. Крім того, вплив свинцю може викликати передчасне настання менопаузи та цим підвищувати ризик переломів у жінок. У клінічних дослідженнях встановлено зворотній взаємозв'язок між вираженістю впливу свинцю та показником МЦКТ у жінок після менопаузи. У експериментальних дослідженнях виявлено втрату кісткової маси після впливу свинцю у щурів різного віку. Однак, вплив свинцю на ремоделювання кісткової тканини на фоні остеопорозу є маловивченим.

Виникнення порушень у кістковій тканині, аналогічних змінам на фоні остеопорозу, пов'язують з дією свинцю на остеобласти та остеокласти. Виявлено, що вплив свинцю, як на ці клітини є дозозалежним. В літературі представлені суперечливі дані щодо впливу свинцю на остеокласти. Свинець викликає пригнічення активності остеокластів, а за даними інших авторів їх активність може посилюватися, але цей процес до кінця не з'ясований. Дія

свинцю на остеобласти полягає в пригніченні остеобластогенеза, крім того, зі збільшенням його концентрації спостерігається апоптоз остеобластів. Більшість дослідників вивчали вплив свинцю на щурах молодого віку чи *in vitro* з використанням ембріональних клітин. Однак, досліджень в яких вивчали вплив свинцю на остеобласти молодих тварин та тварин з остеопорозом недостатньо. Повністю не з'ясовано вплив свинцю на остеоцити. Одним із вірогідних механізмів впливу свинцю на кісткову тканину дослідники вважають пригнічення Wnt-шляху.

Також важливою проблемою є дослідження дії свинцю на матрикс хрящової та кісткової тканин. Існують лише поодинокі дослідження присвячені цьому питанню. В експериментальному дослідженні на щурах було встановлено, що свинець змінює кристалічну структуру матриксу кісткової тканини. За даними інших авторів свинець призводить до деградації суглобового матриксу та підвищення його мінералізації, але досліджень його впливу на волокнистий хрящ міжхребцевого диску недостатньо. Важливою ланкою досліджень може бути поляризаційний аналіз стану колагенів матриксу міжхребцевого диску та губчастої кісткової тканини. Цей напрямок актуальний, бо на його основі може бути виявлено цілісність та впорядкованість структурної організації цих тканин після впливу свинцю. Водночас такі дослідження одиничні.

Важливим аспектом дослідження дії свинцю на кісткову та хрящову тканини є вивчення його дії на клітини цих тканин на молекулярному рівні. Однак і понині це питання залишається нерозв'язаним. Так встановлено, що свинець має високу спорідненість з кальцієм, і через це може взаємодіяти з кальцій-чутливими рецепторами, з'єднуватися з кальцій-зв'язуючим білком, проходити через кальцієві канали, а також виступати вторинним посередником замість кальцію, порушуючи таким чином функціональні процеси клітин, такі як запалення, метаболізм, апоптоз, скорочення гладкої мускулатури, внутрішньоклітинний тиск та інші. Одним з можливих механізмів дії свинцю на клітини є збільшенням концентрації

внутрішньоклітинного кальцію, накопичення якого і активує сигнальний шлях апоптоза. З чим пов'язана висока спорідненість кальцію та свинцю невідомо, однак припускають, що свинець формує більш міцні хімічні зв'язки порівняно з кальцієм і тому швидко втручається у вище зазначені процеси. У дослідженнях *in vitro* встановлено, що свинець пригнічує TGF- β шлях у хондроцитах суглобового хряща, що викликає гіпертрофію цих клітин. На клітини кісткової тканини, остеобласти, на думку дослідників, свинець діє, пригнічуючи Wnt-шлях негативно впливаючи на остеобластогенез. Незважаючи на певну кількість наукових досягнень у сфері розуміння молекулярних механізмів дії свинцю на клітини, повністю вони не з'ясовані.

Таким чином, в результаті аналізу наукової літератури, присвяченої впливу свинцю на кісткову та хрящову тканини виявлено, що відсутні комплексні дослідження стану епіфізарного, суглобового та волокнистого хряща, кісткової тканини в рамках однієї системи. У зв'язку з цим, інтегральний підхід до змін під дією свинцю у хребтовому руховому сегменті, в якому присутні вище зазначені тканини є актуальним і це призводить до необхідності продовжувати дослідження в цьому напрямку.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріал дослідження

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 (серія 1) та після досягнення піку кісткової маси на фоні остеопорозу (серія 2) (рис. 2.1).



Рис. 2.1 Схема експериментального дослідження впливу свинцю.

Вибір саме таких вікових груп обумовлений даними інших досліджень, які свідчать про особливу чутливість до впливу свинцю дітей та людей похилого віку з остеопорозом [21, 34, 54, 80, 125].

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 на контрольну. Щури дослідної групи отримували розчин ацетату свинцю (230 мг свинцю на 1 л дистильованої води) у якості питної води, а контрольної – дистильовану воду 10 тижнів [25]. В умовах використаної експериментальної моделі кожна тварина отримувала близько 9 мл розчину ацетату свинцю зазначеної концентрації на добу. Водночас у випадку використання цієї моделі у інших експериментальних дослідженнях рівень свинцю у крові вже на 3-ий тиждень експерименту досягав стабільного рівня 30 мкг/дл, що на думку дослідників, за умов характерного для щурів більш швидкого метаболізму дозволяє екстраполювати цю модель як релеванту впливу свинцю з зовнішнього середовища за умов нормальної концентрації свинцю у крові людини (10 мкг/дл) [25, 132, 133]. Застосована експериментальна модель широко використовується у дослідженнях низькорівневого впливу свинцю [22, 25, 30, 133, 134]. Використання в експерименті саме самців було обумовлено даними інших досліджень, згідно з якими самці є більш чутливими до дії свинцю [28]. На момент виведення з експерименту вік тварин складав 4 місяці.

Серія 2. У самиць (віком 6 міс.) моделювали остеопороз шляхом проведення оваріектомії [135, 136]. Для цього виконували премедикацію та вводили тварин у стан наркозу, після чого фіксували на спині за допомогою спеціальної підставки. 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 [137].

Через 4 міс. після проведення оваріектомії 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 щурів у віці 12,5 міс. були виводили з експерименту. В обох серіях тварин це виконували шляхом декапітації під ефірним наркозом.

Для подальшого аналізу були виділені фрагменти поперекового відділу хребта L_I-L_{IV}.

Виконання експериментального дослідження затверджено комітетом з біоетики ДУ «Інституту 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 [138, 139].

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Соматометричні методи

З метою дослідження впливу свинцю на динаміку показників маси тіла до закінчення експериментального дослідження з першого дня експерименту 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 з модельованим остеопорозом на початок проведення експерименту по впливу свинцю [135].

2.2.2 Остеометричні методи дослідження

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 [140]:

- 1) висоту тіла хребця – відстань між серединними точками верхньої і нижньої поверхонь тіл хребців;
- 2) краніальну ширину – відстань між найбільш віддаленими одна від одної крапками на бічних краях краніальної поверхні тіл хребців;
- 3) краніальний сагітальний діаметр – відстань між точками перетину медіально-сагітальної площини з переднім і заднім краями краніальної поверхні тіл хребців;
- 4) каудальну ширину – відстань між найбільш віддаленими одна від одної крапками на бічних краях каудальної поверхні тіл хребців;
- 5) каудальний сагітальний діаметр – відстань між точками перетину медіально-сагітальної площини з переднім і заднім краями каудальної поверхні тіл хребців.

2.2.3 Рентгенівська флуоресцентна спектрометрія

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

2.2.4 Денситометричне дослідження

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 L_I-L_{IV} з використанням двоенергетичного рентгенівського денситометра QDR4500 Explorer (Hologic) в режимі поперекового відділу хребта.

2.2.5 Гістологічний аналіз з морфометрією

Фрагменти поперекового відділу хребта після виділення фіксували у 10 % нейтральному формаліні, після чого декальцинували у 10 % розчині

мурашиної кислоти. Фрагменти хребта після декальцинації промивали проточною водою, зневоднювали у серії спиртів зростаючої концентрації та хлороформі, потім просочували парафіном [141]. 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. Здатність толуїдинового синього забарвлювати компоненти хрящового матриксу дозволяє виявити хрящові ділянки у кістковій тканині, що дає змогу оцінити особливості її ремоделювання. Дослідження гістологічних зрізів проводили з використанням світлового мікроскопу Olympus BX-63 (Japan).

Було 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 (у мм²);
- 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.

Було 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 (у мм^2);
- щільність нотохордальних клітин у драглистому ядрі (у 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).

2.2.6 Метод електронної мікроскопії

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 [142]: 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 [143]. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю і ураніацетатом за методом Е. Рейнольдса [144]. Ультраструктурний аналіз проводили з використанням трансмісійного електронного мікроскопу ЕМВ-100БР (Суми, Україна).

2.2.7 Поляризаційно-оптичний метод

Забарвлення тканин пікросиріусом червоним з дослідженням в поляризованому світлі використовують для дослідження типів колагену [145]. Матрикс кісткової тканини містить переважно колаген I типу, тоді як у міжхребцевому диску колаген I типу представлений в більшості у

волокнистому кільці, а колаген II типу – поблизу драглистого ядра [146]. 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) [147]. Відомо, що в кістковій тканині та волокнистому хрящі колаген I типу формує товсті волокна з щільним розташуванням фібрил та набуває червоної рефракції у поляризованому світлі, колаген II типу входить до складу більш тонких волокон та переважно має рефракцію жовтого кольору та накопичується у хрящі, а колаген III типу – ще тонші волокна з зеленою рефракцією. Враховуючи це, у поляризованому світлі підраховували частку кожного з типів колагену (у %) у 3 полях зору поляризаційного мікроскопа Olympus BX51 при збільшенні 200 на 3 зрізах з використанням методики L. Rich та P. Whittaker [148].

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 [149]. Ця методика з вказаним рівнем рН дозволяє виявити тільки сульфатовані глікозаміноглікани, які переважають у компонентному складі диску. Використання толуїдинового синього для забарвлення хрящової тканини дозволяє виявити сульфатовані глікозаміноглікани за рахунок приєднання катіонних груп барвника до цих сполук завдяки їх електронегативному заряду. В сучасних дослідженнях толуїдиновий синій використовують для оцінки дегенеративних змін у міжхребцевому диску [150, 151]. Аналізували зрізи з використанням мікроскопа Olympus BX-53 у світлому полі та поляризованому світлі.

2.2.8 Статистичні методи

Аналіз даних був виконаний з використанням програм «IBM SPSS Statistics 20» і «Microsoft office Exel 2003». 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 Стьюдента. У всіх видах статистичного аналізу розраховувався досягнутий рівень значимості (P), при цьому критичний рівень значимості у даному дослідженні приймався рівним 0,05 [152].

РОЗДІЛ 3

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ СВИНЦЮ НА РІСТ ХРЕБТА ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ З УРАХУВАННЯМ ДИНАМІКИ ПОКАЗНИКІВ РОСТУ, МАСИ ТІЛА ТА ОСТЕОМЕТРИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ТІЛ ХРЕБЦІВ

3.1 Особливості впливу свинцю на динаміку показників довжини та маси тіла у щурів різного віку

Відомо, що свинець пригнічує ріст скелету [33], зокрема довгих кісток [29, 58], однак його впливу на ріст хребта вивчено недостатньо. З метою з'ясування впливу свинцю на ріст хребта були виміряні їх показники маси та довжини тіла в динаміці. Довжина тіла вимірювалася лише у молодих щурів, що пов'язано з пригнічення процесу росту, яке відбувається у щурів доросліше 10 місяців і до яких належали щури з модельованим остеопорозом. Також у цьому розділі представлено результати проведеної остеометрії тіл хребців L_I - L_{IV} після закінчення моделювання впливу свинцю.

3.1.1 Динаміка показників довжини та маси тіла у молодих щурів впродовж впливу свинцю

Достовірні відмінності показників маси тіла у щурів дослідної групи від показників щурів контрольної групи були виявлені починаючи з 4 тижня проведення експерименту (табл. 3.1). У дослідній групі жива маса тіла щурів з 1 по 10 тиждень збільшилася в 3,4 раза (на 237 г), тоді як у контрольній групі – в 4,3 раза (на 317,5 г), що вказує на відставання в темпах росту у щурів під впливом свинцю. З 4 по 10 тиждень від початку дії свинцю показник живої маси тіла в дослідній групі збільшився в 1,4 раза (на 96 г), тоді як в контрольній групі в 1,5 раза (на 138,8 г).

Так, на 4-ий тиждень маса тіла щурів зменшилася на 12,2 %, на 5-ий тиждень – на 11,2 %, на 6-ий – на 7,9 %, на 7-ий – на 9,7%, на 8-ий – на 9,9 %, на 9-й – 17 % та на 10-й – 18,4 % у порівнянні з масою тіла щурів контрольної групи на відповідні терміни.

Зниження маси тіла, виявлене у дослідній групі, може бути пов'язано з тим, що вплив свинцю викликає пригнічення апетиту шляхом впливу на рецептори в шлунково-кишковому тракті. За даними Hammond P.V. з співав. [60] під дією свинцю процес росту тіла молодих тварин знижувався на 17 %, так як одним з факторів, що впливають на ріст кісток, є неадекватне надходження поживних речовин в організм. Отримані дані також узгоджуються з результатами іншого дослідження на молодих щурах [102].

Таблиця 3.1

Показники маси тіла щурів досліджуваних груп на різні терміни дослідження ($M \pm m$)

| Тиждень, № | Досліджувані групи. Маса (г) | | P |
|------------|------------------------------|--------------|------|
| | Контроль | Дослід | |
| 0 | 96,3 ± 1,67 | 100,5 ± 1,85 | 0,09 |
| 1 | 99,5 ± 1,62 | 101,5 ± 1,31 | 0,34 |
| 2 | 148,8 ± 3,32 | 156,3 ± 3,24 | 0,11 |
| 3 | 202,5 ± 2,6 | 197,0 ± 2,82 | 0,16 |
| 4 | 275,0 ± 4,35 | 241,5 ± 2,21 | 0,01 |
| 5 | 285,0 ± 3,95 | 253,0 ± 2,98 | 0,01 |
| 6 | 302,5 ± 3,69 | 278,8 ± 4,92 | 0,01 |
| 7 | 317,5 ± 4,52 | 286,8 ± 3,33 | 0,01 |
| 8 | 357,5 ± 4,52 | 321,8 ± 4,79 | 0,01 |
| 9 | 408,8 ± 4,29 | 339,3 ± 3,81 | 0,01 |
| 10 | 413,8 ± 3,18 | 337,5 ± 4,03 | 0,01 |

Показники довжини тіла у тварин дослідної групи вірогідно відрізнялися від тварин контрольної та інтактної груп на 2 тиждень та починаючи з 4 тижня проведення експерименту, так само як і вага (табл. 4.5).

Так, на 2 тиждень довжина тіла у щурів дослідної групи стала менше на 5,5 %, на 4-й тиждень – на 4,4 %, на 5-й – на 7,2 %; на 6-й – на 5,1 %; на 7-й – на 4,1 %; на 8-й – на 2,7 %; на 9-й – на 3,9 %; на 10-й – на 3 % в порівнянні з показниками контрольної групи на аналогічні терміни дослідження (табл. 3.2).

Поступове зменшення відмінностей показників довжини тіла між дослідної і контрольної групами з 7,2 до 3 % можна пояснити зменшенням темпів росту у щурів з віком. Зменшення показників довжини тіла в дослідній групі відображає негативний ефект свинцю на ріст хребта.

Таблиця 3.2

Показники довжини тіла щурів досліджуваних груп на різні терміни дослідження ($M \pm m$)

| Тиждень, № | Досліджувані групи. Довжина тіла (см) | | P |
|------------|---------------------------------------|-------------|------|
| | Контроль | Дослід | |
| 0 | 15,00 ± 0,08 | 14,9 ± 0,11 | 0,85 |
| 1 | 16,7 ± 0,08 | 16,6 ± 0,13 | 0,73 |
| 2 | 18,2 ± 0,08 | 17,2 ± 0,13 | 0,01 |
| 3 | 18,4 ± 0,04 | 18,7 ± 0,48 | 0,06 |
| 4 | 20,3 ± 0,08 | 19,4 ± 0,09 | 0,01 |
| 5 | 20,9 ± 0,12 | 19,4 ± 0,10 | 0,01 |
| 6 | 21,8 ± 0,08 | 20,7 ± 0,11 | 0,01 |
| 7 | 21,8 ± 0,08 | 20,9 ± 0,08 | 0,01 |
| 8 | 22,2 ± 0,10 | 21,6 ± 0,08 | 0,01 |
| 9 | 22,8 ± 0,06 | 21,9 ± 0,09 | 0,01 |
| 10 | 23,2 ± 0,08 | 22,5 ± 0,07 | 0,01 |

3.1.2 Динаміка показників маси тіла щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом впродовж впливу свинцю

Для визначення впливу свинцю на масу тіла щурів зі змодельованим остеопорозом (модель оваріоектомії) було проведено зважування тварин кожного тижня на протязі всього експерименту. Встановлено, що показник маси тіла у щурів дослідної групи почав вірогідно зменшуватися з 6 тижня проведення експерименту з моделювання впливу свинцю (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Показники маси тіла щурів досліджуваних груп на різні терміни дослідження ($M \pm m$)

| Тиждень, № | Досліджувані групи. Маса (г) | | Р |
|------------|------------------------------|--------------|-------|
| | Контроль | Дослід | |
| 0 | 323,3 ± 3,12 | 320,0 ± 3,69 | 0,51 |
| 1 | 323,5 ± 2,59 | 320,0 ± 3,69 | 0,44 |
| 2 | 323,5 ± 2,59 | 320,0 ± 3,69 | 0,44 |
| 3 | 323,5 ± 3,12 | 320,0 ± 3,69 | 0,51 |
| 4 | 336,5 ± 2,02 | 330,0 ± 3,69 | 0,13 |
| 5 | 336,8 ± 1,99 | 330,0 ± 3,40 | 0,09 |
| 6 | 343,8 ± 1,61 | 330,0 ± 3,76 | 0,002 |
| 7 | 353,3 ± 1,78 | 340,0 ± 3,62 | 0,002 |
| 8 | 353,5 ± 1,78 | 340,0 ± 3,63 | 0,01 |
| 9 | 354,0 ± 2,28 | 345,0 ± 1,98 | 0,001 |
| 10 | 356,8 ± 2,52 | 345 ± 1,95 | 0,001 |

Так, на 6-ий тиждень маса тіла зменшилася на 4,0 %, на 7-ий – на 3,76 %, на 8-ий – на 3,82 %, на 9-ий – на 2,54 % і на 10-ий – на 3,3 % у порівнянні з масою тіла щурів контрольної групи на відповідні терміни.

Проведений аналіз отриманих результатів свідчить, що вплив свинцю на організм щурів зі змодельованим остеопорозом викликає вірогідне зменшення маси тіла приблизно на 3,5 %. Ці дані свідчать про наявність слабого ефекту свинцю на масу тварин цього віку з остеопорозом та потребує подальшого дослідження мінеральної щільності кісткової тканини та морфологічного аналізу хребтових рухових сегментів. Також треба зазначити, що втрата маси тіла обмежується часовими рамками нашого експерименту (10 тижнів), а маса тіла тварин дослідної групи не стала рівною масі тіла щурів контрольної групи наприкінці експерименту.

Відомо, що маса тіла має важливу роль для підтримання гомеостазу кісткової маси в організмі людини. У жінок після менопаузи маса тіла є важливим фактором, який враховується під час прогнозування ризику переломів кісток у декількох існуючих алгоритмізованих онлайн-системах (FRAX, QFracture). Вважається, що недостатня маса тіла підвищує ризик переломів, внаслідок зменшення жирової маси, яка слугує джерелом невеликої кількості естрогенів замість яєчників після настання менопаузи. З іншого боку, зменшення маси тіла може слугувати ознакою не тільки втрати жирової маси, але й м'язової або кісткової. Втрата м'язової маси призводить до погіршення координації рухів та збільшення частоти падінь. В одному з досліджень було виявлено, що дія свинцю на організм людини викликає порушення нервово-м'язової функції, що підвищує частоту падінь, які є одним з головних факторів ризику переломів [20].

Отже вплив свинцю викликає втрату маси тіла, як у молодих, так і у щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом. Однак у 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). Зниження показника довжини тіла з 2-го тижня у молодих щурів підтверджує це і вказує на можливість пояснення такої чутливості активним процесом росту у цьому віці.

3.2 Особливості впливу свинцю на ріст тіл хребців поперекового відділу хребта щурів різного віку

У цьому підрозділі наведені результати остеометричного вимірювання таких параметрів тіл хребців щурів, як висота, краніальні та каудальні ширини і сагітальні діаметри для вивчення впливу свинцю на ріст тіл хребців щурів різного віку.

3.2.1 Вплив свинцю на ріст тіл хребців молодих щурів

Згідно з результатами проведеної *остеометрії* тіл хребців L_I , L_{II} , L_{III} , L_{IV} були виявлені вірогідні відмінності між контрольною та дослідною групами молодих щурів за всіма вимірюваними показниками. Так, показник висоти тіл у щурів дослідної групи був нижчий в L_I – на 11,1 %, в L_{II} – на 10 %; в L_{III} – на 12,2 %; L_{IV} – на 8,5 % порівняно з контрольною групою (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Показники висоти тіл хребців L_I – L_{IV} поперекового відділу хребта молодих щурів досліджуваних груп ($M \pm m$)

| Досліджувані групи | Висота тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|-------------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| | L_I | L_{II} | L_{III} | L_{IV} |
| Дослід | $5,6 \pm 0,15$ | $6,3 \pm 0,07$ | $6,5 \pm 0,09$ | $7,3 \pm 0,12$ |
| Контроль | $6,3 \pm 0,25$ | $7,0 \pm 0,15$ | $7,4 \pm 0,17$ | $7,98 \pm 0,11$ |
| P | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |

Після впливу свинцю показники краніальної ширини тіл хребців знизилися в L_I – 11,8 %, в L_{II} – на 9,8 %; в L_{III} – 15,1 %, в L_{IV} – на 9,4 % порівняно з контрольною групою (табл. 3.5).

Показники краніального сагітального діаметру тіл хребців у дослідній групі були нижче за показники тварин контрольної групи в L_I – на 8,3 %, в L_{II} – на 14,3 %; в L_{III} – на 13,8 %, в L_{IV} – на 13,3 % (табл. 3.6).

Таблиця 3.5

Показники краніальної ширини тіл хребців L_I–L_{IV} поперекового відділу хребта молодих щурів досліджуваних груп (M ± m)

| Досліджувані групи | Краніальна ширина тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|--|-----------------|------------------|-----------------|
| | L _I | L _{II} | L _{III} | L _{IV} |
| Дослід | 4,5 ± 0,14 | 4,6 ± 0,10 | 4,5 ± 0,12 | 4,8 ± 0,11 |
| Контроль | 5,1 ± 0,05 | 5,1 ± 0,06 | 5,3 ± 0,16 | 5,3 ± 0,12 |
| P | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |

Таблиця 3.6

Показники краніального сагітального діаметру тіл хребців L_I–L_{IV} поперекового відділу хребта молодих щурів досліджуваних груп (M ± m)

| Досліджувані групи | Краніальний сагітальний діаметр тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|--|-----------------|------------------|-----------------|
| | L _I | L _{II} | L _{III} | L _{IV} |
| Дослід | 2,2 ± 0,04 | 2,4 ± 0,08 | 2,5 ± 0,10 | 2,6 ± 0,09 |
| Контроль | 2,4 ± 0,04 | 2,8 ± 0,11 | 2,9 ± 0,05 | 3,2 ± 0,07 |
| P | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 |

Показники каудальної ширини тіл хребців у дослідній групі були нижче за показники тварин контрольної групи в L_I – на 7,7 %, в L_{II} – на 9,4 %; в L_{III} – на 9,4 %, в L_{IV} – на 7,5 % (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Показники каудальної ширини тіл хребців L_I–L_{IV} поперекового відділу хребта молодих щурів досліджуваних груп (M ± m)

| Досліджувані групи | Каудальна ширина тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|---|-----------------|------------------|-----------------|
| | L _I | L _{II} | L _{III} | L _{IV} |
| Дослід | 4,7 ± 0,11 | 4,8 ± 0,09 | 4,8 ± 0,11 | 4,9 ± 0,07 |
| Контроль | 5,1 ± 0,06 | 5,2 ± 0,08 | 5,2 ± 0,08 | 5,3 ± 0,11 |
| P | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |

Показники каудального сагітального діаметру тіл хребців у дослідній групі були нижче ніж показники тварин контрольної групи в L_I – 17,9 %, в L_{II} – на 17,5 %; в L_{III} – на 15,2 %, в L_{IV} – на 9,4 % (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Показники каудального сагітального діаметру тіл хребців L_I – L_{IV} поперекового відділу хребта молодих щурів досліджуваних груп ($M \pm m$)

| Досліджувані групи | Каудальний сагітальний діаметр тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|---|-----------------|----------------|----------------|
| | L_I | L_{II} | L_{III} | L_{IV} |
| Дослід | $2,3 \pm 0,05$ | $2,5 \pm 0,07$ | $2,8 \pm 0,09$ | $2,9 \pm 0,07$ |
| Контроль | $2,8 \pm 0,11$ | $3,03 \pm 0,07$ | $3,3 \pm 0,05$ | $3,2 \pm 0,06$ |
| P | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |

Таким чином, під впливом свинцю у молодих щурів показник висоти тіл хребців став в середньому нижче на 10,5 %, краніальної ширини – на 11,5 %, каудальної ширини – на 8,5 %; краніального сагітального діаметру – на 12,4 %; каудального сагітального діаметру – на 15 % у порівнянні з контрольною групою. Згідно з цим пригнічення росту тіл хребців під впливом свинцю відбувається у всіх площинах, але найбільше – у сагітальній площині. Це пояснюється тим, що ріст тіл хребців відбувається майже рівномірно, як у довжину, так і в інших площинах, на відміну від росту довгих кісток.

3.2.2 Вплив свинцю на ріст тіл хребців щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом

Відомо, що остеопороз викликає певні зміни геометрії тіл хребців. Так, компресійні переломи зменшують висоту тіл хребців, а активні процеси резорбції кісткової тканини звужують їх у центральній частині.

Під час дослідження висоти тіл хребців у щурів дослідної групи було встановлено, що цей показник був вірогідно нижчим в L_I – на 10,9 %, в L_{II} – на 6,9 %, в L_{III} – на 3,6 %, а в L_{IV} – не змінився порівняно з показниками щурів контрольної групи (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Показники висоти тіл хребців L_I-L_{IV} поперекового відділу хребта щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом досліджуваних груп (M ± m)

| Досліджувані групи | Висота тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | L _I | L _{II} | L _{III} | L _{IV} |
| Дослід | 5,41 ± 0,14 | 6,52 ± 0,15 | 6,75 ± 0,09 | 7,83 ± 0,11 |
| Контроль | 6,07 ± 0,07 | 7,00 ± 0,00 | 7,00 ± 0,00 | 8,00 ± 0,00 |
| P | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,11 |

Вірогідної різниці між показниками краніальної ширини і сагітального діаметру, каудальної ширини та сагітального діаметру (в тілах L_{II}, L_{III}, L_{IV}) та показниками тварин контрольної групи не встановлено (табл. 3.10-3.13).

Таблиця 3.10

Показники краніальної ширини тіл хребців L_I-L_{IV} поперекового відділу хребта щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом досліджуваних груп (M ± m)

| Досліджувані групи | Краніальна ширина тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|--|-----------------|------------------|-----------------|
| | L _I | L _{II} | L _{III} | L _{IV} |
| Дослід | 5,04 ± 0,04 | 5,04 ± 0,04 | 5,04 ± 0,04 | 5,06 ± 0,06 |
| Контроль | 5,07 ± 0,03 | 5,07 ± 0,03 | 5,07 ± 0,07 | 5,07 ± 0,07 |
| P | 0,64 | 0,52 | 0,24 | 0,35 |

Таблиця 3.11

Показники краніального сагітального діаметру тіл хребців L_I-L_{IV} поперекового відділу хребта щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом досліджуваних груп (M ± m)

| Досліджувані групи | Краніальний сагітальний діаметр тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|--|-----------------|------------------|-----------------|
| | L _I | L _{II} | L _{III} | L _{IV} |
| Дослід | 2,09 ± 0,06 | 2,83 ± 0,12 | 2,83 ± 0,12 | 2,99 ± 0,1 |
| Контроль | 2,20 ± 0,10 | 3,00 ± 0,00 | 3,00 ± 0,00 | 3,03 ± 0,03 |
| P | 0,19 | 0,19 | 0,14 | 0,59 |

Таблиця 3.12

Показники каудальної ширини тіл хребців L_I-L_{IV} поперекового відділу хребта щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом досліджуваних груп (M ± m)

| Досліджувані групи | Каудальна ширина тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|---|-----------------|------------------|-----------------|
| | L _I | L _{II} | L _{III} | L _{IV} |
| Дослід | 5,03 ± 0,02 | 5,03 ± 0,02 | 5,06 ± 0,04 | 5,06 ± 0,04 |
| Контроль | 5,03 ± 0,02 | 5,03 ± 0,02 | 5,1 ± 0,04 | 5,1 ± 0,04 |
| P | 0,64 | 0,68 | 0,19 | 0,15 |

Також було виявлено вірогідну різницю між показниками тварин дослідної та контрольної груп у тілі хребця L_I при вимірюванні каудального сагітального діаметру (табл. 3.13). Цей показник був нижче на 16,2 % у порівнянні з показниками щурів контрольної групи.

Таблиця 3.13

Показники каудального сагітального діаметру тіл хребців L_I-L_{IV} поперекового відділу хребта щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом досліджуваних груп (M ± m)

| Досліджувані групи | Каудальний сагітальний діаметр тіл хребців щурів (мм) | | | |
|--------------------|---|-----------------|------------------|-----------------|
| | L _I | L _{II} | L _{III} | L _{IV} |
| Дослід | 2,43 ± 0,09 | 2,89 ± 0,07 | 2,96 ± 0,08 | 3,11 ± 0,06 |
| Контроль | 2,9 ± 0,08 | 3,03 ± 0,03 | 3,07 ± 0,05 | 3,1 ± 0,05 |
| P | 0,01 | 0,08 | 0,06 | 0,64 |

Аналіз отриманих даних свідчить про наявність впливу свинцю на показник висоти тіл хребців (зниження близько 7 %) у щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом. Також було виявлено зниження показника каудального сагітального діаметру в тілі хребця L_I на 16,2 %, що вказує на можливу вибіркковість впливу саме на цей хребець, тому що найбільше зниження висоти також було зафіксовано у цьому тілі хребця. Це може бути

пов'язане з більшим біомеханічним навантаженням на цей хребець у порівнянні з іншими тілами у поперековому відділі хребта [153].

Аналізуючи отримані результати остеометричного дослідження було виявлено, що вплив свинцю на хребет щурів є більш вагомим в період активного росту. Так, у тварин молодого віку відбувалося зниження всіх остеометричних показників під дією свинцю, тоді як у на фоні остеопорозу було виявлено тільки зниження висоти тіл хребців (L_I , L_{II} , L_{III}) та сагітального діаметру в L_I . Особливістю впливу свинцю на тварин з остеопорозом є суттєве зменшення показників висоти (L_I , L_{II} , L_{III}) та сагітального діаметру в тілі хребця L_I у порівнянні з іншими тілами хребців, тоді як у молодих тварин такого не було виявлено. Це може свідчити, що зниження висоти тіл хребців у тварин з остеопорозом має інший механізм та не пов'язаний з зоною росту, як у молодих щурів. Відомо, що щури досягають піку кісткової маси у віці 10 міс., після чого значно пригнічуються процеси росту, внаслідок часткового закриття зон росту [135]. Треба зазначити, що показник сагітального діаметру суттєво знизився після впливу свинцю в обох вікових групах у порівнянні зі зниженням інших вимірних показників. Зменшення остеометричних показників тіл хребців під впливом свинцю у щурів молодого віку ймовірно пов'язане з пригніченням росту [15, 28], тоді як зменшення висоти тіл хребців у групі тварин з остеопорозом можливо пояснюється виникненням компресійних деформацій [19].

Таким чином дослідження маси тіла в динаміці у щурів обох вікових груп виявило, що вплив свинцю викликає зниження маси тіла вже в середині експериментального моделювання впливу свинцю, однак з більшим проявом у молодих тварин. 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 L_I , L_{II} ,

L_{III}, однак менш суттєво порівняно з щурами іншого віку. Це підтверджує, що вплив свинцю викликає пригнічення росту хребта в період активного росту.

Отримані результати потребують більш детального вивчення особливостей дії свинцю на хребтовий руховий сегмент на тканинному та клітинному рівнях, що відображено у наступному розділі.

РОЗДІЛ 4

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ СВИНЦЮ НА ХРЕБТОВИЙ РУХОВИЙ СЕГМЕНТ ЩУРІВ НА ТКАНИННОМУ ТА КЛІТИННОМУ РІВНЯХ

Дегенеративні захворювання хребта є головною причиною болю у спині, з якою стикається більша частина людей протягом життя та знаходиться на другому місці за частотою по зверненню за первинною допомогою до лікаря [2, 3]. Фактори, які викликають дегенеративні порушення повністю не встановлені, однак серед них виділяють токсикологічні [154], одним з яких може бути свинець. Саме тому у цьому розділі буде розглянуто результати вивчення впливу свинцю на структурні елементи хребтового рухового сегмента поперекового відділу хребта щурів: тіла хребців, міжхребцевий диск та дуговідросткові суглоби з використанням методів світлової та трансмісійної електронної мікроскопії.

4.1 Гістологічний аналіз з ультрамікроскопією кісткової тканини тіл хребців щурів різного віку

4.1.1. Структурні особливості кісткової тканини тіл хребців молодих щурів

Гістологічний аналіз. Контрольна група. Тіла хребців щурів були представлені апофізами з розміщеною нижче меафізарною спонгіозою та центральною частиною. Епіфізарний хрящ, розташований поблизу апофізів був виконаний гіаліновим хрящем і складався зі збереженого хряща з рідко розташованими хондроцитами видовженої форми, проліферативної зони, представленої вертикальними колонками хондроцитів з великим ядром і вузькою облямівкою цитоплазми, гіпертрофованої зони, в якій розміщені клітини збільшені в розмірах з невеликим ядром і зони кальцифікації, що складалася з гіпертрофованих і загиблих хондроцитів. Безпосередньо під

епіфізарним хрящем була розміщена новоутворена губчаста кісткова тканина з ділянками хрящового матриксу в центральній частині кісткових трабекул (рис. 4.1, а), що свідчить про незавершеність енхондрального остеогенезу.

З наближенням до центральної частини тіл хребців у складі кісткових трабекул хрящові ділянки не зустрічалися. У центральній частині тіл хребців спостерігалася великопетляста трабекулярна сітка. Остеоцити у кісткових трабекулах були розташовані рівномірно, цементні лінії паралельні одна одній. Поверхні трабекул переважно мали рівні контури. На поверхні кісткових трабекул розміщувалися остеобласти. Більшість кісткових трабекул було вкрито активними остеобластами, які мали велике ядро. Міжтрабекулярні простори заповнені червоним кістковим мозком. Кортекс тіл хребців представлений компактною кістковою тканиною з високою щільністю остеоцитів. На різних ділянках спостерігали прикріплення трабекул до кортексу.

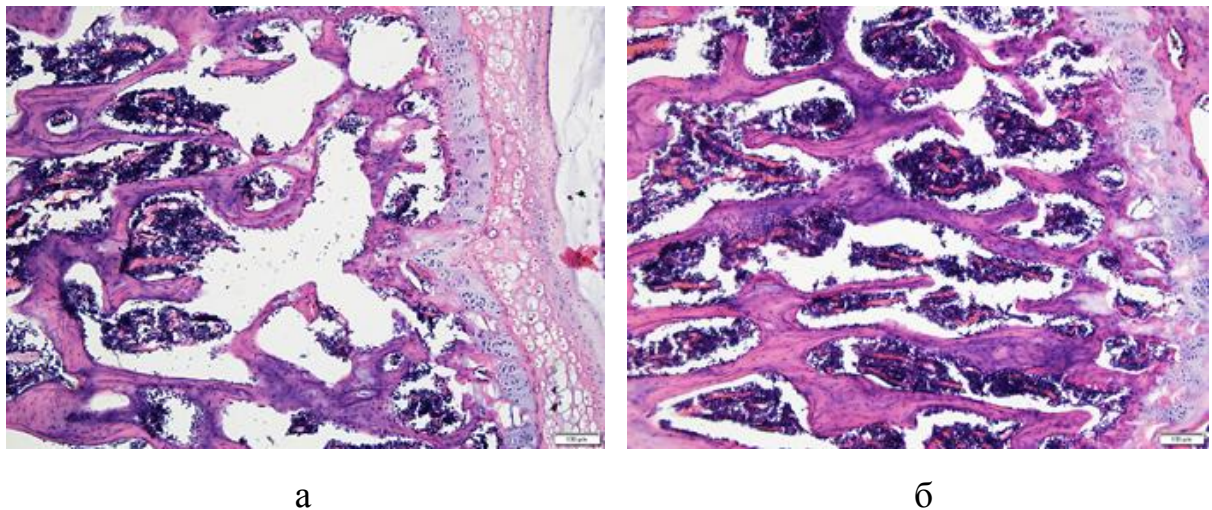
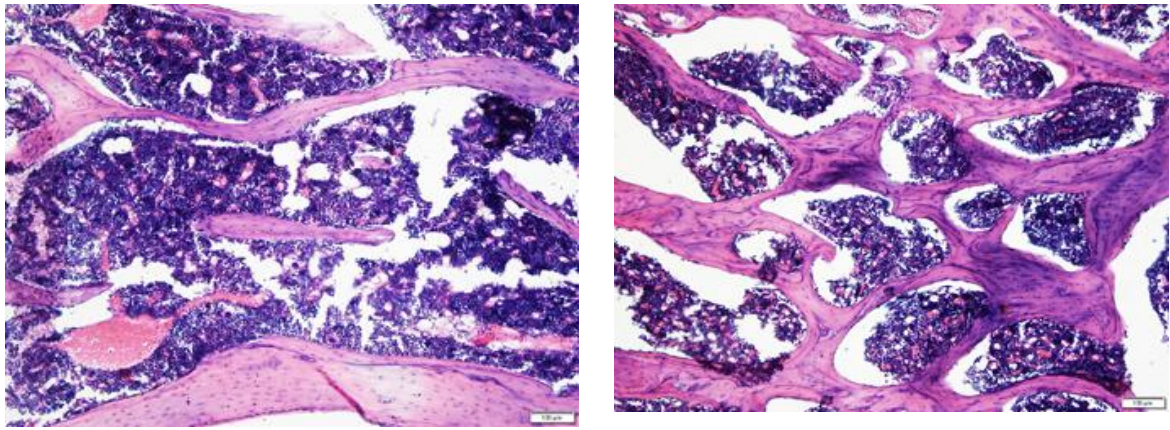


Рис. 4.1. Мікрофотографії зрізів тіл хребців. Зменшення площі губчастої кістки у тварин після впливу свинцю (а) у порівнянні з щурами контрольної групи (б). Збарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 100.

У дослідній групі в тілах хребців мало місце розрідження трабекулярної сітки у порівнянні з контрольною групою (рис. 4.1 б; 4.2).



а

б

Рис. 4.2. Мікрофотографії зрізів центральної частини тіл хребців. Формування поодиноких трабекул та зменшення кількості трабекул (а) у порівнянні з контрольною групою (б). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

Під зоною росту кісткові трабекули розташовувалися вертикально, були нечисленні і стоншені, тоді як поперечні сполучні кісткові трабекули зустрічалися рідко у порівнянні з контрольною групою. Так, згідно з результатами гістоморфометричного аналізу у щурів дослідної групи спостерігалось зменшення площі губчастої кісткової тканини в 1,8 раза у порівнянні з показниками щурів контрольної групи (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Показники стану губчастої кістки тіл хребців молодих щурів ($M \pm m$)

| Вимірювані параметри | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--|-------------------|--------------------|------|
| Загальна площа губчастої кістки (%) | $32,50 \pm 0,56$ | $18,59 \pm 0,86$ | 0,01 |
| Середня відстань між трабекулами (мкм) | $204,25 \pm 6,10$ | $318,82 \pm 11,17$ | 0,01 |
| Середня ширина трабекул (мкм) | $51,62 \pm 1,13$ | $42,55 \pm 1,21$ | 0,01 |
| Висота епіфізарного хряща (мкм) | $102,32 \pm 3,11$ | $76,50 \pm 1,90$ | 0,01 |

Товщина трабекул у щурів дослідної групи була нижчою в 1,2 раза, ніж у контрольних тварин (табл. 4.1). Крім цього після впливу свинцю у молодих щурів в губчастій кістці тіл хребців виявлено збільшення відстані між трабекулами в 1,6 раза. Встановлено зниження висоти епіфізарного хряща на 25,2 % після впливу свинцю, що узгоджується з результатами експериментальних досліджень [15, 29, 30].

Остеоцити в трабекулах тварин дослідної групи перебували у різному стані – поряд з нормальними життєздатними клітинами, також зустрічалися клітини з пікнотичним ядром, остеоцити в розширених лакунах або порожні лакуни (рис. 4.3).

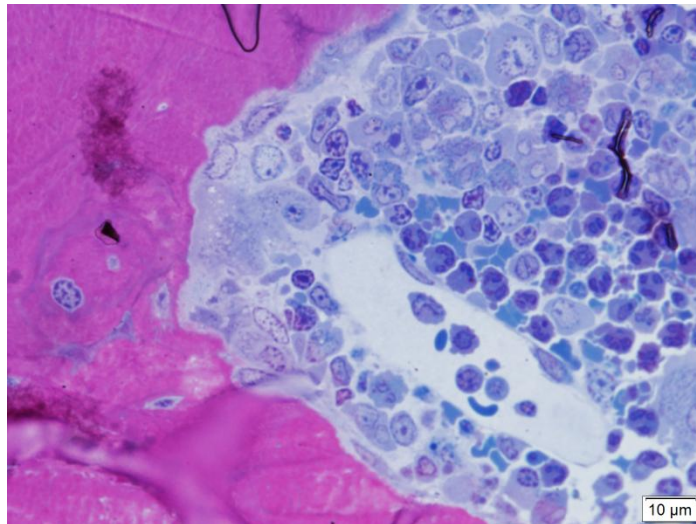


Рис. 4.3. Мікрофотографія зрізу тіла хребця. Губчаста кісткова тканина. Каріопікноз остеоцитів, детрит у лакунах поряд з остеокластом у лакуні резорбції. Дослідна група. Зabarвлення за Арагісію. Збільшення 1000.

Спостерігали зменшення щільності остеоцитів у кісткових трабекулах тіл хребців під впливом свинцю в 1,3 раза, а також збільшення кількості розширених лакун остеоцитів у 9,9 разів, у порівнянні з показниками тварин контрольної групи (табл. 4.2).

В зонах з високою щільністю остеоцитів з пікнотичним ядром структура губчастої кісткової тканини змінювалася – спостерігали ділянки кісткового

матриксу, що мали світло-жовтий колір при забарвленні за Ван Гізон непритаманний зрілій кістковій тканині, що свідчить про незрілість його структури (рис. 4.4).

Таблиця 4.2

Щільність остеоцитів у губчастій кістці тіл хребців молодих щурів
($M \pm m$)

| Вимірювані параметри | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--|---------------------|---------------------|------|
| Щільність остеоцитів (на мм^2) | $1496,54 \pm 48,44$ | $1116,21 \pm 37,70$ | 0,01 |
| Відносна кількість розширених лакун остеоцитів (%) | $2,18 \pm 0,20$ | $21,58 \pm 3,01$ | 0,01 |

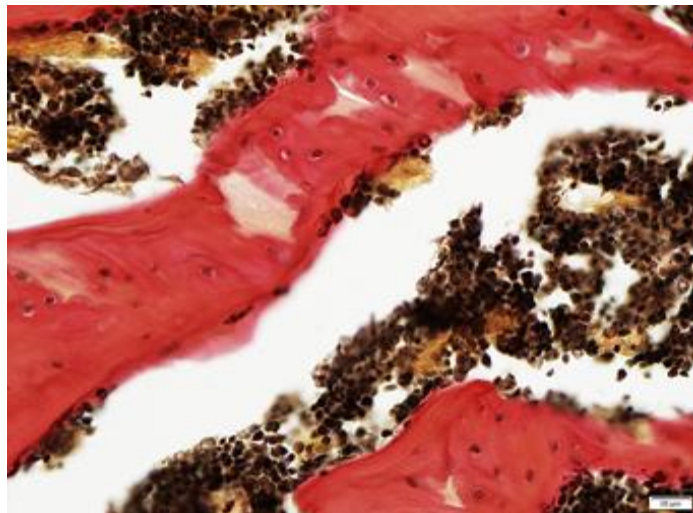


Рис. 4.4. Мікрофотографія зрізу тіла хребця. Губчаста кісткова тканина. Порушення структури матриксу кісткової тканини трабекули тіла хребця щура після дії свинцю. Дослідна група. Забарвлення за Ван Гізон. Збільшення 400.

Цементні лінії були базофільними та розташовувалися хаотично. Спостерігали зниження щільності остеогенних клітин-попередників та остеобластів на поверхні кісткових трабекул, а також клітинний детрит (рис. 4.5).

Поверхня кісткових трабекул мала нерівні контури, подекуди виявлялися заглибини – результати резорбційної активності остеокластів (рис. 4.6, а, б). За

даними морфометричного вимірювання відносна довжина поверхні резорбції кісткових трабекул збільшилася у 3,4 раза порівняно з показниками контрольної групи (табл. 4.3).

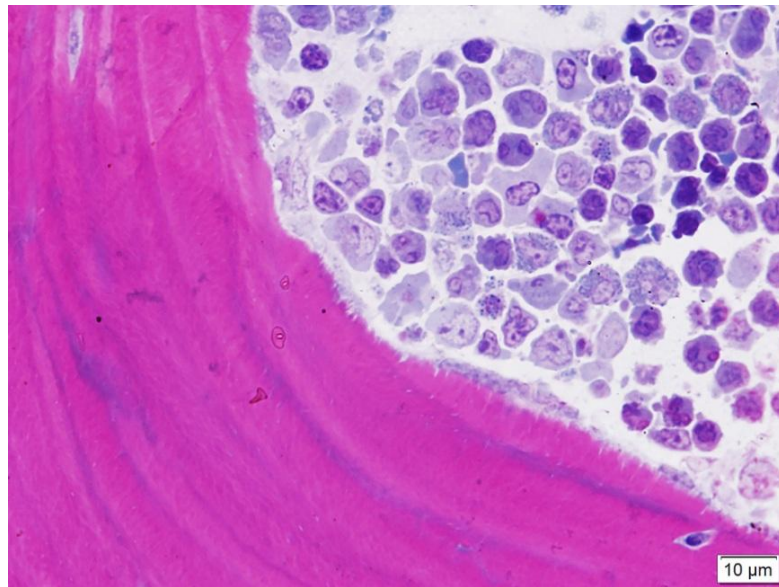
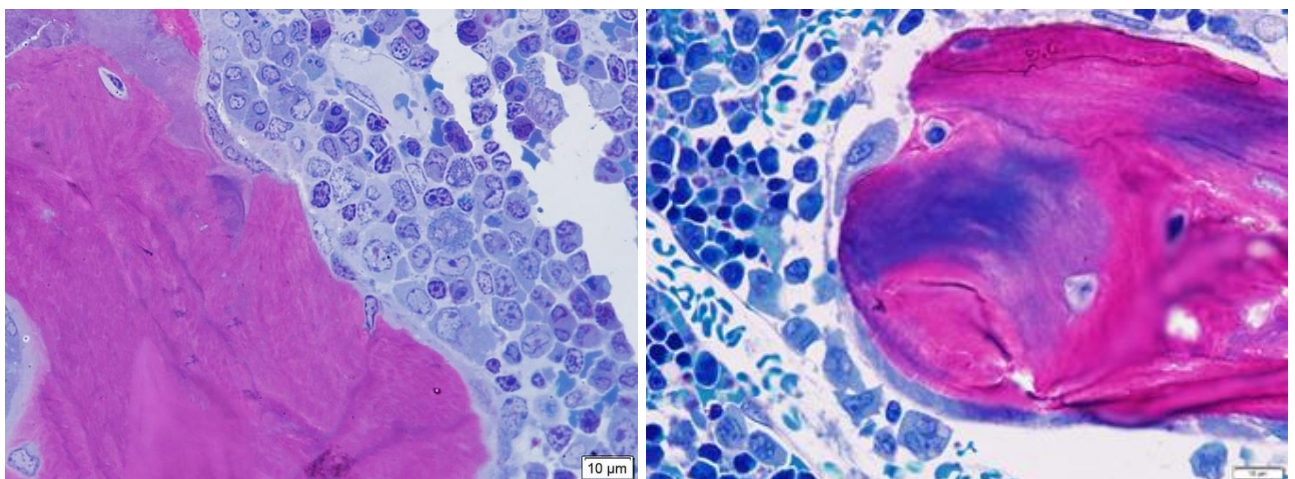


Рис. 4.5. Мікрофотографія зрізу тіла хребця. Губчаста кісткова тканина. Клітинний детрит на поверхні кісткової трабекули. Дослідна група. Забарвлення за Арагісію. Збільшення 1000.



а

б

Рис. 4.6. Мікрофотографія зрізу тіла хребця. Губчаста кісткова тканина. Резорбційні лакуни з остеокластами (а, б) та загибель остеобластів (а) на поверхні кісткових трабекул. Каріопікноз остеоцитів (б). Дослідна група. Забарвлення за Арагісію. Збільшення 1000.

Таблиця 4.3

Показники формування та резорбції губчастої кістки тіл хребців молодих щурів ($M \pm m$)

| Вимірювані параметри | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--|------------------|------------------|------|
| Відносна довжина поверхні резорбції(%) | $5,35 \pm 0,27$ | $18,37 \pm 0,84$ | 0,01 |
| Ширина остеоїду (мкм) | $11,30 \pm 0,40$ | $7,08 \pm 0,09$ | 0,01 |
| Відносна площа хрящових ділянок у трабекулах (%) | $11,60 \pm 1,79$ | $5,85 \pm 1,17$ | 0,03 |

Тоді як ширина шару остеоїду на поверхні трабекул у тварин дослідної групи знизилася в 1,6 раза. Тобто процес резорбції в певній мірі (приблизно в два рази) переважає над процесом формування кісткової тканини. Крім того встановлено зниження відносної площі хрящових ділянок у структурі кісткових трабекул в 1,9 раза порівняно з контрольною групою, що підтверджує пригнічення росту тіл хребців під впливом свинцю (рис. 4.7, табл. 4.3) [26].

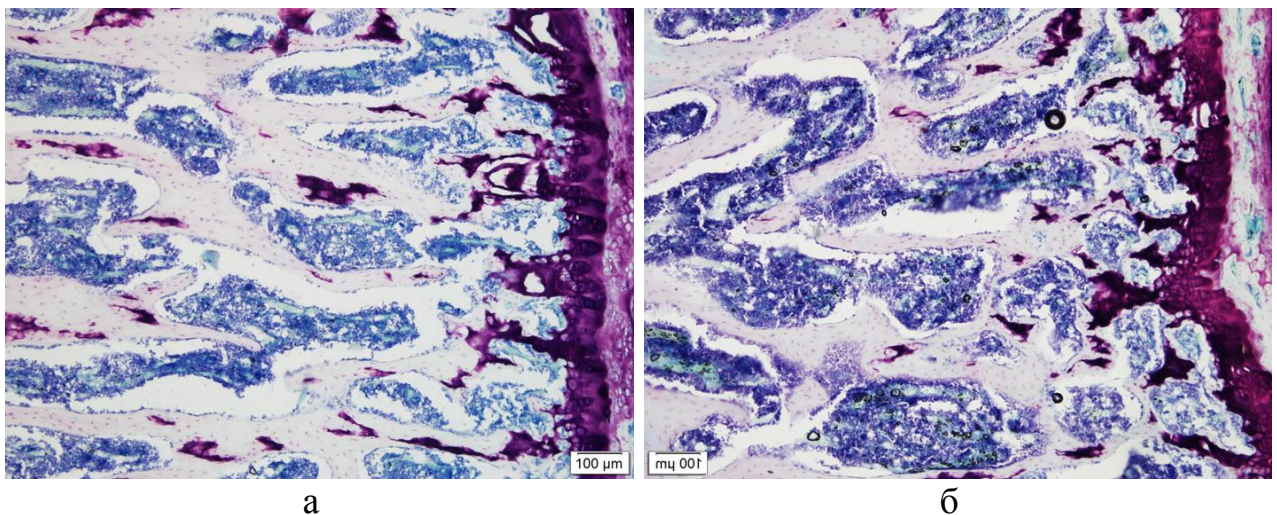


Рис. 4.7. Мікрофотографії зрізів тіл хребців. Губчаста кісткова тканина. Хрящові ділянки у структурі кісткових трабекул щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Забарвлення толуїдиновий синій. Збільшення 100.

У компактній кістці тіл хребців щурів молодого віку під впливом свинцю спостерігалися процеси аналогічні, які визначені нами у губчастій кістковій тканині. Так, спостерігали порушення розміщення цементних ліній у кістковому матриксі. Щільність остеоцитів знизилась в 1,3 раза у порівнянні з показниками щурів контрольної групи (табл. 4.4). Зустрічалися порожні лакуни, а також клітини з каріопікнозом. Також підвищилась кількість остеоцитів, розташованих у розширених лакун в 11,7 раза.

Таблиця 4.4

Щільність остеоцитів у компактній кістці тіл хребців молодих щурів
($M \pm m$)

| Вимірювані параметри | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--|---------------------|---------------------|------|
| Щільність остеоцитів (у мм^2) | $1395,95 \pm 45,43$ | $1083,00 \pm 52,33$ | 0,01 |
| Відносна кількість розширених лакун остеоцитів (%) | $0,94 \pm 0,12$ | $10,93 \pm 1,34$ | 0,01 |

Для вивчення впливу свинцю на функціональний стан клітин кісткової тканини нами було проведено *електронно-мікроскопічне дослідження*. При аналізі губчастої кісткової тканини тіл хребців тварин *контрольної групи* на поверхні кісткових трабекул були виявлені остеобласти з округлими переважно еухромними та гетерохромними ядрами, що свідчить про їх активність (рис. 4.8). Клітини розташовувалися щільно одна до одної. У цитоплазмі відмічена численна кількість каналців гранулярної ендоплазматичної сітки (гЕПС), яка, як відомо бере участь у синтезі експортних білків, у даному випадку переважно колагенів, що є необхідними складовими компонентами органічного матриксу кісткової тканини.

Спостерігали багато розширених цистерн гЕПС, заповнених продуктами біосинтезу (рис. 4.9). Крім того, зрідка зустрічалися остеокласти, які мали 3-5 ядер та численну кількість мітохондрій.

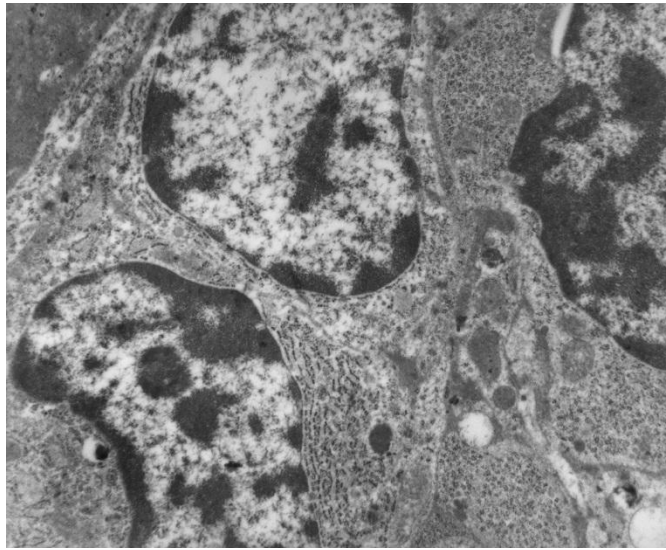


Рис. 4.8. Мікрофотографія електроннограми. Osteобласти з гЕПС на поверхні кісткової трабекули. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 6000.

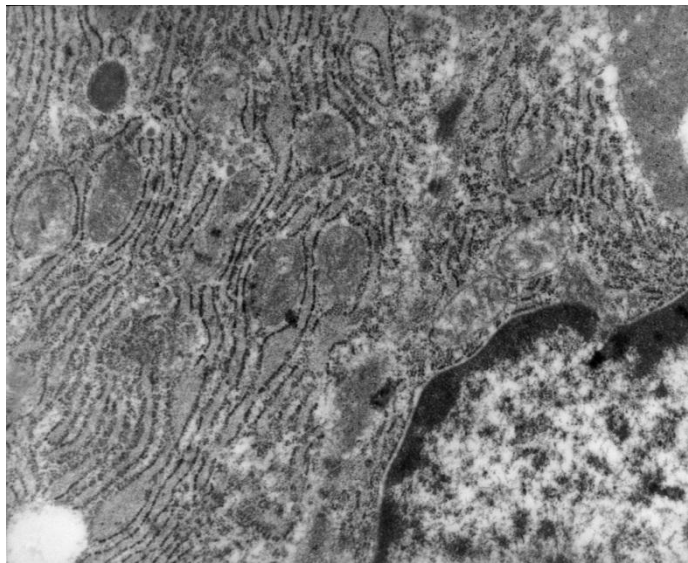


Рис. 4.9. Мікрофотографія електроннограми. Фрагмент остеобласта з багаточисельними цитстернами гЕПС у цитоплазмі. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 15600.

Остеоцити щурів контрольної групи знаходилися у вузьких лакунах. Клітини мали гіперхромні ядра, чисельні цистерни гЕПС в цитоплазмі, поодинокі мітохондрії (рис. 4.10).

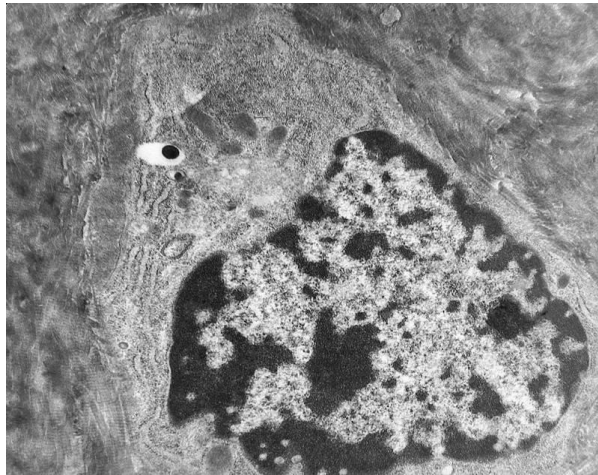
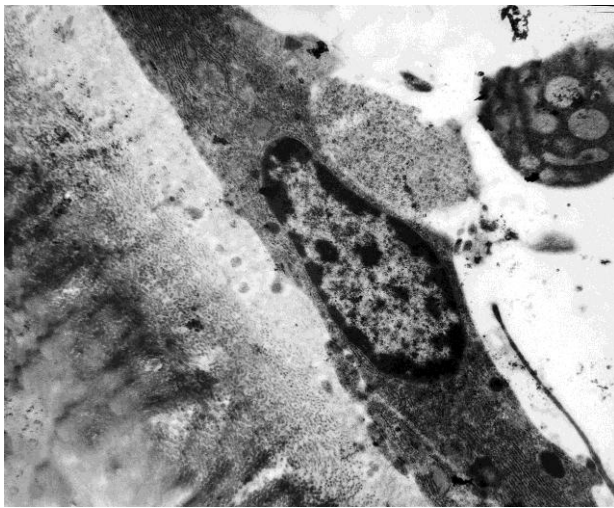
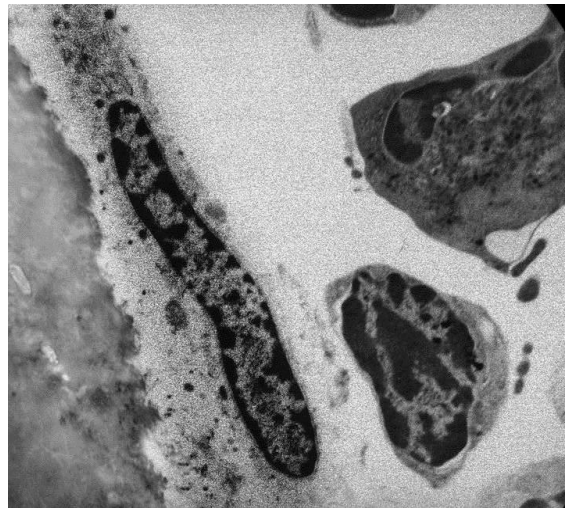


Рис. 4.10. Мікрофотографія електроннограми. Остеоцит з гіперхромним ядром. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

У щурів дослідної групи на поверхні кісткових трабекул розташовувалися остеобласти у стані спокою. Вони мали сплющену форму, невелике овальне ядро, поряд із загиблими клітинами (рис. 4.11 а, б).



а



б

Рис. 4.11. Мікрофотографії електроннограм. А) Остеобласт видовженої форми з лізосомами у цитоплазмі Збільшення 1000. Б) Загибель остеобласта. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 6000.

Спостерігали відсутність контактів між сусідніми остеобластами, клітини розташовувалися на відстані одна від одної. У багатьох клітин спостерігали ядра з хроматином конденсованим по його периферії. Деякі загиблі остеобласти знаходилися на поверхні кісткових трабекул (рис. 4.11, б). За умов нормального протікання процесів ремоделювання кісткової тканини, за резорбцією слідує стадія відновлення, а потім формування кісткової тканини остеобластами, але у цьому випадку, внаслідок загибелі остеобласта процес ремоделювання порушується та процес резорбції може переважати над формуванням, що призводить до втрати кісткової маси у майбутньому. Окремі остеобласти мали великі еухромні ядра, розвинену гЕПС, проте, на відміну від контрольної групи, в їх цитоплазмі відмічено наявність деструктивних порожнин різної локалізації та розміру, внаслідок руйнування окремих зон гЕПС що можливо свідчить про пригнічення біосинтетичної активності цих клітин, тобто їх участі у формуванні матриксу кісткової тканини (рис. 4.12, а). У деяких клітинах виявлені великі вакуолі заповнені рідиною, формування яких є ознакою гідропічної дистрофії (рис. 4.12, б)

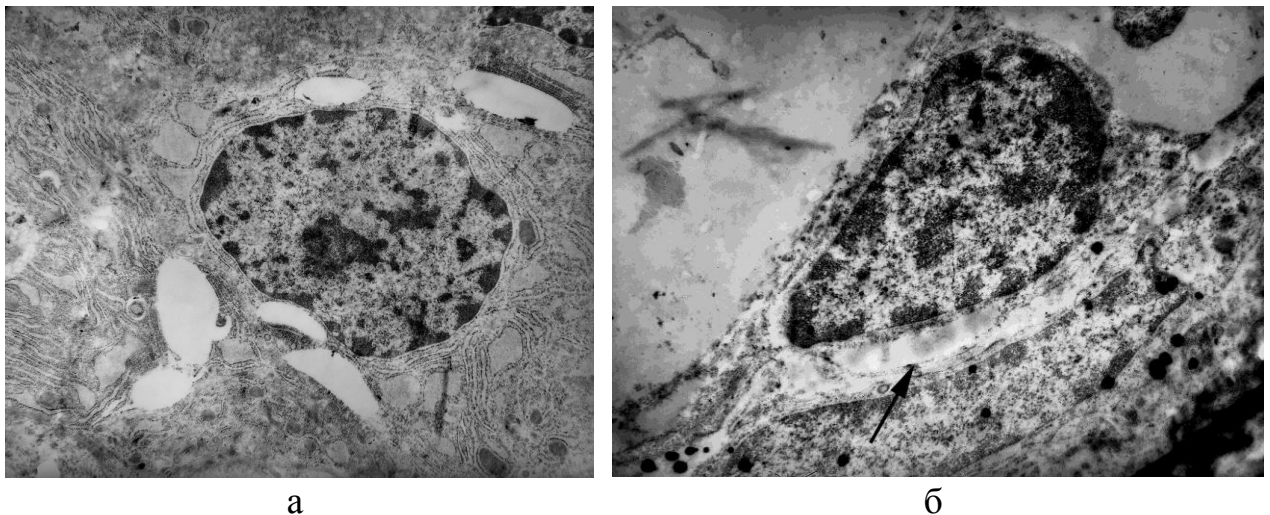


Рис. 4.12. Мікрофотографії електроннограм. Дистрофічні зміни в остеобластах. А) Деструктивні порожнини в цитоплазмі. Збільшення 6000. Б) Вакуолізація цитоплазми (стрілка). Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

У деяких остеобластах з добре розвиненою гЕПС виявляли набухлі мітохондрії з просвітленим матриксом та гомогенізованою структурою крист (рис. 4.13), що може свідчити про порушення зниження синтезу АТФ та окисного фосфорилування.

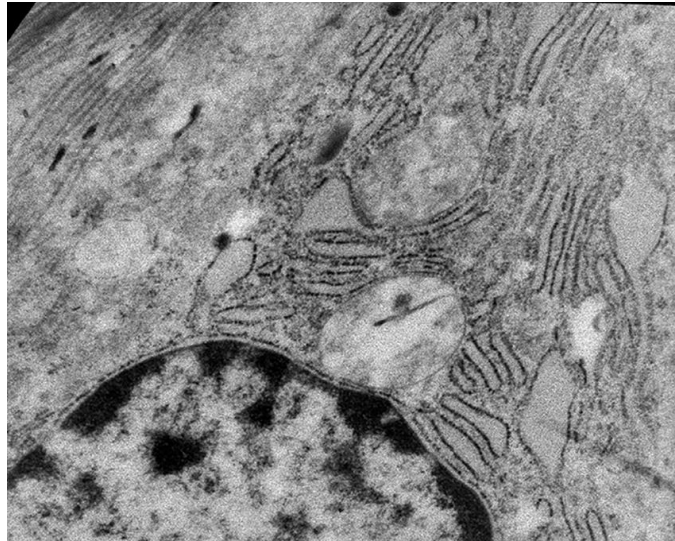


Рис. 4.13. Мікрофотографія електроннограми. Остеобласт з деструкцією мітохондрій та розвиненою гЕПС. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 15000.

У щурів дослідної групи на поверхні кісткових трабекул були виявлені функціонально активні остеокласти з гофрованою облямівкою, чого не спостерігалось в контролі, що свідчить про посилення резорбції. Ці клітини мали гіперхромні ядра з ядерцем, велику кількість мітохондрій та пухирців у цитоплазмі (рис. 4.14). Однак у цитоплазмі цих клітин виявляли мітохондрії з ознаками деструкції їх мембран. З огляду на те, що мітохондрії є органелами, в яких синтезується АТФ – сполука, що є джерелом енергії для клітин, їх руйнування можливо призводить до порушення функціонування таких активних клітин, як остеокласти. Крім того, деякі мітохондрії в цитоплазмі таких остеокластів були набряклими і мали включення, також в цитоплазмі зустрічалися залишкові тільця, які містять електронно-щільні гранули, що,

можливо, є результатом потрапляння всередину клітини свинцю внаслідок резорбційної активності остеокластів (рис. 4.15 а, б).

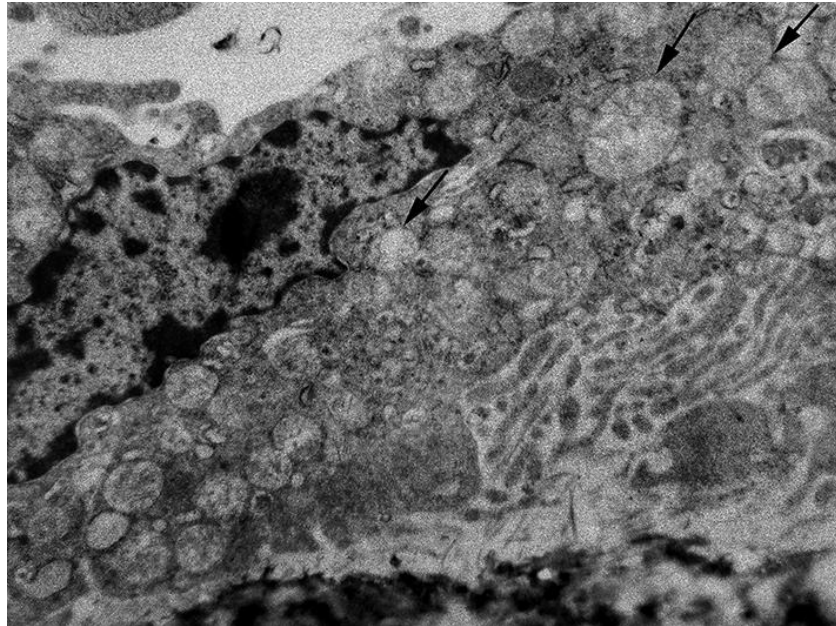


Рис. 4.14. Мікрофотографія електроннограми. Остеокласт на поверхні кісткової трабекули з гіпертрофованими мітохондріями (стрілки). Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 6000.

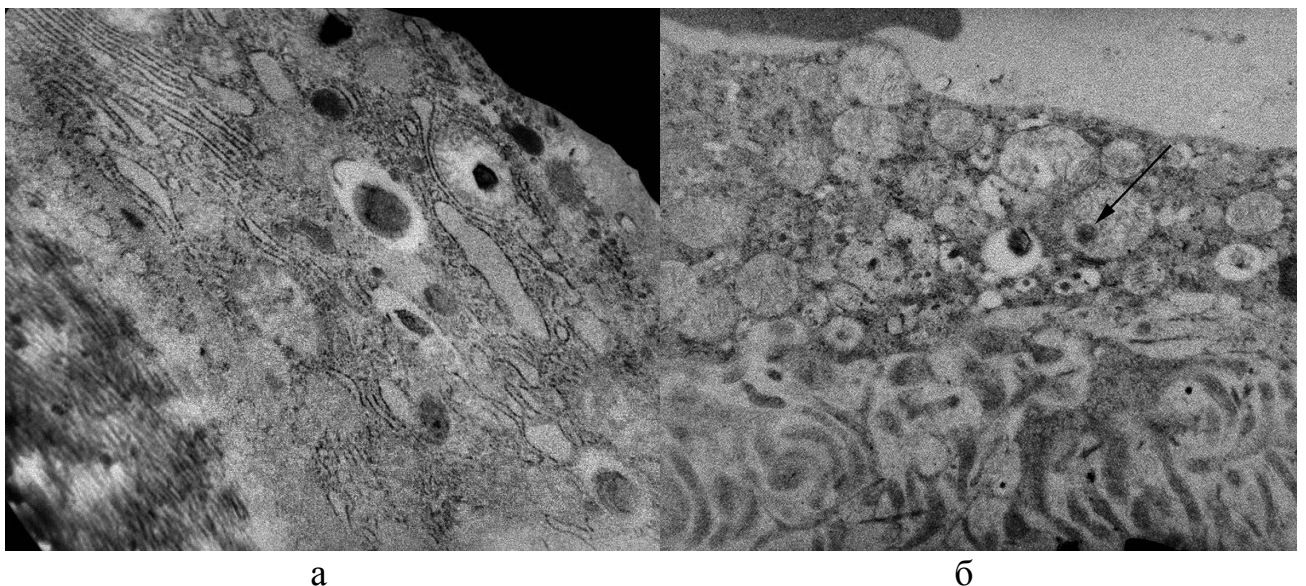


Рис. 4.15. Мікрофотографії електроннограм. Фрагменти остеокластів. А) Включення та залишкові тільця. Б) Фр. Рис. 4.14. Гофрована облямівка остеокласту, електронно-щільне включення у мітохондрії (стрілка). Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 15600.

Функціональна активність остеоцитів у тварин дослідної групи була різко знижена, про що свідчила редукція мембранних органел. Лакуни остеоцитів мали зазубрені контури, що вказувало на наявність остеолізису (рис. 4.16, а). Спостерігали збільшення кількості загиблих клітин (рис. 4.16, б). Матрикс мав нерівномірну мінералізацію, що може свідчити, як про порушення функції остеобластів, так і про недостатнє надходження кальцію у кісткову тканину, внаслідок конкурентного заміщення кальцію свинцем [91, 92], а також його можливість пригнічувати засвоєння поживних речовин з їжі [60].

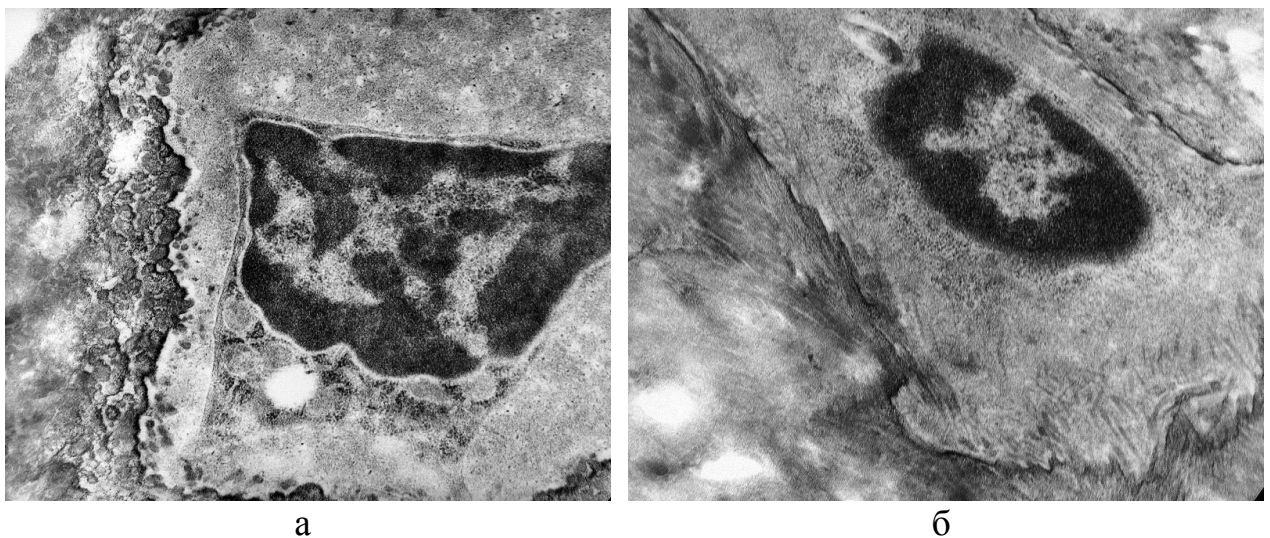


Рис. 4.16. Мікрофотографія електроннограми. Остеоцити в лакунах з зубчатим краєм. А) Остеоцит з округлою деструктивною порожниною в цитоплазмі. Збільшення 20400. Б) Некроз остеоцита. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 16800.

У компактній кістці під час електронномікроскопічного аналізу було виявлено велику кількість остеоцитів у стані некрозу. На ділянках спостерігали лізис клітинної мембрани. У інших клітин у цитоплазмі спостерігався підвищений вміст компонентів цитоскелету – мікротрубочок та мікрофіламентів. Також виявлялися остеоцити з гіперхромним ядром видовженої форми з вузькою обляміркою цитоплазми біля нього

(рис. 4.17, а). Їх цитоплазма містила велику кількість аутофагосом, з залишками частково деградованих органодів клітини, а також залишкові тільця. У окремих клітинах у стані некрозу спостерігалися поодинокі цистерни гЕПС (рис. 4.17, б).

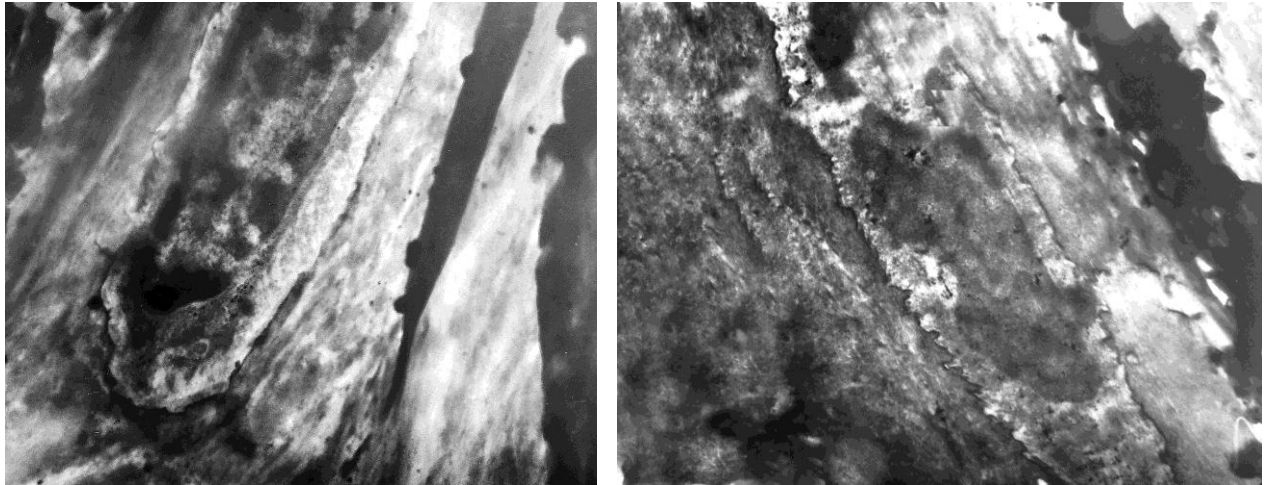


Рис. 4.17. Мікрофотографії електроннограм. Osteociti з дистрофічними змінами. А) Деградація органел. Збільшення 10000. Б) Некроз клітини. Збільшення 16500. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом.

Зустрічалися лакуни з виражено зазубреними контурами заповнені детритом (рис. 4.18). Матрикс компактної кісткової тканини, так само як і губчастої, мав нерівномірну електронну щільність, що свідчить про його невпорядковану мінералізацію.

Кісткова тканина є однією з головних мішеней для впливу свинцю, а також його джерелом в організмі, внаслідок спроможності цієї тканини до накопичення свинцю. У клінічних дослідженнях встановлено, що вплив свинцю викликає пригнічення процесу росту [33, 34, 54], але особливості процесів перебудови, що перебігають при цьому у тілах хребців є невивченими детально. Проведений гістологічний та електронномікроскопічний аналізи вказують, що вплив свинцю на тканини

тіл хребців у молодих щурів викликає схожі структурні зміни як у губчастій, так і в компактній кістковій тканинах.

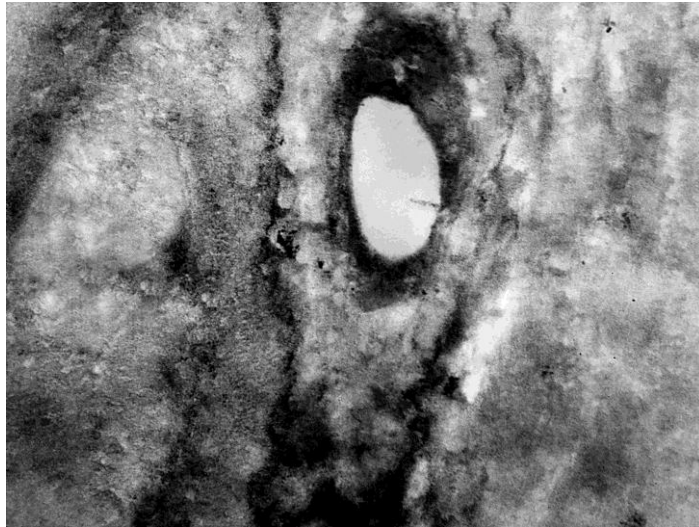


Рис. 4.18. Мікрофотографія електроннограми. Компактна кісткова тканина. Детрит остеоциту у лакуні з зазубреним краєм. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 25200.

Так, виявлено зниження висоти епіфізарного хряща, зниження площі губчастої кісткової тканини, ширини трабекул та збільшення ширини міжтрабекулярних просторів. У губчастій та компактній кістковій тканини визначено порушення процесу формування матриксу, про що свідчило наявність ділянок незрілої кісткової тканини у центральній частині тіл хребців, а також хаотичне розташування цементних ліній. Це було підтверджено під час ультрамікроскопічного дослідження, яке виявило нерівномірну електронну щільність кісткового матриксу, що свідчить про невідповідне розташування компонентів матриксу, та відповідає даним іншого експериментального дослідження на щурах, в якому було встановлено порушення структурних особливостей матриксу кісткової тканини у великогомілковій кістці [26].

Зафіксовано вплив свинцю на остеоцити кісткової тканини тіл хребців молодих щурів, що виражалось зниженням щільності клітини у губчастій та

компактній кістковій тканині, і підвищенням відносної кількості розширених лакун остеоцитів, при цьому у компактній кістковій тканині цей показник був вищим приблизно в 1,2 рази, ніж у губчастій. Зменшення життєздатних клітин у кістковій тканині порушує систему підтримки нормального функціонування цієї тканини. Це пов'язано з тим, що остеоцити виступають клітинами, які підтримують гомеостаз кістки, реагуючи на зовнішні сигнали та передаючи їх іншим клітинами, а також синтезуючи невелику кількість компонентів матриксу. Причиною зниження щільності остеоцитів може бути безпосередній вплив свинцю на ці клітини, а також опосередкований – шляхом дії на остеобласти, які є попередниками остеоцитів. Так, у щурів після впливу свинцю у остеоцитах виявлено редукцію мембранних органел та загибель клітин, а також ознаки остеолізу, що призводить до рарифікації кісткового матриксу на зменшує його міцність. У остеобластах спостерігали деструктивні зміни у вигляді формування порожнин та вакуолізацію цитоплазми. Зрідка зустрічалися і функціонально активні клітини.

У остеокластах відмічено формування електронно-щільних залишкових тілець та включень у мітохондріях, які, на нашу думку можуть бути місцем накопичення свинцю у цих клітинах, що сприяє порушенню їх структури. Синтез АТФ у мітохондріях є, за результатами експериментальних досліджень, регулятором резорбційної активності остеокластів. Встановлено, що зменшення внутрішньоклітинного вмісту мітохондріальної ДНК та АТФ призводить до посилення резорбційної активності остеокластів у мишей, а саме при дефіциті АТФ у клітині автори спостерігали прискорений апоптоз з одночасним зростанням активності кісткової резорбції, дослідники вважають це новим невивченим механізмом, який регулює виживаність остеокластів та їх резорбційну активність [155]. Отже, накопичення свинцю у мітохондріях, що зафіксовано і в іншому дослідженні [156], може призводити до пригнічення синтезу АТФ та посилення процесу резорбції.

Під час аналізу показників, що відображають ремоделювання кісткової тканини (ширина остеїду (формування) та відносна довжина поверхні

резорбції (резорбція)) вдалося встановити, що показник резорбції після впливу свинцю зріс, а показник формування – знизився, це свідчить про дисбаланс ремоделювання кісткової тканини через переважання процесу резорбції над формуванням. Встановлене зниження відносної площі хрящових островків у структурі кісткових трабекул свідчить про пригнічення росту тіл хребців, внаслідок його дії на епіфізарний хрящ, а також впливає на формування кісткової маси у молодих щурів та співпадає з результатами іншого експериментального дослідження по вивченню дії свинцю [26]. Отже, збільшення відносної довжини поверхні резорбції кісткових трабекул може свідчити з одного боку, про активізацію остеокластів, а з іншого – про неспроможність остеобластів до формування кісткової тканини на ділянках резорбції. Крім того посилення резорбції може бути пов'язано зі зменшенням щільності остеоцитів, бо відомо, що загибель остеоцитів активізує процес резорбції [157]

З огляду на результати експериментальних досліджень *in vitro*, в яких не було встановлено зниження кількості остеобластів [25, 26], припускаємо, що головною причиною дисбалансу процесу ремоделювання є деструктивні зміни в остеобластах. Однак, важливим ланкою у цьому процесі також може бути вплив свинцю на синтез АТФ у остеокластах через його дію на мітохондрії, що сприяє посиленню їх резорбційної активності.

4.1.2. Структурні особливості кісткової тканини тіл хребців щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом

Гістологічний аналіз. Контрольна група. Тіла хребців представлені апофізами, розміщеною нижче метафізарною спонгіозою та центральною частиною. Епіфізарний хрящ, розташований нижче апофізів, був виконаний гіаліновим хрящем і представлений характерними зонами: зоною спокою, яка містила поодинокі хондроцити видовженої форми. У зоні проліферації розташовані вертикальні колонки з декількох хондроцитів з великим ядром і вузьким обляміркою цитоплазми. Зона звапнування містила гіпертрофовані

та загиблі хондроцити. На ділянках виявлено порушення організації проліферативних колонок. Також виявлено формування вогнищ мінералізації, що вказує на заміщення кістковою тканиною епіфізарного хряща.

Безпосередньо під зоною росту кісткові трабекули формували великопетлясту сітку з осередками розрідження (рис. 4.19, а). Міжтрабекулярні простори були заповнені червоним кістковим мозком.

У центральній частині тіл хребців спостерігали великопетлясту трабекулярну сітку. Трабекули мали вигнуті контури, нерівні обриси, на ділянках ниткоподібно потоншувалися. Помітне зменшення щільності трабекул спостерігали в центральній частині тіл хребців.

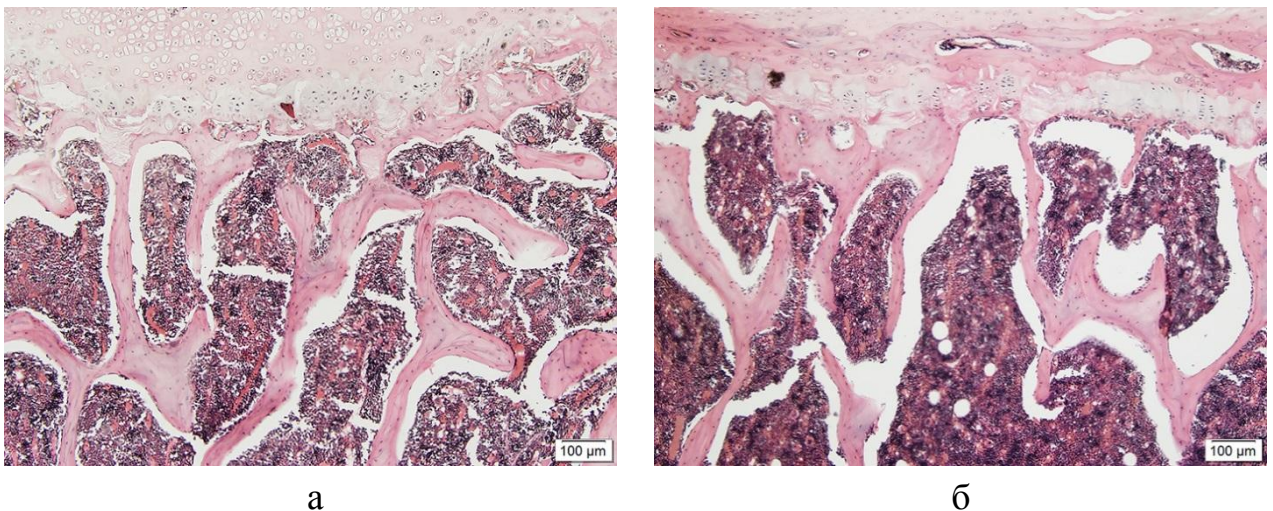


Рис. 4.19. Мікрофотографії зрізів тіл хребців. Губчаста кісткова щурів контрольної (а) і дослідної (б) груп. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення 100.

На крайових поверхнях трабекул відмічено лакуни резорбції. На ділянках зустрічалися трабекули зі сліпими закінченнями. Цементні лінії в кісткових трабекулах були нерівномірні за товщиною.

У кортексі тіл хребців компактна кісткова тканина була з рівномірною щільністю остеоцитів, цементні лінії на ділянках, як і в губчастій кістковій

тканині, нерівномірні за товщиною і розташовані неупорядковано. На різних ділянках спостерігали зменшення контактів кісткових трабекул з кортексом.

Дослідна група. Під час гістологічного аналізу в щурів дослідної групи в зоні проліферації епіфізарного хряща виявлені значні ділянки з порушенням формування колонок хондроцитів (рис. 4.20). Висота епіфізарного хряща знижена на 22,73 % порівняно з контролем (табл. 4.5).

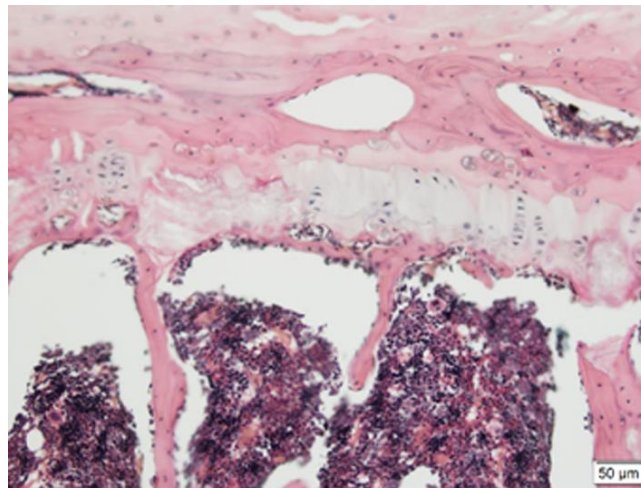


Рис. 4.20. Мікрофотографія зрізу тіла хребця. Фрагмент рис. 4.1 б. Порушення будови проліферативної зони епіфізарного хряща. Відсутність хондроцитів у стовпчиках на ділянках. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

Під зоною росту трабекули розміщувались на відстані одна від одної, їх щільність була низькою (рис. 4.19, б). Лише на окремих трабекулах відмічали тонкий шар остеїду. Міжтрабекулярні простори заповнені червоним кістковим мозком, проте спостерігали ділянки жовтого кісткового мозку (рис. 4.21), що може бути пов'язано з диференціацією мезенхімальних клітин в адипоцити замість остеобластів [26].

Дослідження структури губчастої кісткової тканини показало зниження її площі в 1,5 раза порівняно з контрольною групою, що було підтверджено морфометричними дослідженнями (табл. 4.5). У центральній частині тіл хребців спостерігали виражене зниження щільності трабекул, зустрічалися

поодинокі трабекули, які не утворювали трабекулярна сітку (рис. 4.21, 4.22)

Крім зниження площі губчастої кісткової тканини, було виявлено збільшення середньої відстані між трабекулами в 1,3 раза і зниження середньої ширини трабекул в 1,2 раза (табл. 4.5).

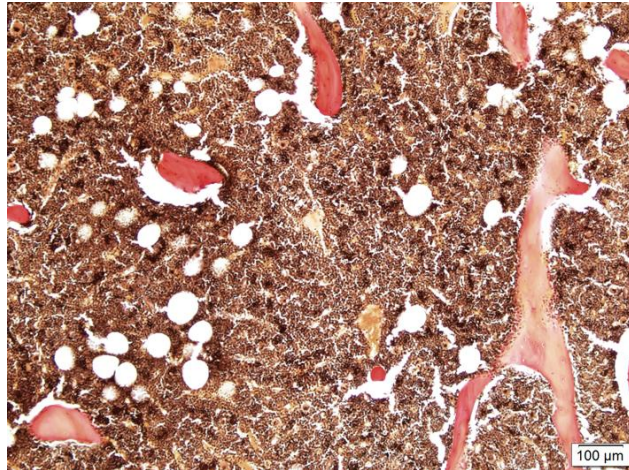


Рис. 4.21. Мікрофотографія зрізу тіла хребця. Центральної частина. Скупчення адипоцитів на ділянках у кістковому мозку. Дослідна група. Забарвлення за Ван Гізон. Збільшення 100.

Таблиця 4.5

Показники стану та ремоделювання губчастої кісткової тканини щурів з модельованим остеопорозом ($M \pm m$)

| Показники | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--|------------------|----------------|------|
| Загальна площа губчастої кістки (%) | 22,96 ± 1,23 | 15,63 ± 1,16 | 0,01 |
| Середня відстань між трабекулами (мкм) | 336,86 ± 7,37 | 443,83 ± 34,61 | 0,01 |
| Середня ширина трабекул (мкм) | 44,33 ± 1,00 | 38,16 ± 2,03 | 0,01 |
| Висота епіфізарного хряща (мкм) | 90,91 ± 2,12 | 70,25 ± 2,25 | 0,01 |
| Відносна довжина поверхні резорбції (%) | 11,51 ± 0,64 | 24,53 ± 3,13 | 0,01 |
| Ширина шару остеїду (мкм) | 7,11 ± 0,20 | 4,27 ± 0,43 | 0,01 |
| Відносна площа хрящових ділянок у кісткових трабекулах (%) | 3,89 ± 0,51 | 1,41 ± 0,45 | 0,02 |

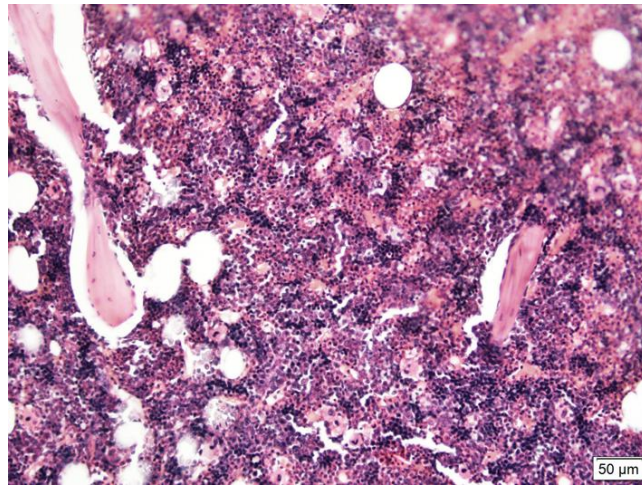
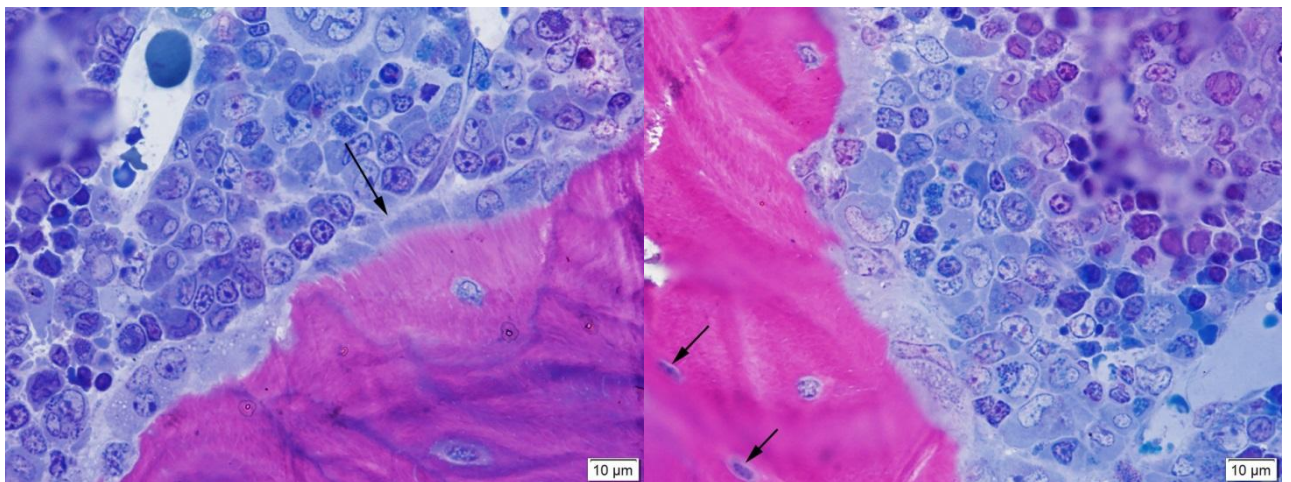


Рис. 4.22. Мікрофотографія зрізу тіла хребця. Центральна частина. Поодинокі трабекули. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

Вказані зміни свідчать про втрату губчастої кісткової тканини в тілах хребців тварин дослідної групи після впливу свинцю. У кісткових трабекулах клітини були розміщені на великій відстані одна від одної, а на поверхні трабекул часто зустрічалися резорбційні лакуни (рис. 4.23).

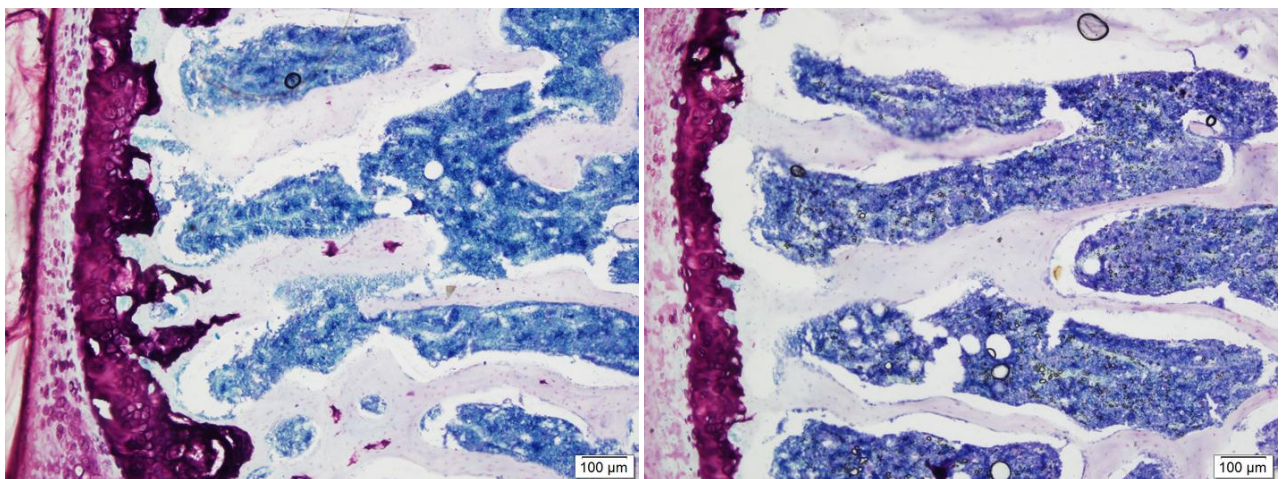


а

б

Рис. 4.23. Мікрофотографія зрізу тіла хребця. Губчаста кісткова тканина. Резорбційні лакуни на поверхні кісткових трабекул (а, б). Загибель остеобластів (стрілка) (а). Каріопікноз остеоцитів (стрілки) (б). Дослідна група. Забарвлення за Арагісіо. Збільшення 1000.

Для вивчення процесу ремоделювання кістки були виміряні показники відносної довжини поверхні резорбції до загальної довжини поверхні трабекул. Цей показник відображує активність процесу резорбції. Показник ширини шару остеоїду на поверхні кісткових трабекул відображує активність процесу формування кістки. Виявлено, що після впливу свинцю у тварин з модельованим остеопорозом був підвищений показник відносної довжини поверхні резорбції в 2,13 рази, а показник ширини шару новоутвореної кістки був знижений в 1,67 рази порівняно з контролем (табл. 4.5). Виявлені зміни вказують на переважання темпів резорбції кісткової тканини над процесом її формування. Крім того, встановлено зниження відносної площі хрящових островків у структурі кісткових трабекул 2,8 раза порівняно з контролем, що також свідчить про пригнічення формування кісткової тканини (рис. 4.24)

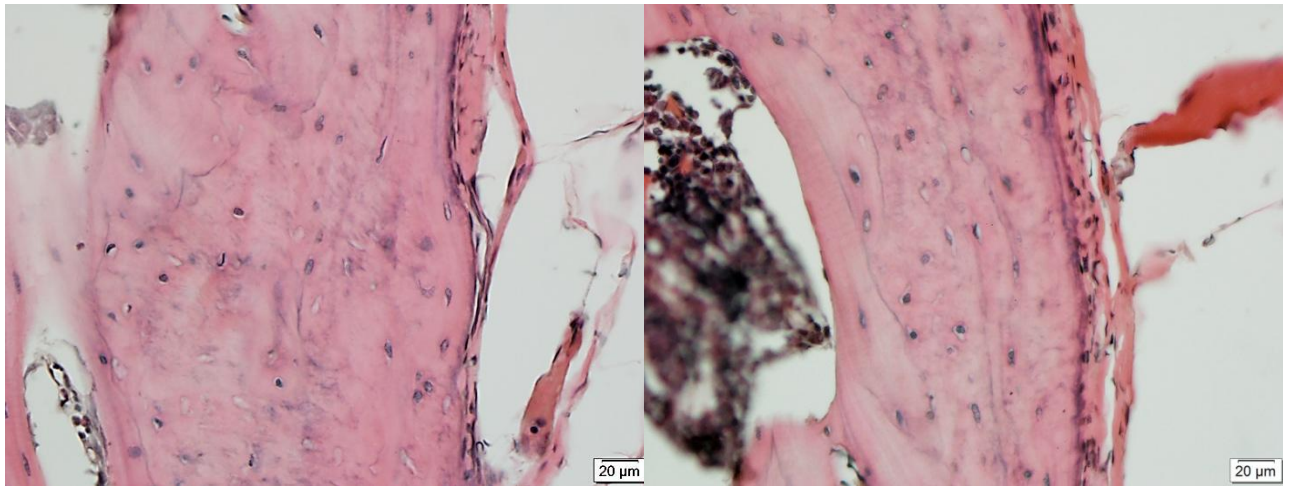


а

б

Рис. 4.24. Мікрофотографії зрізів тіла хребця. Губчаста кісткова тканина. Хрящові ділянки у структурі кісткових трабекул щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Забарвлення толуїдиновий синій. Збільшення 100.

У компактній кістковій тканині тварин дослідної групи спостерігали збільшення кількості порожніх лакун, що свідчить про загибель остеоцитів (рис. 4.25, а). Крім того лакуни остеоцитів розташовувалися нерівномірно, численна кількість була розширеною відносно розмірів клітин (рис. 4.25, б).



а

б

Рис. 4.25. Мікрофотографії зрізів тіла хребця. Компактна кісткова тканина. Порожні та розширені лакуни остеоцитів (а). Нерівномірне забарвлення матриксу (а, б). Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 400.

Цементні лінії на ділянках були розташовані нерівномірно та забарвлені неоднорідно або мали нечіткі контури, що може бути фактом порушення процесу кісткоутворення компакної кісткової тканини, зокрема процесів мінералізації.

Вимірювання щільності остеоцитів у губчастій кістковій тканині щурів після дії свинцю виявило зниження цього показника в 1,2 раза, а у компактній кістковій тканині – в 1,3 раза порівняно з контрольною групою (табл. 4.6). Аналіз відносної кількості розширених лакун остеоцитів у компактній кістковій тканині показав підвищення їх чисельності в 1,98 рази порівняно з контролем, тоді як у губчастій кістці різниці не було виявлено.

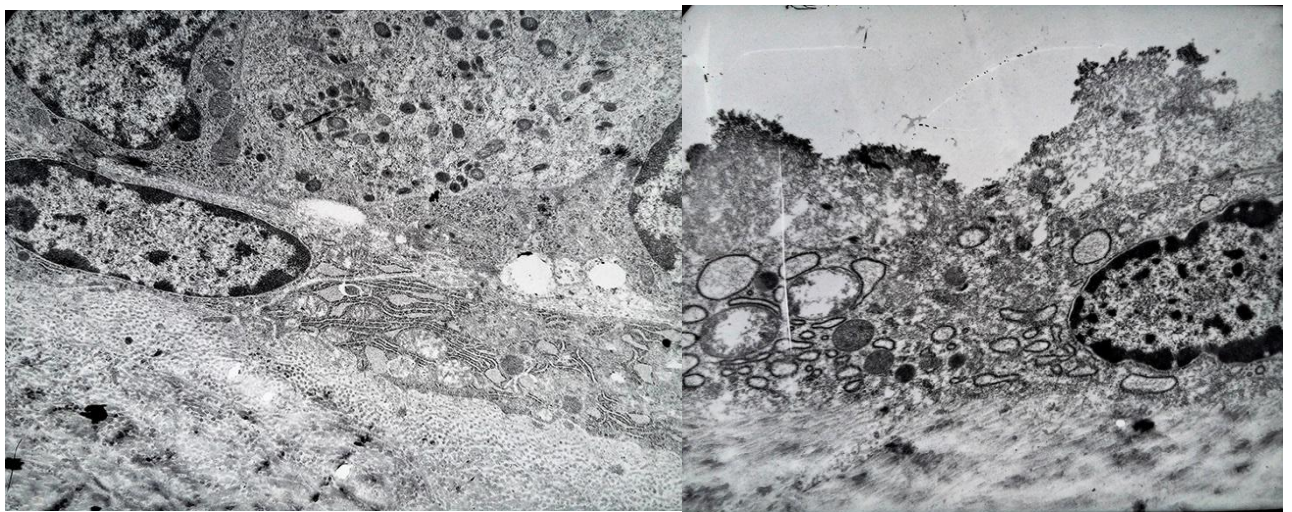
Електронномікроскопічний аналіз губчастої кісткової тканини *контрольної групи* тварин показав, що на поверхні трабекул зустрічалися остеобласти, але великі ділянки на їх поверхні були без клітин або вкриті неактивними остеобластами, що мали сплюснену форму та округле еухромне ядро. Активні остеобласти мали видовжену форму та гетерохромне ядро з чітко контурованою двошаровою мембраною. В цитоплазмі таких клітин

виявляли гЕПС з великою кількістю цистерн, деякі з них були розширені та заповнені продуктами біосинтезу (рис. 4.26, а).

Таблиця 4.6

Щільність остеоцитів кісткової тканини тіл хребців щурів з модельованим остеопорозом ($M \pm m$)

| Параметри | Контрольна група | Дослідна група | P |
|---|---------------------|---------------------|------|
| Губчаста кісткова тканина | | | |
| Щільність остеоцитів (у мм^2) | $1235,32 \pm 39,50$ | $1026,57 \pm 42,85$ | 0,17 |
| Розширені лакуни остеоцитів (%) | $16,73 \pm 1,24$ | $20,50 \pm 2,34$ | 0,01 |
| Компактна кісткова тканина | | | |
| Щільність остеоцитів (у мм^2) | $1169,01 \pm 49,42$ | $928,11 \pm 53,33$ | 0,01 |
| Розширені лакуни остеоцитів (%) | $16,53 \pm 1,85$ | $32,89 \pm 2,95$ | 0,01 |



а

б

Рис. 4.26. Мікрофотографії електроннограм. Остеобласти щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп на поверхні кісткових трабекул. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 6000.

гЕПС займала велику частину площі цитоплазми, що свідчить про біосинтез остеобластами білків кісткової тканини. На ділянках, в цитоплазмі таких клітин розташовувалися безструктурні зони. Поблизу таких зон траплялись вторинні лізосоми, всередині яких визначали фрагменти

неперетравлених органел клітини. Це може свідчити про очищення ними цитоплазми від пошкоджених компонентів, також на це вказувала наявність у деяких клітин поодиноких залишкових тілець, які є результатом неперетравлених лізосою продуктів або пошкоджених компонентів клітини. В остеобластах виявляли велику кількість мітохондрій, деякі з яких були набухлі.

Остеокласти на поверхні трабекул траплялися зрідка, мали 3-5 гіперхромних ядер та велику кількість вакуолей. Зустрічалися попередники остеокластів, які мали 2-3 ядра та не були прикріплені до поверхні трабекул, а розташовувалися поблизу.

Остеоцити розташовувалися в лакунах, що мали на ділянках зубчасті контури, що може вказувати на процес остеоцитарного остеолізу. Остеоцити мали велике гіперхромне ядро, цитоплазму з невеликою кількістю органел (поодинокі цистерни гЕПС, мітохондрії та вакуолі). Траплялися остеоцити з мітохондріями зі зруйнованими кристами.

У результаті аналізу компактної кісткової тканини контрольної групи щурів виявлено остеоцити, які розташовані у різних за формами лакунах (рис. 4.27, а). У деяких клітин контури лакун були зубчасті.

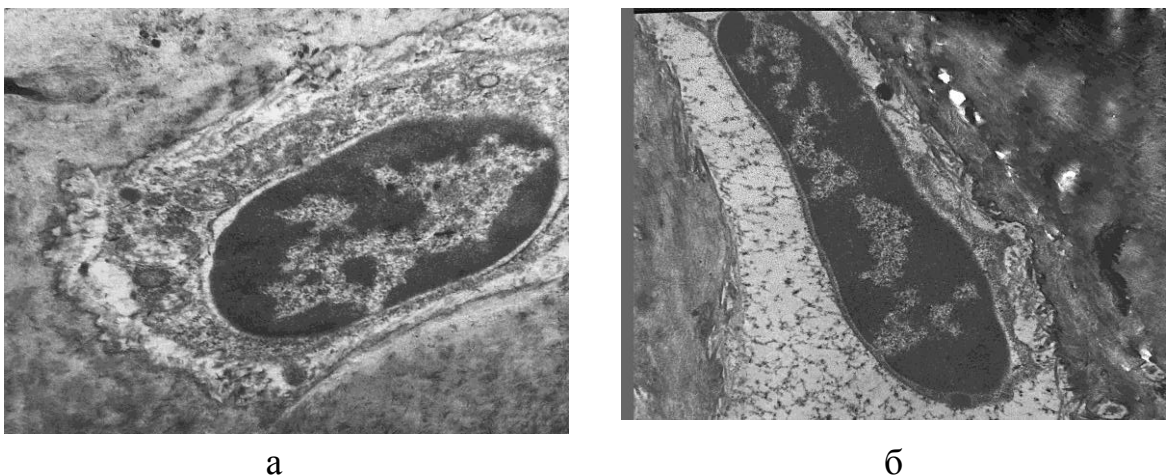


Рис. 4.27. Мікрофотографії електроннограм. Остеоцити щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення: а) 10000; б) 8000.

У цитоплазмі зустрічалися великі за розмірами мітохондрії, іноді зі зруйнованими кристами та нечіткими контурами мембран. Також були присутні вторинні лізосоми. В переважній більшості клітин у цитоплазмі переважали мікротрубочки та мікрофіламенти, що може свідчити про зниження функціональної активності остеоцитів, внаслідок редукції органел, які виконують біосинтетичні функції. Матрикс мав однорідну будову з розташованими поодинокими каналцями відростків остеоцитів.

Під час аналізу губчастої кісткової тканини у *дослідній групі* тварин траплялися поодинокі остеобласти, що мали видовжену форму та розміщувалися на поверхні кісткових трабекул. Такі остеобласти мали в цитоплазмі велику кількість різних за розмірами розширених цистерн гЕПС з чітко контурованими рибосомами на поверхні. Однак, цитоплазматична мембрана цих клітин не мала чітких контурів, а на ділянках була зовсім відсутня, що вказує на загибель остеобластів (рис. 4.26, б). Крім того, в цитоплазмі зустрічалися збільшені у розмірах мітохондрії зі зруйнованими кристами (рис. 4.28).

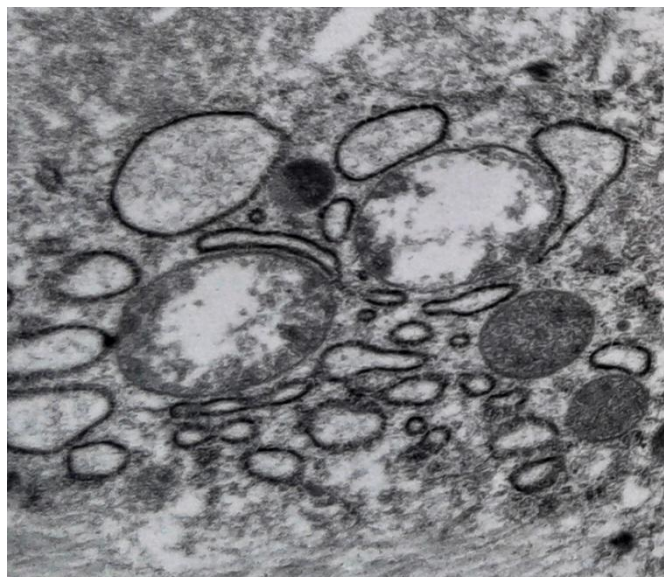


Рис. 4.28. Мікрофотографія електроннограми. Фр. рис. 4.26 б. Гіпертрофія мітохондрій та руйнування структури крист остеобласта. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 24000.

Також спостерігали велику кількість різних за розмірами електроннощільних вторинних лізосом. Деякі з остеобластів мали зруйновану плазматичну мембрану, у таких клітин спостерігали виражений набряк мітохондрій та поодинокі каналці гЕПС (рис. 4.29).

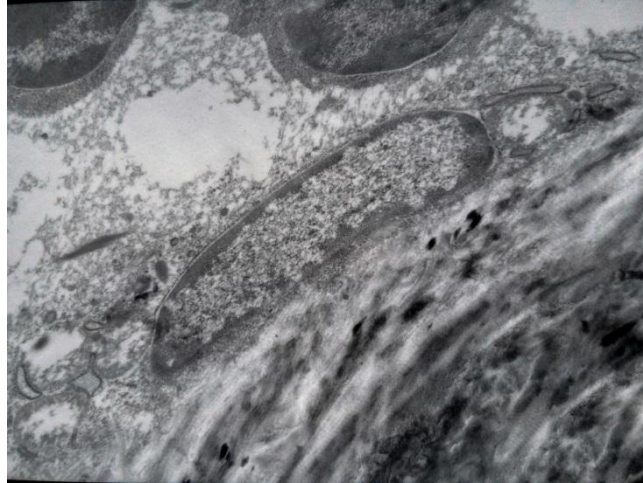


Рис. 4.29. Мікрофотографія електроннограми. Остеобласт на поверхні трабекули. Гіпертрофовані мітохондрії. Втрата чіткості контурів цитоплазматичної мембрани. Нерівномірна електронна щільність кісткового матриксу. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

Зустрічалися остеобласти з цитоплазмою, в якій переважали мікротрубочки та мікрофіламенти поряд з поодинокими невеликими вторинними лізосомами, що не характерно для цитоплазми такої функціонально-активної клітини як остеобласт (рис. 4.30 а, б). Ядра остеобластів мали зруйновану на ділянках двоконтурну мембрану. Спостерігалися остеобласти з ознаками некрозу або клітинний детрит.

Остеокласти за структурною організацією не відрізнялися від клітин контрольної групи тварин. Однак у їх цитоплазмі зустрічали залишкові тільця з електроннощільним вмістом, що є можливою ознакою накопичення свинцю у клітині (рис. 4.31).

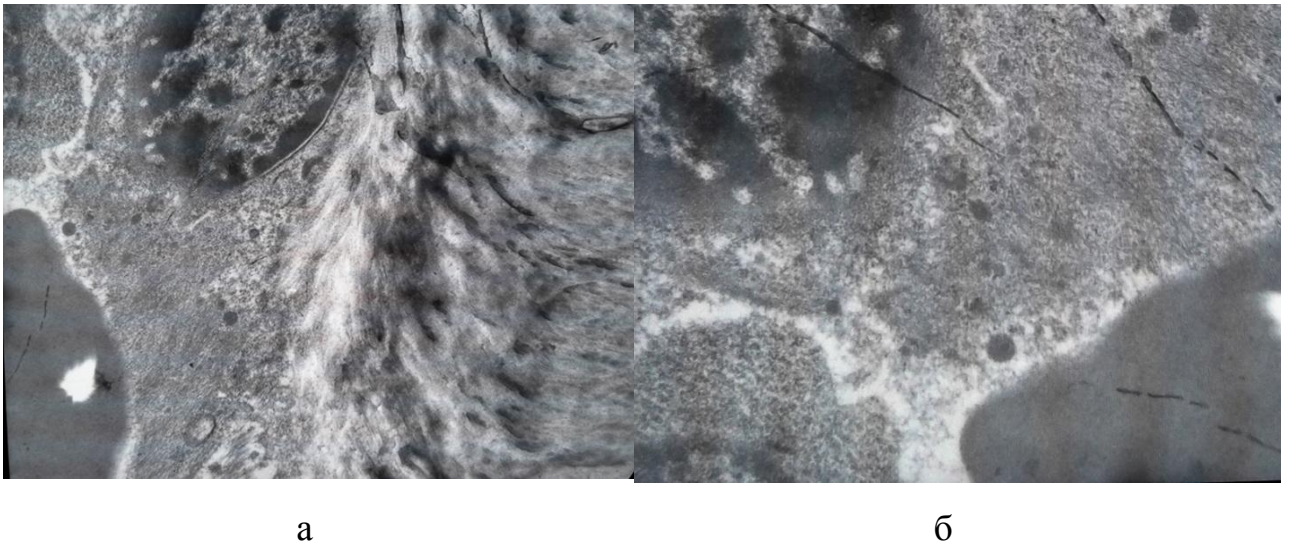


Рис. 4.30. Мікрофотографії електроннограм. А) Загибель остеобласта на поверхні трабекули (а). Переважання у цитоплазмі клітини компонентів цитоскелету. Збільшення 8000. Б) Фр. Рис. 4.30 а. Порушення цілості цитоплазматичної та ядерної мембран. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 16000.

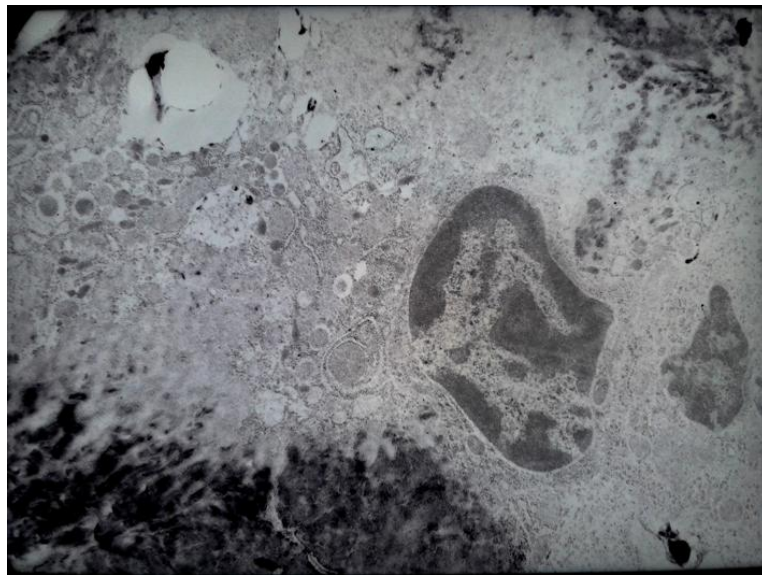


Рис. 4.31. Мікрофотографія електроннограми. Остеокласт з 2 ядрами на поверхні кісткової трабекули. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

Остеоцити в губчастій кістковій тканині дослідної групи тварин мали гіперхромні ядра, розміщувалися у лакунах з зубчастими краями (рис. 4.32).

Цитоплазма таких клітин була представлена в переважній більшості мікротрубочками та мікрофіламентами, що свідчить про низьку функціональну активність клітини. Крім того траплялися клітини з підвищеним вмістом вакуолей у цитоплазмі, що є ознакою дистрофічних змін. Також траплявся детрит в лакунах.

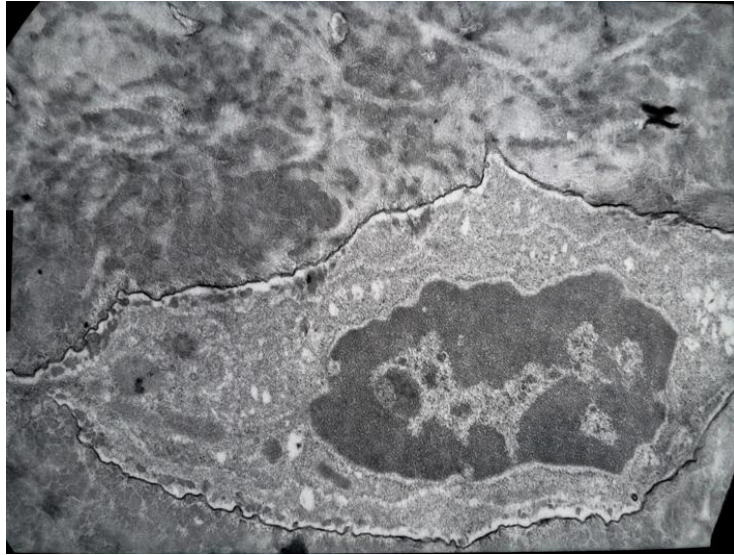


Рис. 4.32. Мікрофотографія електроннограми. Остеоцит у лакуні. Переважання компонентів цитоскелету в цитоплазмі клітини. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

У компактній кістковій тканині дослідних щурів остеоцити мали гіперхромні ядра та розміщувалися у лакунах значно розширених відносно розмірів остеоцитів, що може бути результатом активного процесу остеоцитарного остеолізу (рис. 4.28, б). Цитоплазма остеоцитів була бідною на органели та у більшості клітин переважали компоненти цитоскелету, іноді зустрічалися великі вторинні лізосоми (рис. 4.33). Траплялися лакуни з голкоподібними контурами, які містили детрит. Також у матриксі компактної кістки зустрічалися великі за розмірами порожнини з безструктурними масами, що мали контури схожі на контури лакун остеоцитів, які зазнали дії остеоцитарного остеолізу (рис. 4.34).



Рис. 4.33. Мікрофотографія електроннограми. Остеоцит у лакуні. Нерівні контури лакуни. Мікротрубочки та мікрофіламенти у цитоплазмі клітини. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

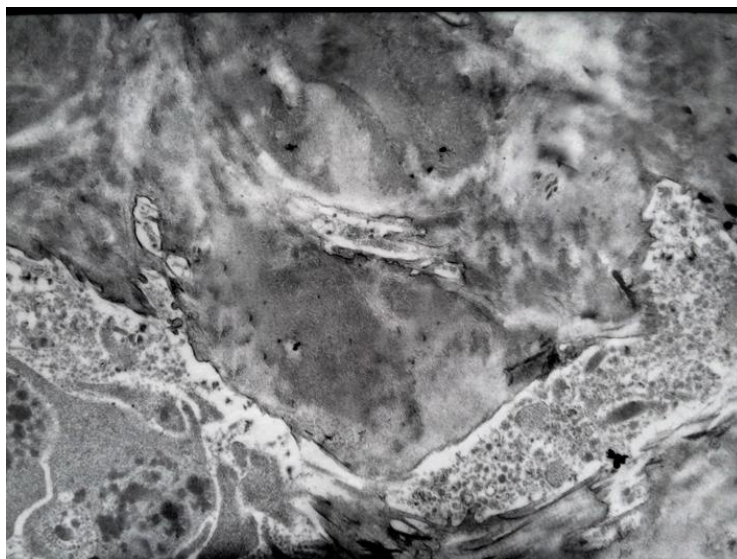


Рис. 4.34. Мікрофотографія електроннограми. Порожнина у матриці компакної кісткової тканини. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

Це може бути результатом резорбційної дії остеокластів, що є реакцією на загибель остеоцитів. Матрикс мав неоднорідну будову, часто траплялися електронно-щільні ділянки, які межували з ділянками з розрідженим матриксом.

Таким чином, у результаті гістологічного та електронномікроскопічного аналізу впливу свинцю на тіла хребців щурів з модельованим остеопорозом встановлені деструктивні зміни різного прояву у губчастій та компактній кістковій тканинах. Встановлено, що губчастій кістковій тканині вплив свинцю призводить до зниження площі та ширини трабекул, а також розширення міжтрабекулярних просторів, що вказує на втрату кісткової маси у тілах хребців. Отримані результати узгоджуються з іншим експериментальним дослідженням, в якому на щурів впливали більш низькою концентрацією свинцю (50 мг/л), але протягом усього їхнього життя [26]. У результаті автори виявили виражене зниження кісткової маси, а також пригнічення формування губчастої кістки. Крім того, у одному з малочисельних на сьогодні досліджень щодо впливу свинцю на оваріоектомованих щурів було встановлено зниження об'єму губчастої кісткової тканини у стегновій кістці, аналогічно отриманим нами результатам у тілах хребців [21]. Виявлено наявність впливу свинцю на епіфізарний хрящ, що проявлялось зниженням ширини епіфізарного хряща, а також порушенням у структурі проліферативних стовпчиків, аж до повної їх відсутності на чималих ділянках. Це пояснюється особливістю функціонування зони росту у щурів, яка повністю не закривається, але її активність зменшується після 10-міс. віку [135].

Вплив свинцю на остеоцити як у губчастій, так і у компактній кістковій тканині призводить до зменшення їх чисельності, з вірогідним зростанням кількості розширених лакун тільки у компактній кістці. При цьому у остеоцитах обох типів кісткової тканини під впливом свинцю відбуваються аналогічні деструктивні зміни, а саме: переважання у цитоплазмі компонентів цитоскелету та вакуолізація цитоплазми, що призводить в результаті до загибелі клітини, про що свідчили виявлений детрит у лакунах. Крім того, у щурів з модельованим остеопорозом спостерігали посилення остеоцитарного остеолізису у компактній кістковій тканині, що підтверджено, як морфометрично, так і на ультраструктурному рівні, та

виражалось формуванням лакун резорбційного типу. Отже, можна припустити, що остеоцити компактної кісткової тканини тіл хребців щурів більш чутливі до дії свинцю, ніж у губчастій кістковій тканині, що можливо пояснюється здатністю компактної кістки до більшого утримання свинцю у структурі через повільніше ремоделювання. Відомо, що остеоцитарний остеолізис викликає демінералізацію кісткового матриксу, тим самим зменшуючи його міцність [158]. У недавньому дослідженні на мишах було встановлено, що резорбційна активність остеоцитів розповсюджується не тільки в межах лакуни, але й у всій мережі їх каналців без участі остеокластів, зменшуючи кісткову масу та міцність кістки [159].

У остеобластах також зафіксовано деструктивні зміни під впливом свинцю, а саме руйнування клітинної мембрани, порушення організації гЕПС, гіпертрофію мітохондрій з лізисом крист, збільшення кількості вторинних лізосом у цитоплазмі. Ці зміни свідчать про пригнічення біосинтетичної та енергетичної функцій цих клітин, що підтверджується виявленим морфометрично зниження ширини остеоїду.

У остеокластах не виявлено структурних змін після впливу свинцю, але встановлено посилення резорбції у губчастій кістковій тканині, що виражалось у зростання довжини поверхні резорбції кісткових трабекул. Посилення резорбції можна пояснити загибеллю остеоцитів у кістковій тканині, бо, як відомо, остеоцити виділяють при загибелі RANKL навіть у більшій кількості, ніж остеобласти, та таким чином стимулюють остеокластогенез та пригнічують остеобластогенез [158, 160]. Отже у щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом після впливу свинцю відбувається посилення резорбції та пригнічення формування кісткової тканини, внаслідок деструктивних змін в остеобластах та остеоцитах, що призводить до порушення цілісності та міцності кісткового матриксу.

Отримані результати вказують, що свинець може прискорювати розвиток остеопоротичних змін. Крім того, з урахуванням експериментальних досліджень, в яких підтверджено роль свинцю в

пригніченні загоєння переломів [25, 131], перебіг репаративного остеогенезу може бути порушений на фоні остеопорозу і в результаті впливу свинцю, накопиченого в кістці протягом життя.

4.1.3 Порівняльний аналіз впливу свинцю на кісткову тканину тіл хребців щурів різного віку

Порівнюючи отримані результати дослідження кісткової тканини тіл хребців щурів молодого віку в період активного росту та тварин зрілого віку з модельованим остеопорозом встановлено певні схожі та відмінні особливості впливу свинцю на цю тканину.

Так, спостерігали зниження усіх вимірюваних показників кісткової тканини та висоти епіфізарного хряща у щурів обох дослідних груп, але з більшим проявом в групі молодих тварин. Особливо виразне зниження у молодих щурів порівняно з щурами з остеопорозом зафіксовано для показників площі губчастої кістки (в 1,75 та 1,47 раза, відповідно), ширини міжтрабекулярних просторів (в 1,56 та 1,32 раза, відповідно) та відносної кількості розширених лакун у компактній кістці (в 1,99 та 11,69 раза, відповідно). Крім того, у щурів з остеопорозом не виявлено підвищення кількості розширених лакун у губчастій кістковій тканині, тоді як у молодих щурів це було доведено. До того ж у щурів з остеопорозом більше 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 тим, що більша частина свинцю в організмі накопичується у компактній кістковій тканині, а з віком його концентрація в ній суттєво зростає [81].

У щурів обох дослідних груп встановлено пригнічення формування кісткової тканини та посилення резорбції. Показник довжини поверхні резорбції у молодих щурів був вищим, ніж у щурів з остеопорозом, що можливо пояснює більшу втрату кісткової маси у молодому віці. Крім того, 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. У щурів з остеопорозом структурних змін в остеокластах після дії свинцю не було виявлено. З іншого боку підвищення загиблих остеоцитів, що зафіксоване в обох групах може бути причиною посилення резорбції [157].

Однак показник формування кісткової тканини у щурів з остеопорозом був більш зниженим порівняно з молодими щурами (в 1,67 та 1,59 рази, відповідно). Однією з причин може бути збільшення кількості адипоцитів, виявлене у кістковому мозку щурів з остеопорозом, що можливо пов'язано з диференціацією мезенхімальних клітин в адипоцити замість остеобластів та впливає на формування кісткової тканини [26].

В остеобластах молодих щурів було виявлено формування деструктивних порожнин, вакуолізацію цитоплазми, однак зрідка зустрічалися і функціонально активні клітини, а у щурів з остеопорозом спостерігали руйнування клітинної мембрани, порушення структури гЕПС та збільшення кількості вторинних лізосом у цитоплазмі. Це можливо свідчить про різні механізми впливу свинцю на остеобласти з огляду на різні прояви деструктивних змін у клітинах. В обох групах спостерігали остеобласти з вираженим набряком мітохондрій та зруйнованою структурою крист, що можна пояснити тим, ці органоїди найпершими реагують на патологічні зміни у клітині зміни у випадку інтоксикації [161] Про порушення функціонування остеобластів також свідчила виявлена нерівномірність структури кісткового матриксу в обох групах.

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 остеолізу в обох групах.

4.2 Гістологічний аналіз з ультрамікроскопією міжхребцевих дисків щурів різного віку

4.2.1 Структурні особливості міжхребцевих дисків молодих щурів

Гістологічний аналіз. У контрольній групі міжхребцевий диск був представлений фіброзним кільцем, що оточує драглисте ядро, в центральній частині якого розташована синцитієподібна структура. Волокнисте кільце складалося з зовнішнього відділу було виконане рядами паралельно розташованих пластинок з пучків колагенових волокон між якими розташовувалися волокна з кутовою орієнтацією, які звужувалися по мірі наближення до драглистого ядра (рис. 4.35).

У зовнішньому відділі волокнистого кільця поміж колагенових волокон були розташовані фіброхондроцити витягнутої форми, орієнтовані паралельно розташуванню пучків колагенових волокон.

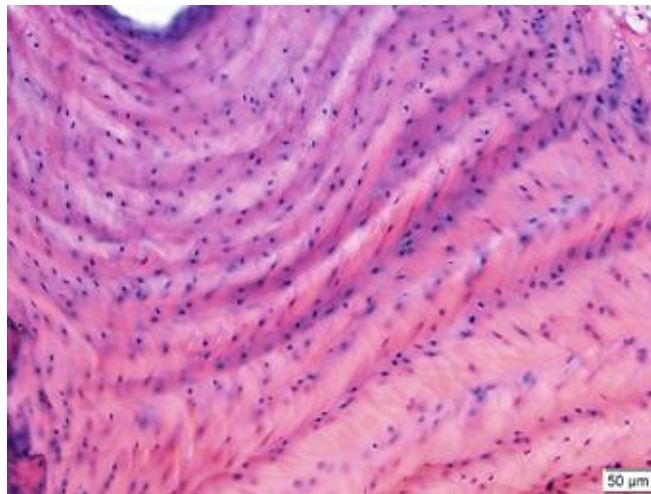


Рис. 4.35. Мікрофотографія зрізу міжхребцевого диску. Волокнисте кільце. Пластинчаста структура волокнистого кільця міжхребцевого диску. Контрольна група. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення 200.

Внутрішній відділ волокнистого кільця виконаний кількома пластинками, які були звужені в порівнянні з пластинками зовнішнього відділу, проте чіткого поділу зовнішнього і внутрішнього відділу не спостерігалось. З наближенням до драглистого ядра пластинки ставали більш

пухкими і втрачали пластинчасту структуру. Клітини внутрішнього відділу фіброзного кільця були представлені хондроцитами та мали більший розмір у порівнянні з фіброхондроцитами.

Драглисте ядро було представлено синцитієподібною структурою розташованою в центрі міжхребцевого диску та оточеною численними цитоплазматичними відростками нотохордальних клітин, які мали вакуолізовану цитоплазму і велике ядро (рис. 4.36, а).

Під час гістологічного аналізу у тварин *дослідної групи* в волокнистому кільці було виявлено ознаки дегенеративних змін. У міжхребцевому диску тварин *дослідної групи* зафіксовано розшарування пучків колагенових волокон у пластинах волокнистого кільця, а також формування тріщин волокон (рис. 4.37, а). Особливо великі тріщини розташовувалися між пластинками в хрящових прошарках (рис. 4.37, б). Місцями відмічені вогнища некротично зміненого матриксу. У ділянках порушеної структури пластин колагенових волокон волокнистого кільця розташовувалися хондроцити з пікнотичними ядрами (рис. 4.37, б).

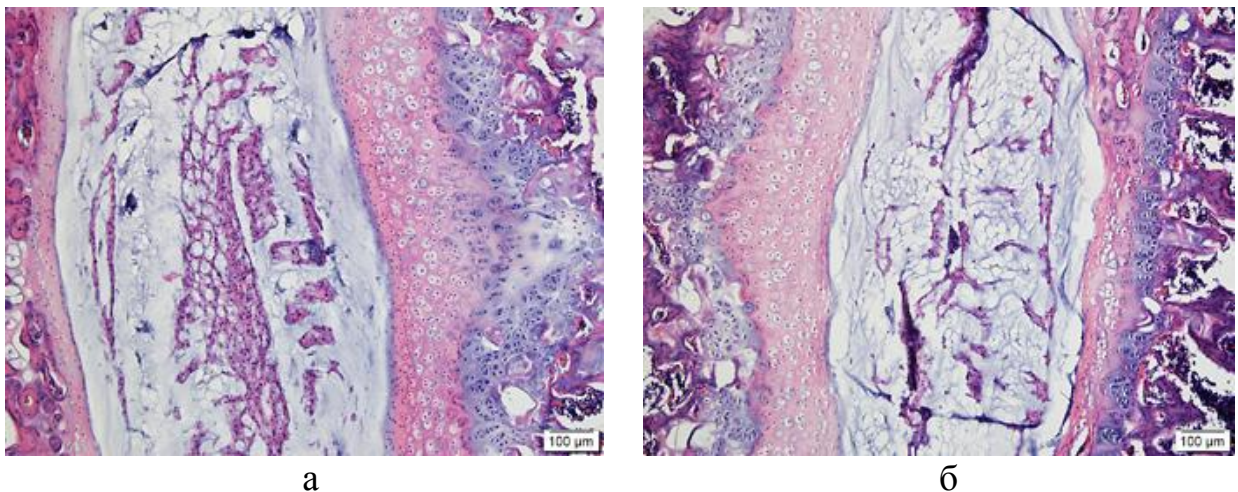
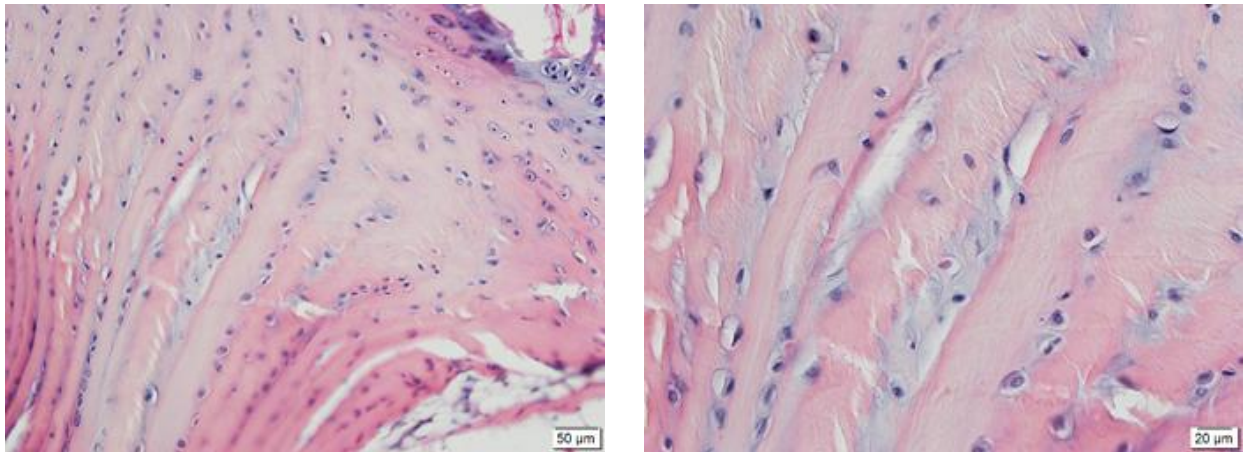


Рис. 4.36. Мікрофотографії зрізів міжхребцевого диску. Драглисте ядро. А) Контрольна група. Б) Дослідна група. Фрагментація синцитієподібною структурою. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 100.



а

б

Рис. 4.37. Мікрофотографії зрізів міжхребцевого диску. Зовнішній відділ волокнистого кільця. Розшарування пучків колагенових волокон у пластинках. А) Тріщини у повздовжньому та поперековому напрямі в структурі волокнистого кільця. Збільшення 200. Б) Фрагмент рис. 4.37 а. Тріщини поміж пластинами волокнистого кільця. Хондроцити з пікнотичними ядрами поблизу тріщин. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 400.

Крім того серед переважної більшості фіброцитів траплялися типові хрящові клітини – хондроцити у капсулах, що свідчить про порушення специфічного фенотипу клітин міжхребцевого диску у цій зоні. У внутрішньому шарі волокнистого кільця тварин, як контрольної, так і дослідної груп розташовувалися хондроцити, що характерно для структури міжхребцевого диску щурів у нормі.

Проведення вимірів висоти міжхребцевого диску щурів дало змогу встановити, що у щурів після впливу свинцю спостерігається зменшення цього показника на 12,2 % у крайових відділах та на 10 % у центральній частині (табл. 4.7).

Також встановлено зниження ширини пластинок колагенових волокон у волокнистому кільці на 8 % при порівнянні з контролем (табл. 4.8). Щільність фіброхондроцитів у пластинах волокнистого кільця

міжхребцевого диску дослідних тварин була нижчою на 12 % за аналогічні показники у контрольних тварин (табл. 4.8).

Таблиця 4.7

Показники висоти міжхребцевого диску молодих щурів ($M \pm m$)

| Місце вимірювання | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--------------------------|--------------------|--------------------|------|
| Крайові відділи (мкм) | $898,77 \pm 13,82$ | $789,41 \pm 14,39$ | 0,01 |
| Центральна частина (мкм) | $720,80 \pm 15,04$ | $648,67 \pm 17,76$ | 0,01 |

Таблиця 4.8

Морфометричні параметри міжхребцевих дисків молодих щурів ($M \pm m$)

| Параметри вимірювання | Контрольна група | Дослідна група | P |
|---|---------------------|---------------------|------|
| Ширина пластинок волокнистого кільця (мкм) | $36,28 \pm 0,16$ | $33,37 \pm 0,20$ | 0,01 |
| Щільність фіброхондроцитів ($у \text{ мм}^2$) | $1897,78 \pm 35,68$ | $1669,35 \pm 28,20$ | 0,01 |
| Щільність нотохордальних клітин у драглистому ядрі ($у \text{ мм}^2$) | $4693,46 \pm 87,46$ | $3557,01 \pm 45,76$ | 0,01 |

У внутрішньому відділі волокнистого кільця дослідних тварин пластинчата структура була менш виражена. Поміж тонкими колагеновими пластинками спостерігали тріщини, деякі хондроцити поблизу них мали пікнотичні ядра (рис. 4.38).

В місцях тріщин відмічено відмічено глибокий розпад міжклітинної речовини. Поряд з цими ділянками виявляли одиничні великі ізогенні групи клітин (рис. 4.39).

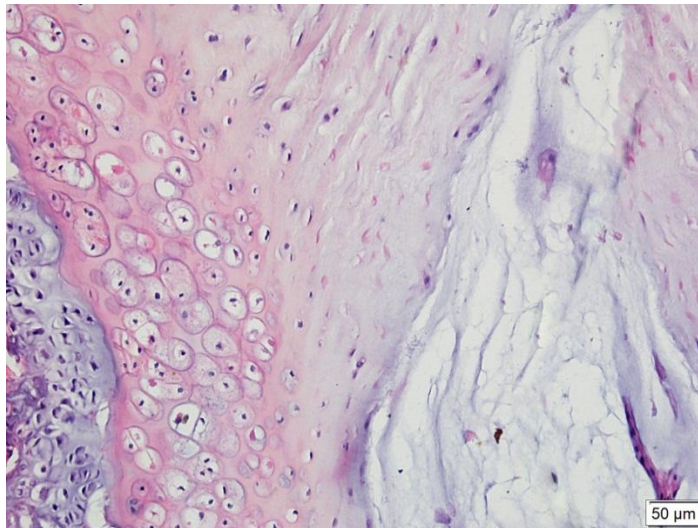


Рис. 4.38. Мікрофотографія зрізу міжхребцевого диску. Внутрішній відділ волокнистого кільця. Розтріскування матриксу. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

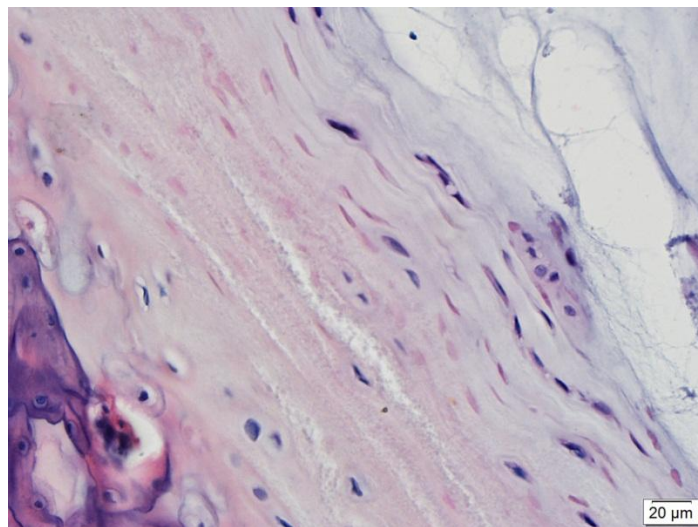


Рис. 4.39. Мікрофотографія зрізу міжхребцевого диску. Внутрішній відділ волокнистого кільця. Формування ізогенної групи. Деструкція міжклітинної речовини. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 400.

Також спостерігали розростання хрящової тканини у напрямку до драглистого ядра (рис. 4.40). В цій ділянці міжхребцевого диску хондроцити формували великі ізогенні групи із 5-8 клітин, що були оточені матриксом, який нагадував матрикс гіалінового хряща. Матрикс мав слабо еозинофільне

забарвлення, волокнисті структури без чітких контурів. Клітини в таких ізогенних групах були з різними характеристиками, тобто, деякі з них були з пікнотичними ядрами або вакуолізованою цитоплазмою. Також спостерігали клітини з великими гіпохромними ядрами, оточені вузькою облямівкою цитоплазми. Місцями розташовувалися осередки детриту.

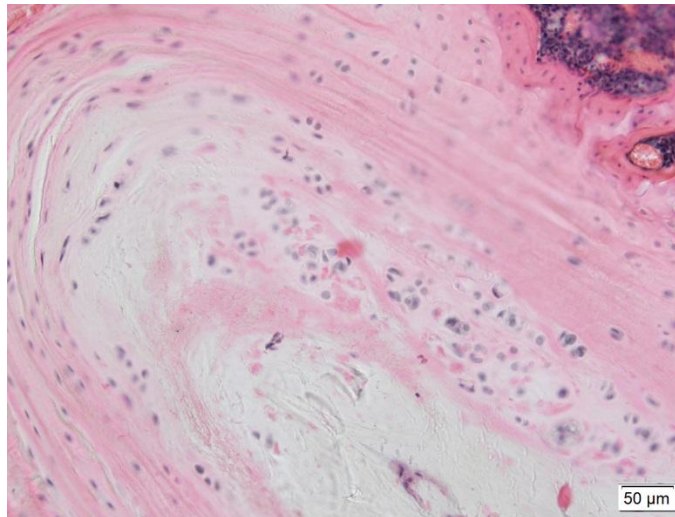


Рис. 4.40. Мікрофотографія зрізу міжхребцевого диску. Внутрішній відділ волокнистого кільця. Формування ізогенних груп хондроцитів. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

Описані зміни у внутрішніх відділах волокнистого кільця свідчать про дегенерацію матриксу, а саме – зміну його волокнистої структури на структуру схожу за будовою на гіаліновий хрящ, тобто метаблазію. За думкою Я.Л. Цивяна та А.А. Бурухіна [162] зміна структури матриксу волокнистого кільця призводить до виникнення локальних напружень у зонах неоднорідності тканини, які в свою чергу спричиняють подальше розтріскування матриксу та збільшення зон некротичного розпаду. Заміна структури волокнистого кільця на іншу за будовою хрящову тканину, на думку авторів, є адаптаційною у відповідь на порушення структури матриксу, але не є повноцінною заміною для структури волокнистого кільця через нездатність витримувати навантаження.

У драглистому ядрі щурів дослідної групи виявлено фрагментацію синцитієподібної структури. Так спостерігали окремі скупчення нотохордальних клітин (рис. 4.36, б), в яких виявлялася значна кількість клітин з каріопікнозом, що свідчить про первинні дегенеративні порушення. Також було зафіксовано зниження на 24,2 % щільності нотохордальних клітин у драглистому ядрі дослідних тварин у порівнянні з контролем (табл. 4.8).

Таким чином, зниження висоти у крайових відділах міжхребцевого диску відбувається за рахунок порушення структури колагенових пластинок у волокнистому кільці, а у центральній ділянці – переважно за рахунок зменшення щільності нотохордальних клітин, які синтезують структурні компоненти драглистого ядра, що забезпечує збереження його об'єму.

Під час електронно-мікроскопічного аналізу міжхребцевого диска щурів контрольної групи у зовнішньому відділі волокнистого кільця відзначене щільне розташування колагенових фібрил з чіткою поперечною смугастістю, що мали паралельну орієнтацію відносно одне одного. Більшість клітин зовнішнього відділу були з видовженою формою ядра, слабо розвиненою цитоплазмою з одиничними мітохондріями та малочисельними каналцям гЕПС.

У внутрішньому шарі волокнистого кільця колагенові фібрили були тонші та розміщені більш неупорядковано, порівняно із фібрилами у зовнішньому відділу диску. Хондроцити внутрішнього шару мали численні відростки, ядро з невеликими інвагінаціями, численні каналці гЕПС і рідко розташовані мітохондрії (рис. 4.41). Зафіксовані також невеликі ізогенні групи хрящових клітин.

Нотохордальні клітини драглистого ядра утворювали синцитієподібну структуру. Клітини мали гетерохромні ядра, цитоплазму з малочисельними каналцями гЕПС та довгі цитоплазматичні відростки (рис. 4.42).

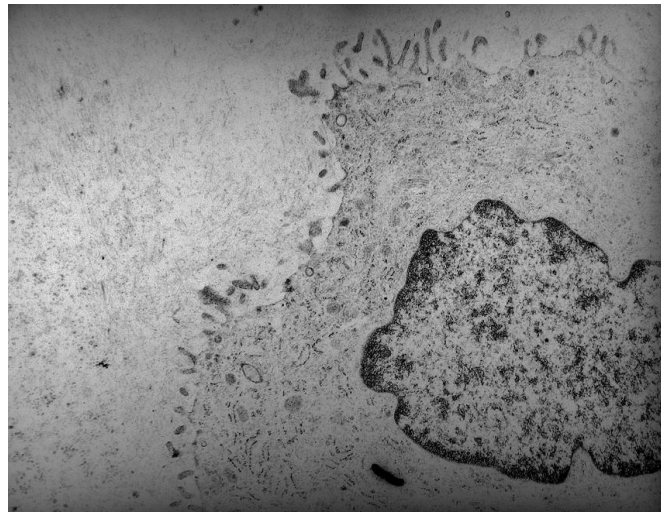


Рис. 4.41. Мікрофотографія електроннограми. Волокнисте кільце. Хондроцит з еухромним ядром. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

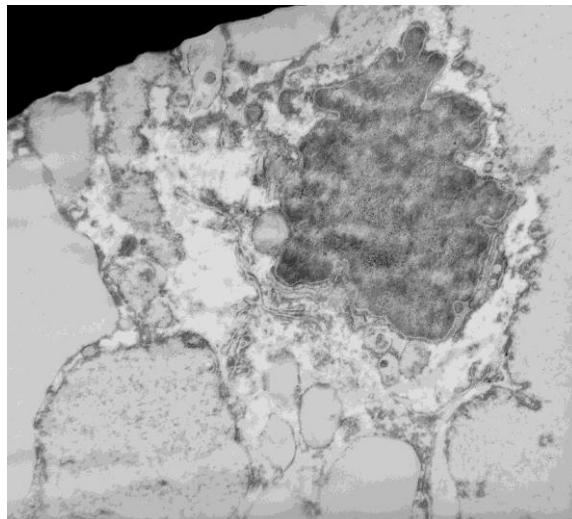


Рис. 4.42. Мікрофотографія електроннограми. Драглисте ядро. Нотохордальна клітина зі слабо-розвинутою гЕПС та довгими відростками. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

У дослідній групі молодих шурів у зовнішньому відділі волокнистого кільця міжхребцевого диска виявлені одиничні фіброхондроцити. Більшість клітин мала фенотип хрящових клітин. Як фіброхондроцити, так і хондроцити характеризувалися наявністю деструктивних змін. В цитоплазмі

клітин виявляли велику кількість різних розмірів вакуолей, а також одиничні електроннощільні залишкові тільця (рис. 4.43, а, б).

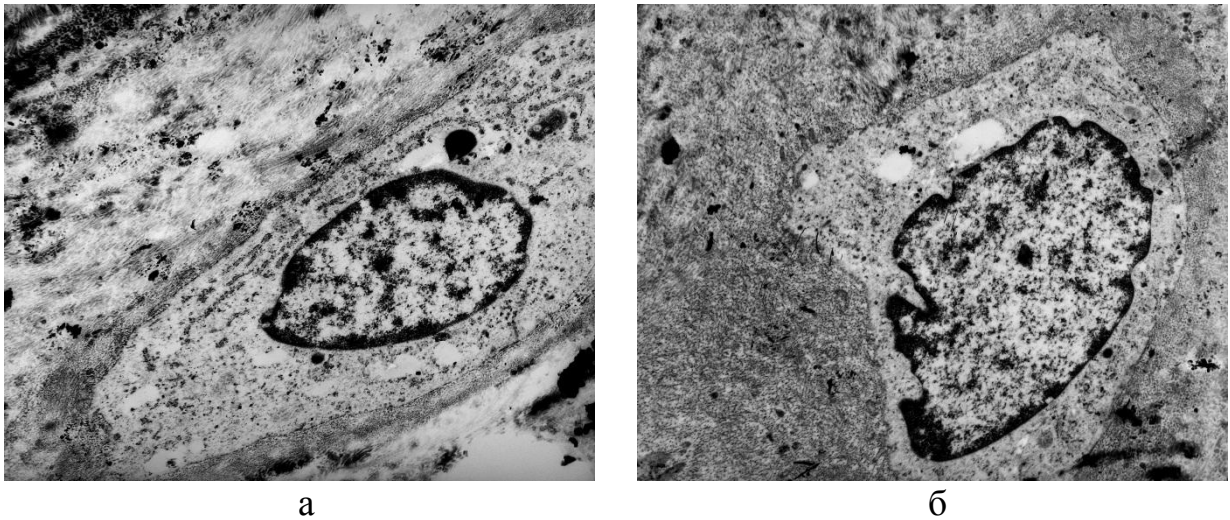


Рис. 4.43. Мікрофотографії електроннограм. Волокнисте кільце. Хондроцит з одиничними профілями гЕПС (а) та вакуолазацією цитоплазми (а, б). Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

Крім того, зустрічали хондроцити в ізогенних групах по 2 клітини, що містили електроннощільні мітохондрії поряд з вакуолізацією цитоплазми (рис. 4.44). У цих хондроцитах також містилися поодинокі цистерни гЕПС. Наявність таких мітохондрій в хондроцитах щурів дослідної групи може свідчити про їх загибель через накопичення в них свинцю. Відомо, що катіонні метали, зокрема свинець, накопичуються переважно в мітохондріях за рахунок присутності у них каналів переносу іонів кальцію [156]. Не можна також не згадати про можливість накопичення свинцю у гЕПС, яка через тісний взаємозв'язок з функціонуванням мітохондрій, також може сприяти потраплянню свинцю у мітохондрії. Деякі клітини у ізогенних групах мали гіперхромне ядро та сильно вакуолізовану цитоплазму (рис. 4.45 а, б), що може бути наступною ланкою розвитку дистрофічних змін у хондроцитах зовнішнього відділу волокнистого кільця щурів дослідної групи.

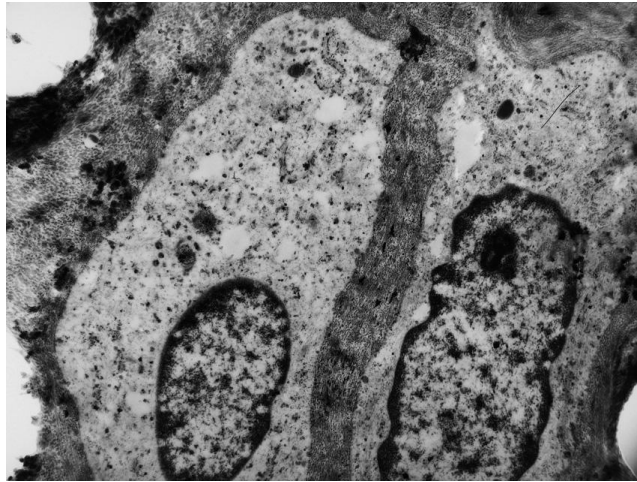
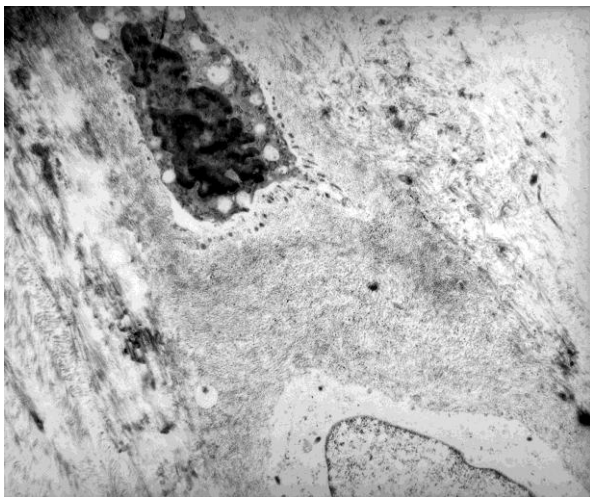
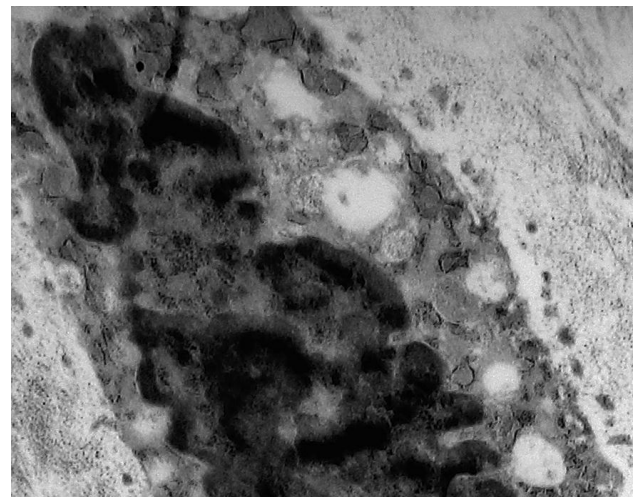


Рис. 4.44. Мікрофотографія електроннограми. Волокнисте кільце. Фіброхондроцити з гіперхромією мітохондрій. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.



а

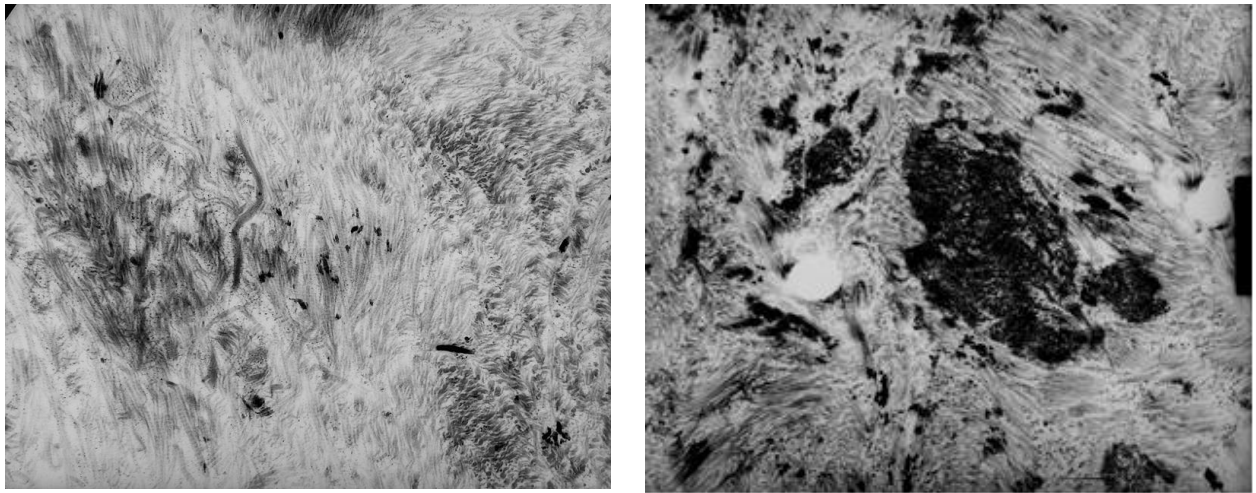


б

Рис. 4.45. Мікрофотографії електроннограм. Волокнисте кільце. А) Хондроцит з електроннощільним ядром. Збільшення 8000. Б) Фр. Рис. 4.45 а. Вакуолізація цитоплазми. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 25000.

Матрикс у пластинках волокнистого кільця мав неоднорідну електронну щільність, так зустрічалися ділянки з високою електронною щільністю різних розмірів, що може свідчити про наявність кальцифікації та

є однією з ознак дегенерації тканинної структури волокнистого кільця міжхребцевого диску (рис. 4.46, а, б) [163, 164].



а

б

Рис. 4.46. Мікрофотографії електроннограм. Волокнисте кільце. Дослідна група. А) Неоднорідність щільності колагенових фібрил. Б) Ділянка можливої кальцифікації матрикс або накопичення свинцю. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

Колагенові фібрили пластин волокнистого кільця мали розмиті контури, місцями зникала поперекова смугастість, або вона була нерівномірною, що може вказувати на осередкову деструкцію фібрил (рис. 4.47, а). На цих ділянках також траплялися електроннощільні структури округлої форми, які склалися з щільно розташованих колагенових волокон (рис. 4.47, б). Поява таких структур може свідчити про порушення формування матриксу міжхребцевого диску.

У внутрішньому відділі волокнистого кільця дослідних тварин більшість хондроцитів мали великі округлі ядра, іноді з ядрцем, і одиничними профілями гЕПС у цитоплазмі (рис. 4.48, а). Також зустрічалися хондроцити з двома ядрами, контури яких відповідали один одному, як ключ до замка, що може свідчить про нещодавній поділ амітозом цих клітин (рис. 4.48, б). Цитоплазма у таких клітин була менш диференційована, у

порівнянні з іншими хондроцитами, що також може свідчити про незрілість даних клітин. Хондроцити розташовувалися в ізогенних групах по 2-4 клітини, іноді по 5. Деякі хондроцити мали в цитоплазмі лізосоми, можливо з ферментами, які руйнують дегенеративний матрикс.

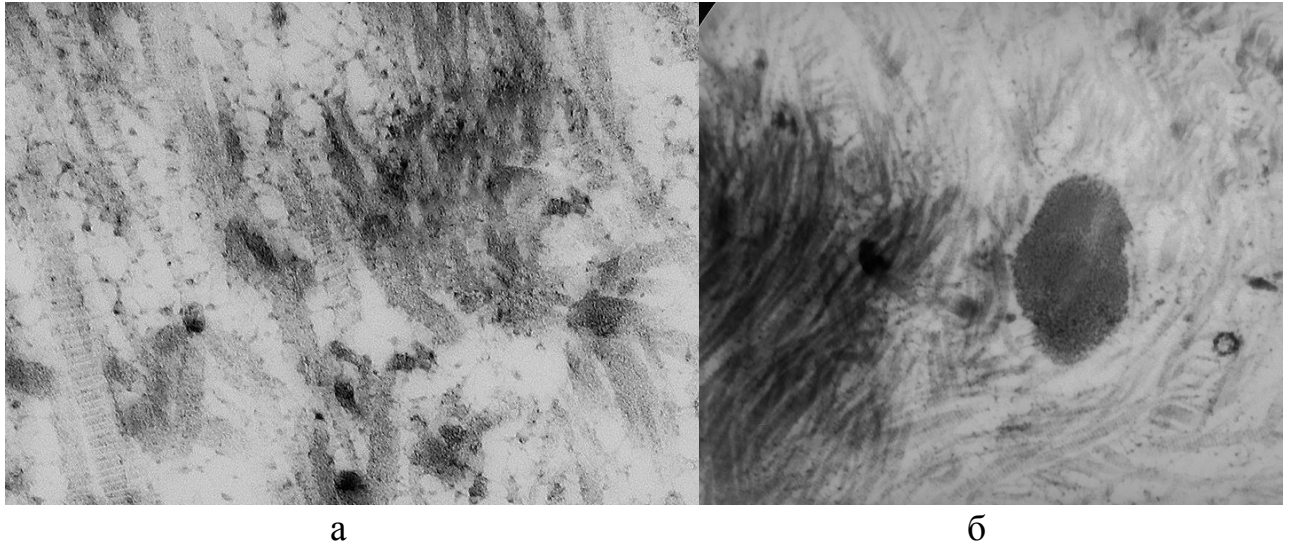


Рис. 4.47. Мікрофотографії електроннограм. Волокнисте кільце. А) Колагенові фібрили з різною ступеню деструкції та електроннощільні структури у матриксі. Збільшення 45200 Б) Електроннощільна структура. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 32000.

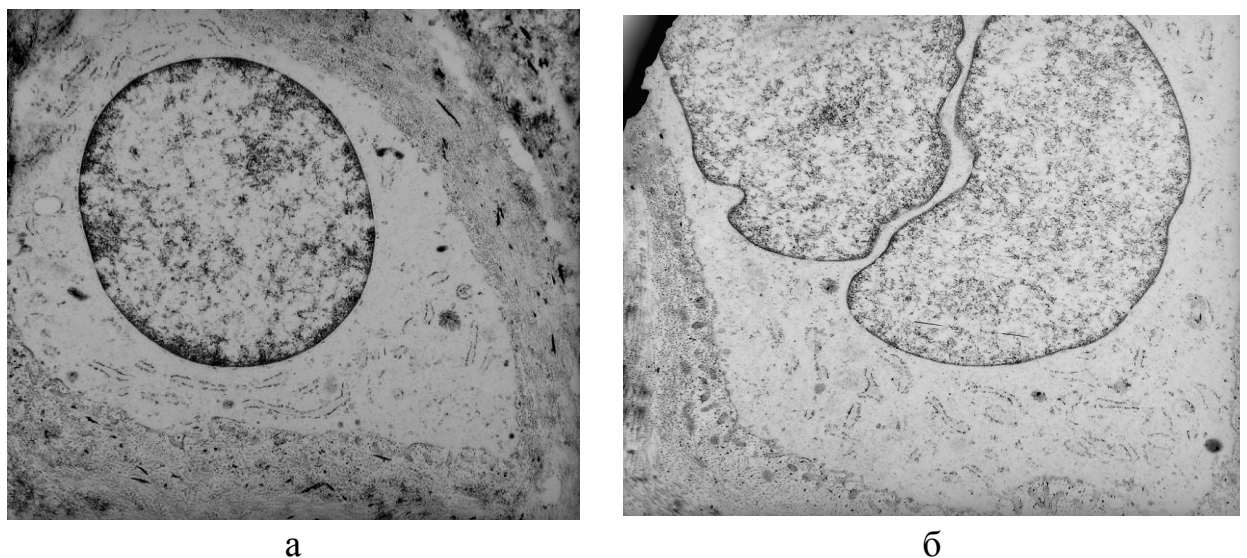


Рис. 4.48. Мікрофотографія електроннограми. Волокнисте кільце. А) Хондроцит з округлим еухромним ядром. Б) Хондроцит з двома ядрами. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

Також у деяких клітинах було виявлено явище екзоцитозу. В цитоплазмі більшості клітин внутрішнього відділу волокнистого кільця, виявляли деструктивні порожнини різного розміру і локалізації або формування гігантських вакуолей (рис. 4.49, а, б).

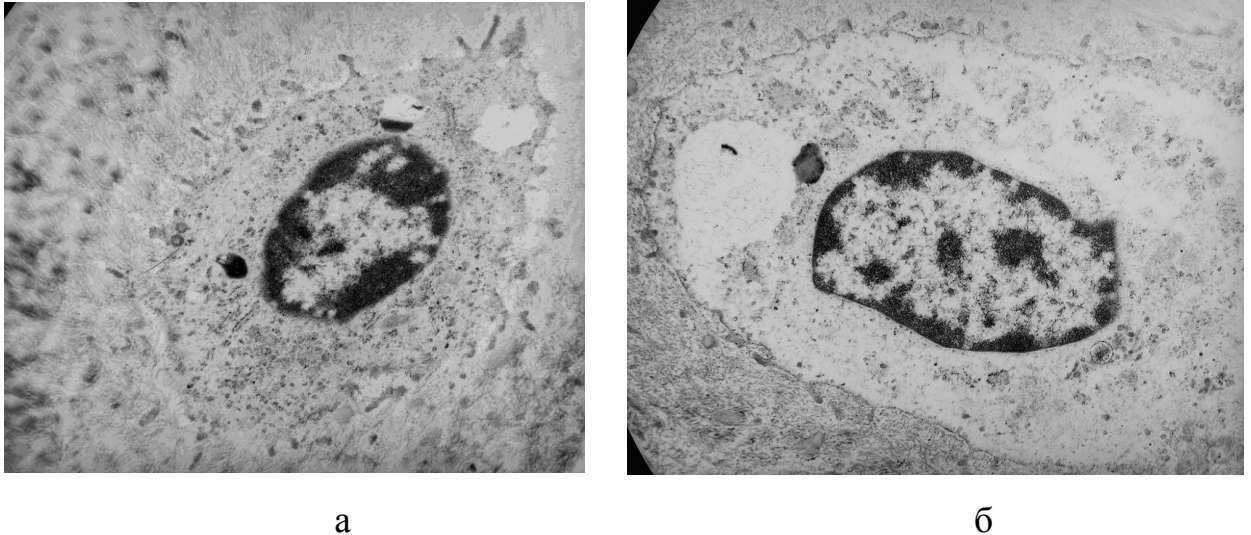
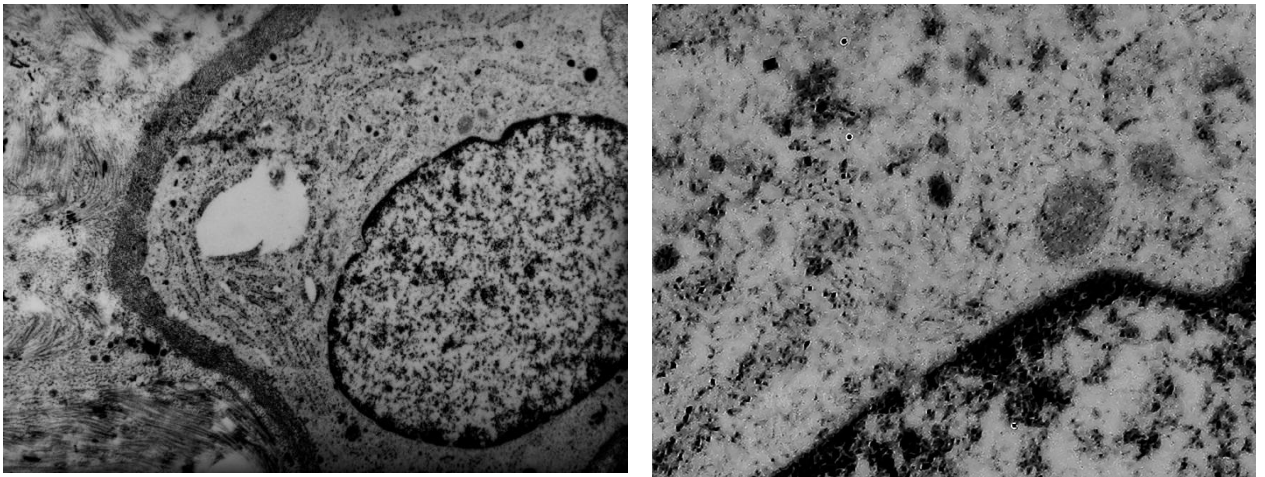


Рис. 4.49. Мікрофотографії електроннограм. Волокнисте кільце. Хондроцити внутрішнього відділу з конденсацією хроматину (а) та деструктивними порожнинами (а) або з великими вакуолями в цитоплазмі б). Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

Крім того спостерігали конденсацію хроматину по периферії ядерної мембрани цих клітин, контури якої були розмиті. Аналогічні зміни у хондроцитах спостерігаються у суглобовому хрящі при остеоартрозі [165]. У деяких з таких клітин спостерігали електроннощільний контур навколо клітинної мембрани, що можливо пов'язано з порушенням у формуванні структури матриксу або утворенням капсули клітиною (рис. 4.50 а), а також загибель мітохондрій (рис. 4.50 б).

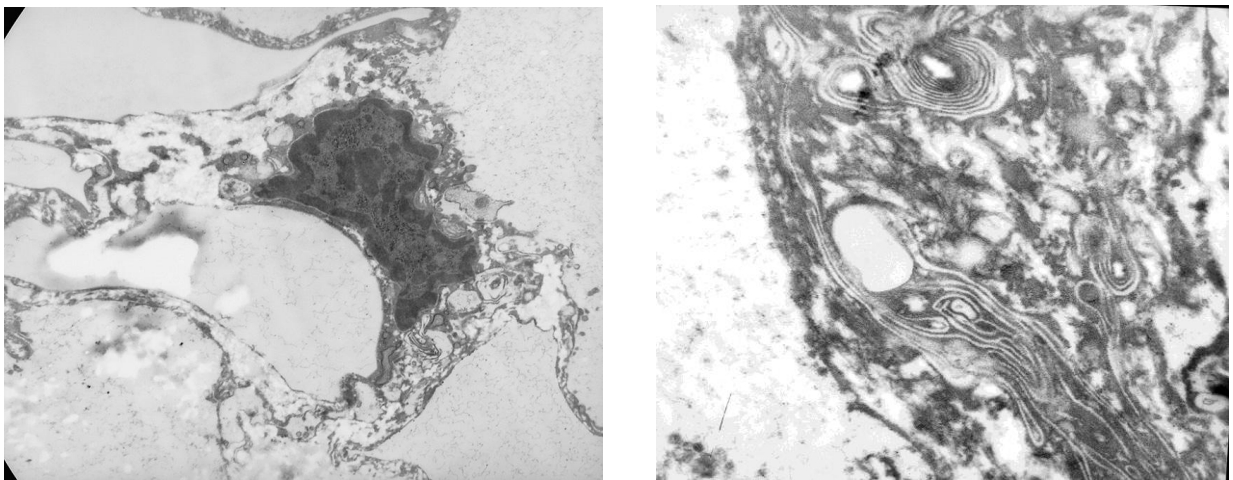
У драглистому ядрі у тварин дослідної групи, як і в контрольній, були виявлені нотохордальні клітини з гіперхромними ядрами (рис. 4.51, а).



а

б

Рис. 4.50. Мікрофотографія електроннограми. Волокнисте кільце. А) Хондроцит з деструктивною порожниною. Збільшення 10000. Б) Фр. Рис. 4.50 а. Загибель мітохондрії. Втрата чіткості структури крист, руйнування двошарової мембрани. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 50000.



а

б

Рис. 4.51. Мікрофотографії електроннограм. Драглисте ядро. А) Нотохордальна клітина з електроннощільним ядром. Збільшення 16800. Б) Фр. рис. 4.51 а. Мієлінова фігура в цитоплазмі. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 22800.

В цитоплазмі окремих нотохордальних клітини щурів дослідної групи зустрічали великі вакуолі, заповнені, ймовірно, продуктами біосинтезу

клітин. Крім того, деякі клітини мали гіперхромне електроннощільне ядро, що свідчить про дегенеративні зміни у клітині. Також у більшості нотохордальних клітин виявлено формування мієлінових фігур, що пов'язано з клітинною мембраною та руйнування її структури внаслідок дії певних негативних факторів (рис 4.51, б). Це є ознакою некрозу клітини [166].

Дегенеративні захворювання хребта є дуже поширеними, однак досі залишаються нез'ясованими фактори, що їх викликають, наприклад, вплив свинцю на структуру міжхребцевого диску є невивченим. Щурів часто використовують у якості моделі для відтворення та вивчення дегенеративних захворювань міжхребцевого диску [167-169]. Особливістю будови міжхребцевого диску щурів, що відрізняє його від диску людини, є збереження нотохордальних клітин у драглистому ядрі на протязі всього життя, тоді як у людини вони майже зникають у віці 4-10 років. Згідно з недавнім дослідженням, збереження нотохордальних клітин у драглистому ядрі щурів не заважає використанню їх у якості моделі дегенерації міжхребцевого диску через те, що хондроцитоподібні клітини, які формуються у драглистому ядрі людини з віком, є однією лінією клітин з нотохордальними за походженням та представляють лише різні патологічні чи фізіологічні етапи старіння чи дегенерації нотохордальних клітин [170]. Вміст колагену, глікозаміногліканів та води у волокнистому кільці повністю співпадає з таким у людини [171, 172].

У міжхребцевому диску молодих щурів після впливу свинцю відбувається зниження висоти диску та ширини волокнистих пластинок, поряд зі зниженням щільності клітин, як у фіброзному кільці, так і у драглистому ядрі. Якщо зниження висоти диску відбувається майже однаково, як у крайових так і у центральному його відділах, то щільність клітин знижується більше у драглистому ядрі. Наявність ознак дегенерації у нотохордальних клітинах драглистого ядра після впливу свинцю, а саме конденсація хроматину та формування в цитоплазмі мієлінових фігур, може вказувати на можливість дії цього елемента шляхом проникнення разом з

поживними речовинами до драглистого ядра та пригнічення біосинтетичних функцій нотохордальних клітин внаслідок порушення їх структури та призводячи з часом до їх загибелі.

У хондроцитах зовнішнього відділу волокнистого кільця після впливу свинцю виявлено вакуолізацію цитоплазми та конденсацію хроматину у ядрі, що свідчить про порушення функціонування клітин, а саме їх біосинтетичних функцій. Тоді як у внутрішньому відділі поряд з деструктивними змінами у клітинах у вигляді появи порожнин в цитоплазмі, відзначено поділ хондроцитів, що може свідчити наявність компенсаторного механізму для відновлення структурного гомеостазу тканини. Збільшення проліферативної активності клітин у вигляді формування великих ізогенних груп хондроцитів, що було підтверджено гістологічно, є ознакою дегенерації міжхребцевого диску [164, 173]. На думку S.A. Majeed зі співав. [173] це викликано порушенням біомеханічних якостей диску.

У матриксі волокнистого кільця як у зовнішньому, так і у внутрішньому відділі спостерігали дегенеративні зміни у вигляді появи тріщин поміж та всередині пластин, на гістологічному рівні, та розволокнення колагенових фібрил, втрата ними характерної смугастості, а також утворення щільних ділянок на електронномікроскопічному. Ці зміни свідчать про руйнування міжклітинної речовини хрящової тканини волокнистого кільця і є деструктивними. Формування електроннощільних ділянок у структурі матриксу диску також може свідчити про накопичення свинцю, що буде розглянуто у розділі 6. Порушення цілісності матриксу зовнішнього відділу диску бути причиною порушення його опорної функції у відповідь на навантаження, що в свою чергу викликає дегенеративні зміни у внутрішньому відділі.

4.2.2 Структурні особливості міжхребцевих дисків щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом

Гістологічний аналіз. Міжхребцевий диск щурів *контрольної групи* був представлений волокнистим кільцем та драглистим ядром. Волокнисте кільце було розділене на зовнішній та внутрішній відділ. Структура зовнішнього відділу волокнистого кільця складалася з пластинок виконаних пучками колагенових волокон (рис. 4.52, а).

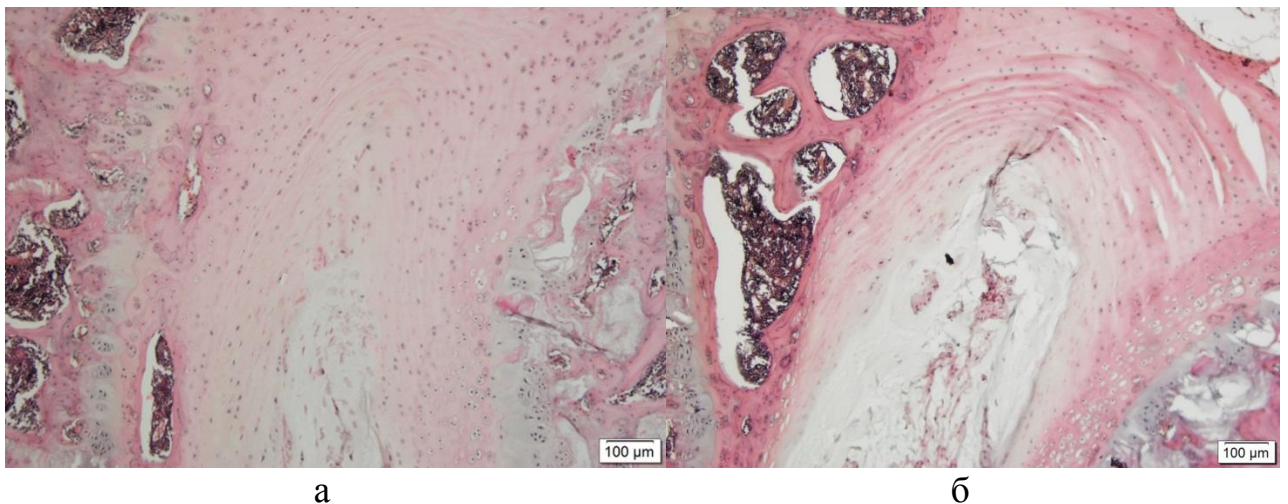


Рис. 4.52. Мікрофотографії зрізів міжхребцевого диску. Волокнисте кільце. А) Контрольна група. Б) Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 100.

Деякі пластинки мали невеликі тріщини у структурі, які пролягали вздовж них (рис. 4.53). Хондроцити в пластинках розміщувалися неупорядковано, зустрічалися безклітинні ділянки (рис. 4.52, а). Матрикс мав еозинофільне забарвлення.

У внутрішньому відділі міжхребцевого диску в матриксі, однорідному за будовою, розміщувалися хондроцити, які на ділянках формували ізогенні групи по 2-3 клітини.

Драглисте ядро було представлено синцитієподібною структурою, яка складалася з нотохордальних клітин та їх довгих відростків і була оточена гелеподібною незабарвленою речовиною (рис. 4.54, а). Синцитієподібна

структура розташовувалася по центру драглистого ядра. Нотохордальні клітини розміщувалися щільно одна до одної.

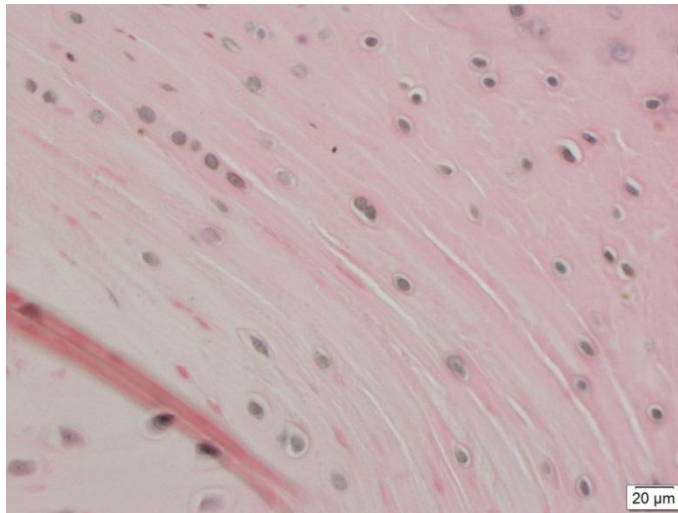


Рис. 4.53. Мікрофотографія зрізу міжхребцевого диску. Зовнішній відділ волокнистого кільця. Фрагмент рис. А. Невеликі тріщини у матриці. Нерівномірне розташування клітин. Контрольна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 400.

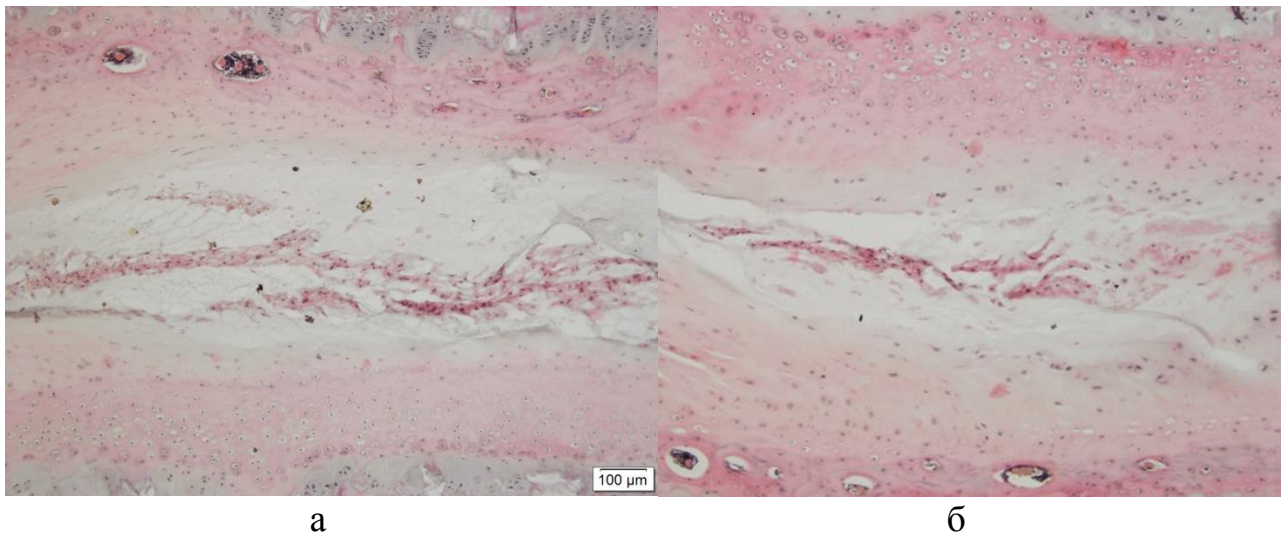


Рис. 4.54. Мікрофотографії зрізів міжхребцевого диску. Драглисте ядро. А) Контрольна група. Б) Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 100.

В крайових відділах драглистого ядра спостерігали появу еозинофільно забарвлених невеликих фрагментів тканини, схожої за забарвленням на матрикс волокнистого кільця (рис. 4.55). Поблизу цих фрагментів зустрічали хондроцити, що може свідчити про біосинтез ними компонентів матриксу хрящової тканини і перебудову структури драглистого ядра.

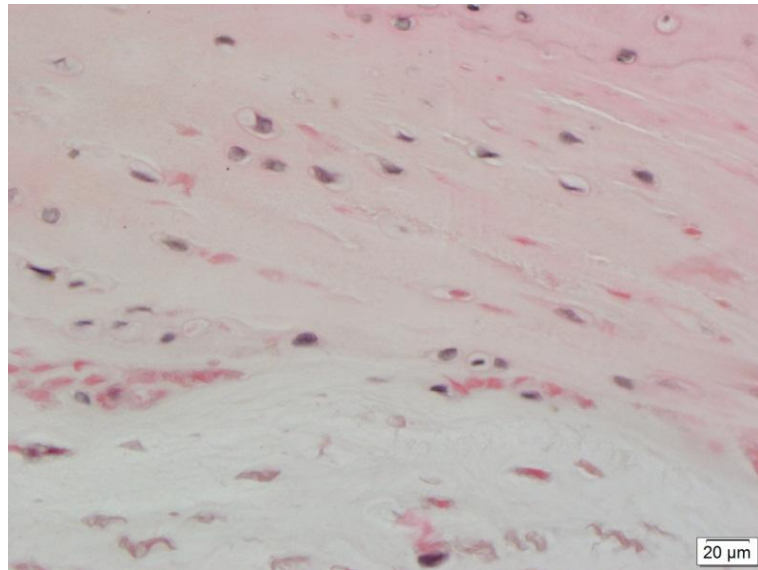


Рис. 4.55. Мікрофотографія зрізу міжхребцевого диску. Драглисте ядро та внутрішній відділ волокнистого кільця. Еозинофільно забарвлені острівки. Контрольна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 400.

У щурів дослідної групи після впливу свинцю у міжхребцевому диску спостерігали певні дегенеративні прояви. У зовнішньому відділі волокнистого кільця спостерігали появу великих тріщин, розміщених в переважній більшості поміж пластин, а також менших за розмірами, розташованих поміж пучків колагенових волокон пластин (рис. 4.52, б). Виявлені хондроцити, що формували ізогенні групи по 2 клітини в лакуні, що є нехарактерним для структурної організації зовнішнього відділу фіброзного кільця (рис. 4.56).

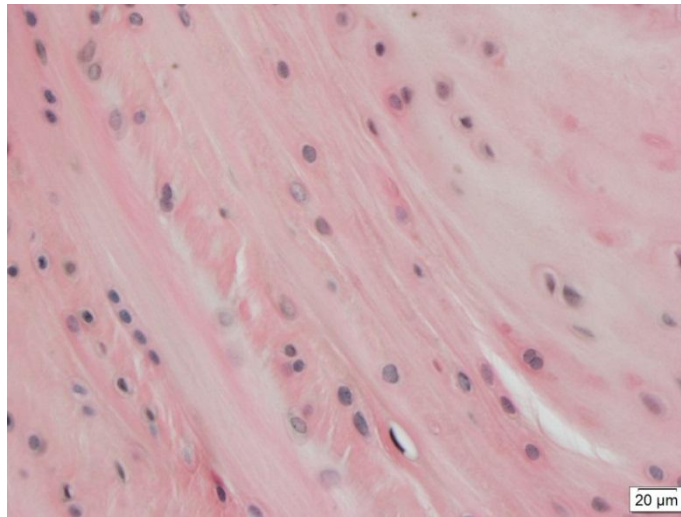


Рис. 4.56. Мікрофотографія зрізу міжхребцевого диску. Зовнішній відділ волокнистого кільця. Тріщини у матриксі та ізогенні групи хондроцитів. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 400.

У внутрішньому відділі міжхребцевого диску також відмічено появу тріщин, деякі з них були заповнені рідиною та продуктами деструкції тканини (рис. 4.57, а). Поряд з тріщинами зустрічалися клітини з каріопікнозом та гіпертрофовані хондроцити. У драглистому ядрі синцитієподібна структура була більш фрагментована, в порівнянні з контрольною групою, але також складалася з нотохордальних клітин з відростками (рис. 4.54, б). Відмічено збільшення кількості еозинофільних фрагментів у крайових відділах драглистого ядра, що свідчить про процес формування хрящового матриксу у цій структурі (рис. 4.57, б).

На цих ділянках спостерігали формування великих ізогенних груп хондроцитів, які були оточені хрящовим матриксом. Деякі з клітин поблизу таких формувань мали пікнотичні ядра. Також відмічено формування тріщин навколо лакун, де розміщувалися хондроцити.

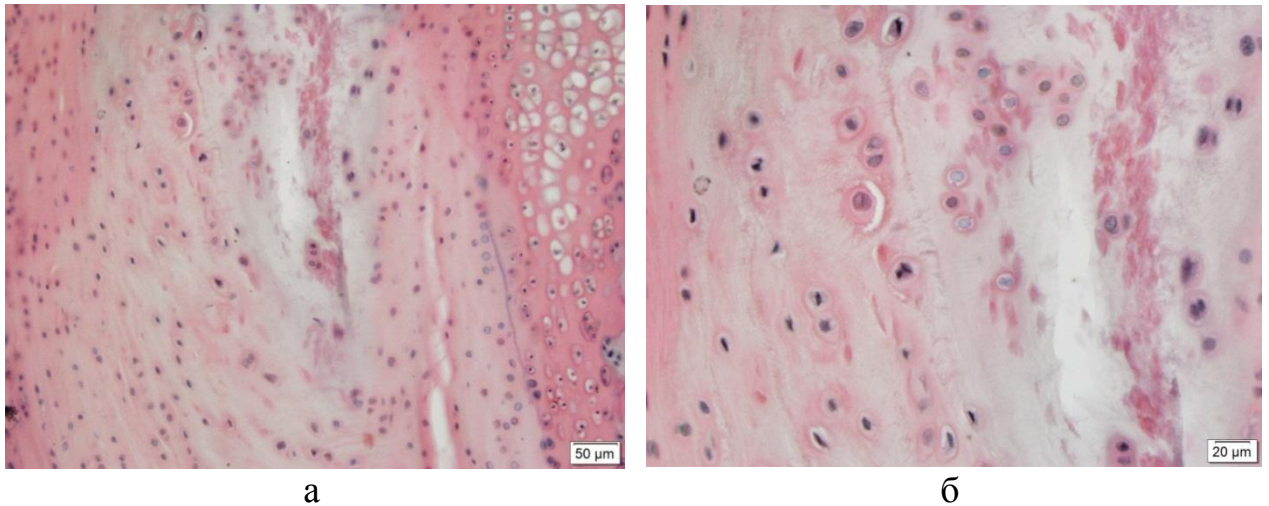


Рис. 4.57. Мікрофотографії зрізів міжхребцевого диску. Внутрішній відділ волокнистого кільця та драглисте ядро. А) Великі тріщини у матриксі. Збільшення 200. Б) Фр. рис. 4.57 а. Формування хрящової тканини у драглистому ядрі. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 400.

З метою вивчення впливу свинцю на міжхребцевий диск щурів було проведено вимірювання його висоти в крайових та центральному відділах. Встановлено, що у щурів дослідної групи висота міжхребцевого диску у крайових відділах знизилася на 6,19 % порівняно з контрольною групою тварин, при цьому в центральній частині висота диску не відрізнялася (табл. 4.9).

Таблиця 4.9

Показники висоти (мкм) міжхребцевого диску щурів з модельованим остеопорозом ($M \pm m$)

| Місце вимірювання | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--------------------|------------------|----------------|------|
| Крайові відділи | 737,43 ± 7,45 | 691,76 ± 14,19 | 0,01 |
| Центральна частина | 616,01 ± 9,07 | 587,68 ± 14,45 | 0,12 |

Результати цього дослідження можуть бути тісно пов'язані з вивченням особливостей організації тіл хребців і свідчити про розвиток в них двояковігнутих деформацій. При подальшому дослідженні не виявлено статистично значимої різниці для таких показників, як ширина пластинок волокнистого кільця, щільність клітин у волокнистому кільці та драглистому ядрі (табл. 4.10)

Таблиця 4.10

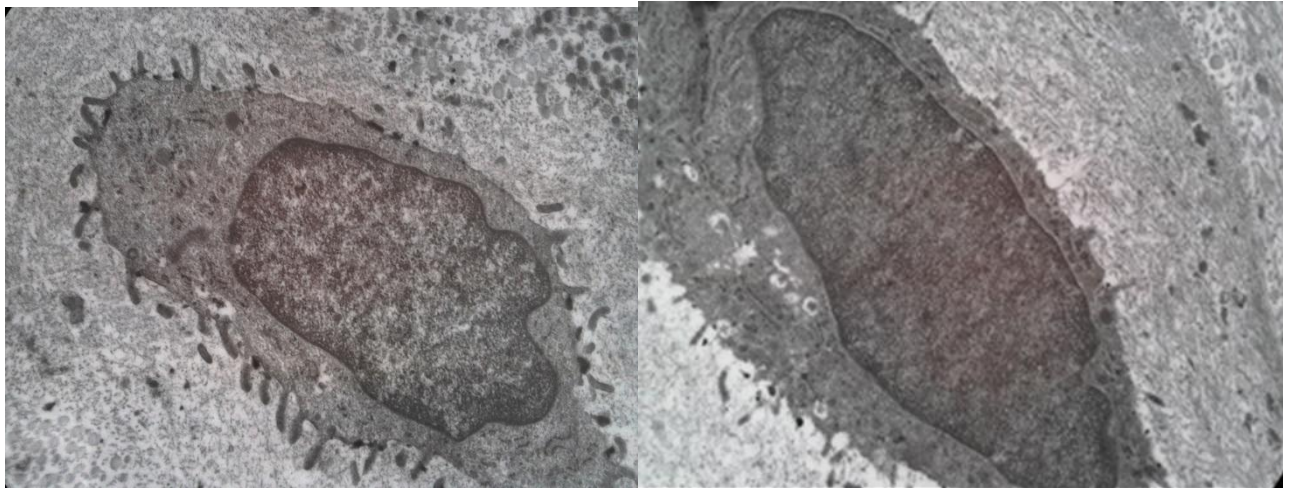
Морфометричні параметри міжхребцевих дисків щурів ($M \pm m$)

| Параметри вимірювання | Контрольна група | Дослідна група | P |
|---|---------------------|---------------------|------|
| Ширина пластинок волокнистого кільця (мкм) | $24,89 \pm 0,41$ | $23,84 \pm 0,54$ | 0,13 |
| Щільність фіброхондроцитів (у мм^2) | $1169,69 \pm 41,06$ | $1283,06 \pm 42,31$ | 0,07 |
| Щільність нотохордальних клітин у драглистому ядрі (у мм^2) | $3434,28 \pm 73,64$ | $3346,00 \pm 76,27$ | 0,41 |

Виявлені зміни в міжхребцевому диску щурів після впливу свинцю свідчать про те, що найбільших дегенеративних змін зазнає волокнисте кільце, за рахунок розтріскування матриксу, що призводить до зменшення висоти у крайових відділах міжхребцевого диску.

Електронномікроскопічний аналіз. У контрольній групі щурів в зовнішньому відділі фіброзного кільця зустрічали хондроцити різного розміру видовженої форми з багаточисельними відростками та гетерохромними ядром (рис. 4.58, а). У цитоплазмі цих клітин виявляли невелику кількість мітохондрій, деякі з яких мали нечіткі контури мембрани та крист, також траплялися короткі профілі гранулярної ендоплазматичної сітки (гЕПС). За останніми даними наявність мітохондрій у хондроцитах волокнистого кільця є нормою, не дивлячись на те, що вони беруть участь у аеробному обміні. Їх функціонування важливе для синтезу АТФ, а порушення функції спостерігається за умов дегенерації міжхребцевого диску [174]. Крім того, у цитоплазмі розташовані невеликі поодинокі деструктивні

порожнини (рис. 4.58, а). Матрикс колагенових пластинок мав однорідну будову та складався з колагенових фібрил. У внутрішньому відділі міжхребцевого диску щурів були розміщені хондроцити округлої форми з гетерохромним ядром та розвиненою гЕПС, в цитоплазмі яких також траплялися невеликі деструктивні порожнини (рис. 4.59).



а

б

Рис. 4.58. Мікрофотографії електроннограм. Зовнішній відділ волокнистого кільця. Хондроцити контрольної (а) та дослідної (б) груп. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

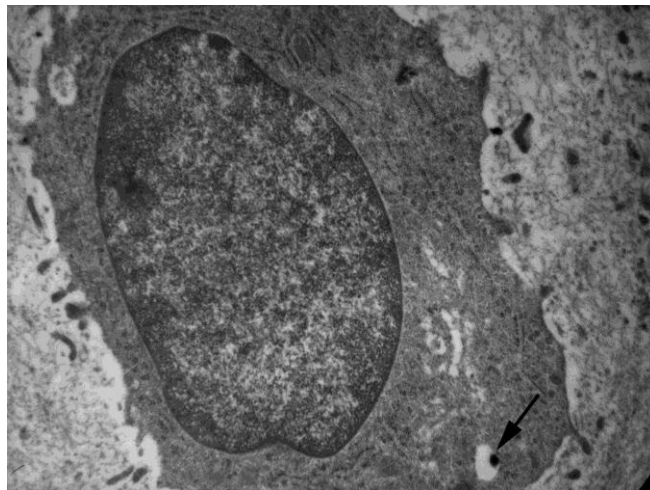


Рис. 4.59. Мікрофотографія електроннограми. Внутрішній відділ волокнистого кільця. Хондроцит з довгими відростками та залишковим тільцем (стрілка). Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

У синцитієподібній структурі драглистого ядра були представлені нотохордальні клітини з дуже довгими цитоплазматичними відростками, які перепліталися між собою та утворювали своєрідну структуру. Ядра цих клітин були переважно гетерохромними з розподілом гетерохроматину по периферії ядра (рис. 4.60). Клітини мали велику за площею цитоплазму порівняно з розміром ядра, яка містила поодинокі цистерни гЕПС та багаточисельні вакуолі та пухирці.

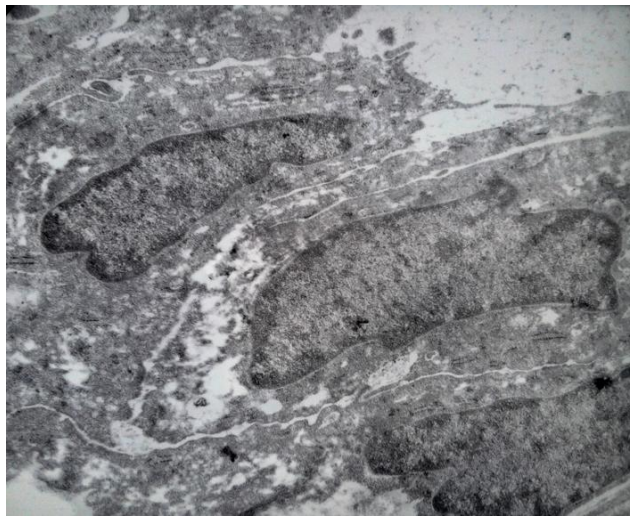


Рис. 4.60. Мікрофотографія електроннограми. Драглисте ядро. Скупчення нотохордальних клітин. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 7800.

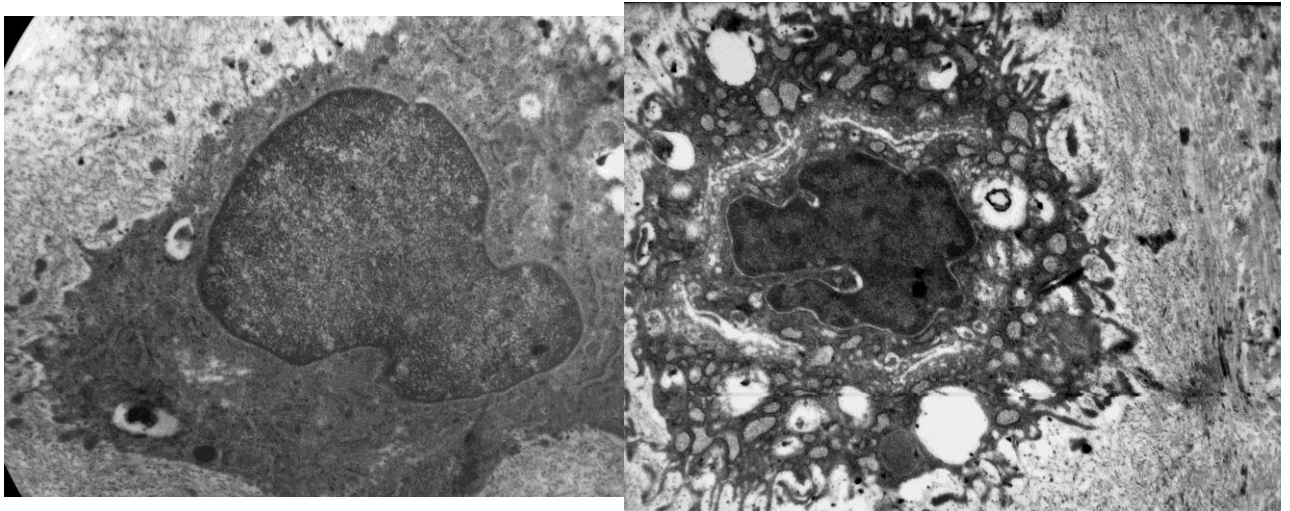
У деяких клітин виявляли апарат Гольджі, який локалізувався поблизу ядра. Однією з функцій апарату Гольджі є модифікація складних білків, зокрема протеогліканів, необхідних для функціонування драглистого ядра (рис. 4.61). Протеоглікани є одним з головних компонентів драглистого ядра, завдяки їх властивості зв'язувати екстрацелюлярну воду. Відомо, що їх синтез відбувається у гЕПС, потім транспортується у апарат Гольджі для їх глікозування. Саме тому наявність цих мембранних органел є важливим для підтримки нормального об'єму драглистого ядра.



Рис. 4.61. Мікрофотографія електроннограми. Драглисте ядро. Фрагмент нотохордальної клітини з апаратом Гольджі та багаточисельними пухирцями в цитоплазмі. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 15600.

У дослідній групі у зовнішньому відділі волокнистого кільця зустрічалися хондроцити з різними деструктивними змінами в цитоплазмі. У більшості клітин в цитоплазмі спостерігали різні за розмірами деструктивні порожнини (рис. 4.58, б). Поряд з цим відбувалося збільшення кількості залишкових тілець, що вірогідно містили продукти розпаду органел. Також зустрічалися хондроцити з великими електроннощільними залишковими тільцями (рис. 4.62, а). У цитоплазмі таких клітин були розташовані електроннощільні мітохондрії та переважали мікротрубочки та мікрофіламенти. Крім того, виявлені одиничні клітини з дуже великими порожнинами, в деяких з них знаходили залишкові тільця. В цитоплазмі цих клітин спостерігали численні каналці аЕПС, а також гігантські вакуолі (рис. 4.62, б). Спостерігали хондроцити, які знаходилися в лакунах розмір, яких переважав розмір клітини, вірогідно внаслідок набряку або зменшення клітини у розмірі, що може бути ознакою її загибелі (рис. 4.63). Ці клітини мали електроннощільне гіперхромне ядро, вузька облямівка цитоплазми з

представленими в ній довгими профілями гЕПС та деструктивними щілинами видовженої форми.



а

б

Рис. 4.62. Мікрофотографії електроннограм. Зовнішній відділ волокнистого кільця. Деструктивні зміни в хондроцитах. А) Хондроцит з трьома залишковими тільцями в цитоплазмі. Б) Залишкові тільця та вакуолізація цитоплазми. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

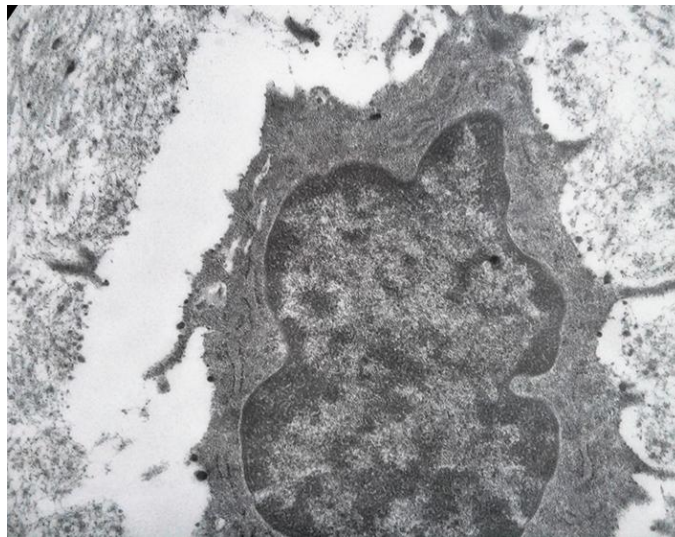


Рис. 4.63. Мікрофотографія електроннограми. Зовнішній відділ волокнистого кільця. Хондроцит з деструктивними порожнинами та каналцями гЕПС. Збільшення 15600. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 16800.

У внутрішньому відділі волокнистого кільця дослідної групи виявлені хондроцити в лакунах з великими овальної форми деструктивними порожнинами (рис. 4.64, а). Ці клітини мали лопастне ядро, невеликі цистерни гЕПС, набухлі мітохондрії та малочисельні відростки. Також зустрічалися клітини з залишковими тільцями, які за розмірами нагадували деструктивні порожнини (рис. 4.64, б). Формування залишкових тілець є результатом аутофагії, яка зустрічається в нормі та є адаптаційною реакцією на вплив різних чинників на диск, але її прояв у хондроцитах зростає у випадку дегенерації диску з віком [154]. Згідно результатам дослідження Gruber Н.Е зі співав. [175], аутофагія у хондроцитах волокнистого кільця необхідна для елімінації загиблих мітохондрій, дисфункція яких відбувається при дегенерації диску.

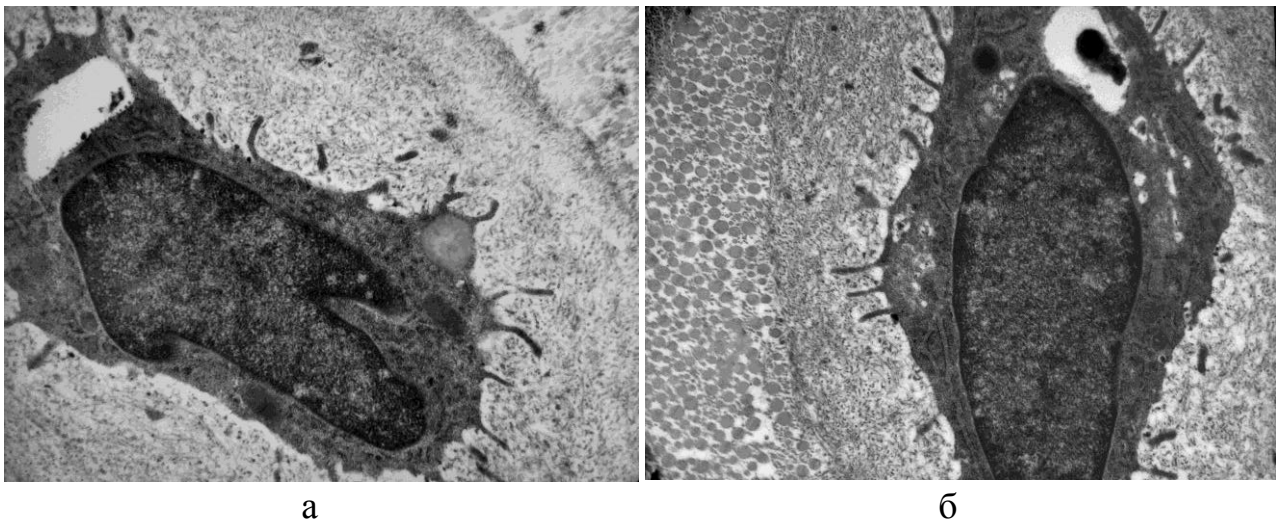


Рис. 4.64. Мікрофотографії електроннограм. Хондроцити внутрішнього відділу волокнистого кільця. А) Велика деструктивна порожнина у цитоплазмі. Б) Вакуолізація цитоплазми. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

У багатьох хондроцитів в цитоплазмі переважали мікротрубочки та мікрофіламенти (рис. 4.65), що свідчить про низьку біосинтетичну активність цих клітин. Зрідка, крім таких клітин, в матриксі зовнішнього відділу волокнистого кільця траплявся клітинний детрит (рис. 4.66).

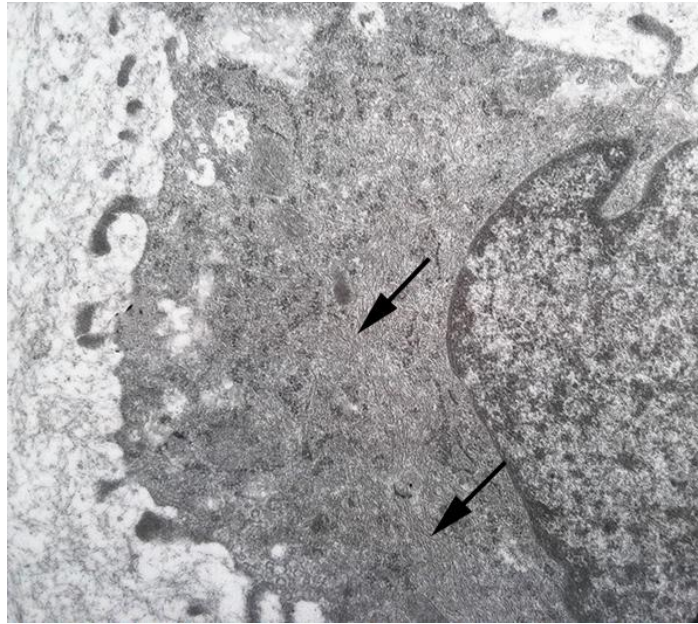


Рис. 4.65. Мікрофотографія електроннограми. Внутрішній відділ волокнистого кільця. Фрагмент хондроцита з компонентами цитоскелету в цитоплазмі (стрілки). Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

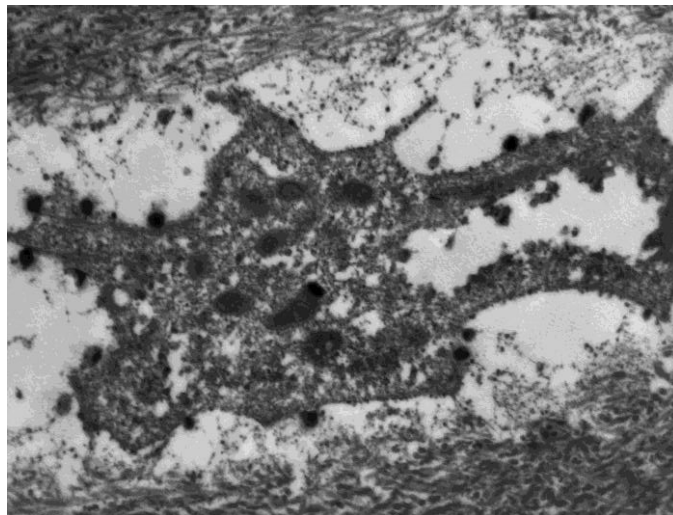


Рис. 4.66. Мікрофотографія електроннограми. Внутрішній відділ волокнистого кільця. Детрит в лакуні. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

У матриксі волокнистого кільця зустрічалися ділянки з рідким розташуванням колагенових фібрил, більшість з них були

електроннощільними, що може свідчити про їх гіаліноз (рис. 4.67).

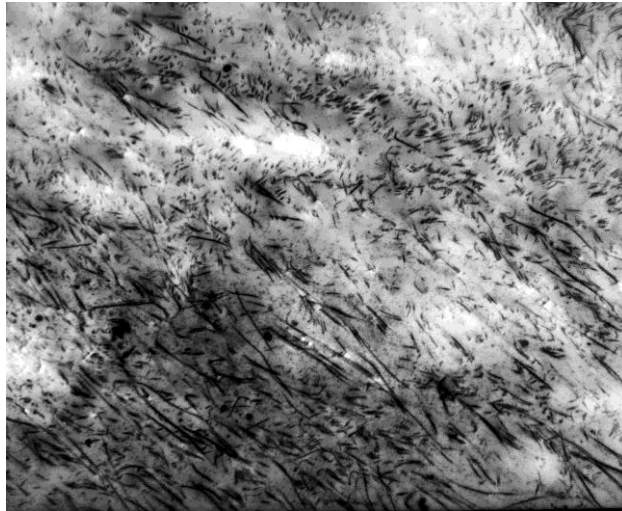


Рис. 4.67. Мікрофотографія електроннограми. Волокнисте кільце. Порушення структури матриксу. Гіаліноз. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 15600.

У драглистому ядрі щурів після впливу свинцю, як і в контрольній групі в синцитієподібній структурі виявлені нотохордальні клітини, які за складом органел не відрізнялися (рис. 4.68).

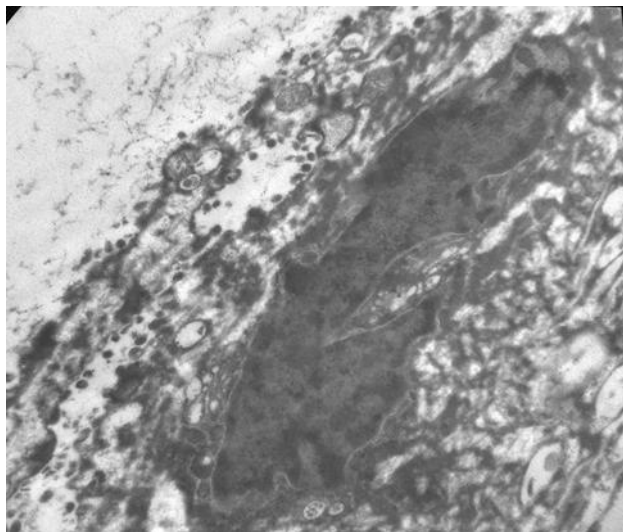
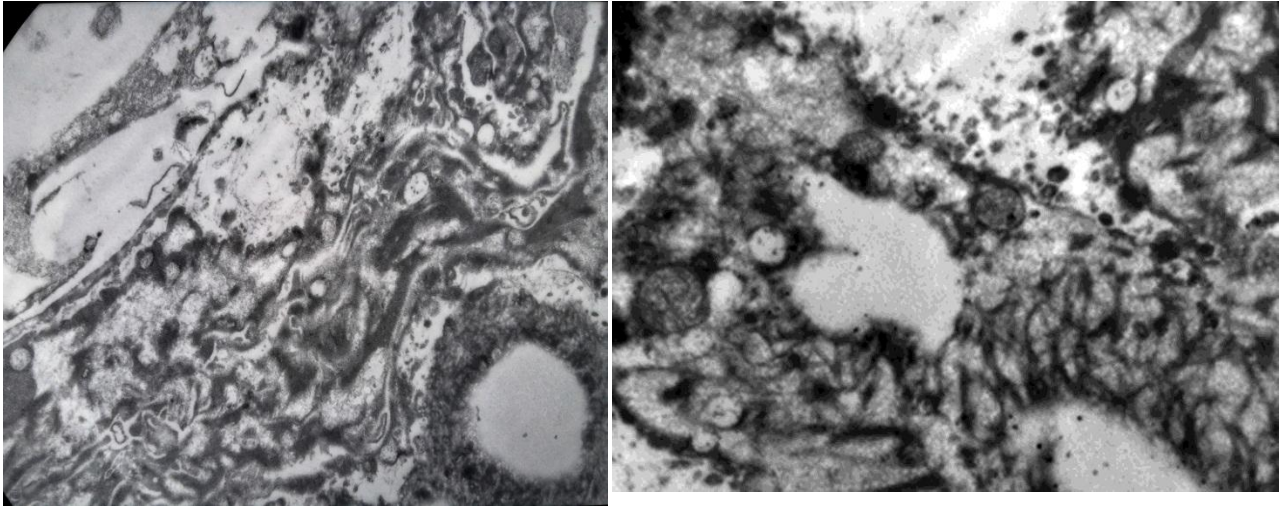


Рис. 4.68. Мікрофотографія електроннограми. Драглисте ядро. Нотохордальна клітина з лопастним ядром. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

Але в деяких клітинах були виявлені великі за розмірами порожнини, які були заповнені рідиною, що може свідчити про набряк та порушення функціонування клітин (рис 4.69, а). Крім того в цитоплазмі траплялися поодинокі набухлі мітохондрії з руйнуванням двошарової мембрани (рис. 4.69, б).



а

б

Рис. 4.69. Мікрофотографії електроннограм. Драглисте ядро. А) Фрагмент цитоплазми нотохордальної клітини з деструктивною порожниною. Збільшення 15600. Б) Набряк мітохондрій, руйнування їх мембран. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 16800.

Таким чином, у міжхребцевому диску щурів з остеопорозом після впливу свинцю відбуваються дегенеративні зміни з більшим проявом у волокнистому кільці. Так, у волокнистому кільці спостерігали порушення структури матрикс: розшарування колагенових волокон, формування тріщин та щілин, а у драглистому ядрі – поява фрагментів з характерним хрящовим матриксом та утворення ізогенних груп хондроцитів. На клітинному рівні у волокнистому кільці відбувається порушення біосинтетичної активності фіброхондроцитів, що виражається в появі численних деструктивних порожнин та вакуолізації цитоплазми, а також переважання в ній

компонентів цитоскелету. У внутрішньому відділі спостерігається підвищена щільність залишкових тілець та деструктивних порожнин в цитоплазмі клітин, порівняно з зовнішнім відділом диску, що свідчить про більший негативний вплив свинцю на хондроцити цієї частини диску. Порушення біосинтетичної функції хондроцитів може бути однією з причин негативних змін у матриксі через недостатність макромолекул, які формують матрикс, що ймовірно призвело до достовірного зменшення висоти міжхребцевого диску в крайових відділах.

У драглистому ядрі на мікроскопічному рівні не виявлено таких порушень як у волокнистому кільці. Однак встановлено формування островків, що нагадували хрящову тканину та заміщували гелеподібну структуру драглистого ядра, що є однією з ознак початку дегенерації міжхребцевого диску. На ультрамікроскопічному рівні зафіксовано невеликі дистрофічні зміни (гідропічна дистрофія) у цитоплазмі окремих нотохордальних клітин синцитієподібної структури.

4.2.3 Порівняльний аналіз впливу свинцю на міжхребцеві диски щурів різного віку

У міжхребцевому диску щурів обох груп спостерігали дегенеративні зміни після впливу свинцю. Так, як у молодих, так і у щурів з модельованим остеопорозом було виявлено зниження висоти у крайових відділах міжхребцевого диску, що вірогідно пов'язано з тріщинами та розволокненням колагенових пластинок у волокнистому кільці. Однак у молодих щурів також було встановлено зниження висоти у центральній частині міжхребцевого диску, ширини пластинок волокнистого кільця, а також зниження щільності клітин у волокнистому кільці та драглистому ядрі. Виявлені порушення у центральній частині диску можна пояснити наявністю дистрофічних змін у нотохордальних клітинах молодих щурів, чого не було виявлено у щурів з остеопорозом. Крім того, у щурів з остеопорозом у волокнистому кільці спостерігалось формування великих залишкових тілець,

що є результатом аутофагії, яка є адаптаційною реакцією на дію негативних факторів та попереджує загибель клітини [175]. Цим можливо пояснюється відсутність достовірного зниження щільності клітин у цій частині диску тварин з остеопорозом.

Однак у волокнистому кільці тварин обох груп у хондроцитах також спостерігали схожі дегенеративні зміни, а саме: формування деструктивних порожнин, вакуолізацію цитоплазми та деградацію органел, але з більшим проявом у молодих щурів. Так, у щурів з остеопорозом відзначали переважно деградацію органел з переважанням в цитоплазмі мікротрубочок та мікрофіламентів, тоді як у молодих – формування великих деструктивних порожнин та вакуолізацію цитоплазми. У внутрішньому відділі волокнистого кільця відмічено формування великих ізогенних груп хондроцитів, особливо у молодих тварин, що може свідчити про адаптаційну реакцію у відповідь на дегенеративні зміни у диску. Крім того формування великих ізогенних груп у внутрішньому відділі волокнистого кільця є однією з ознак дегенерації диску [164, 173]. У матриксі волокнистого кільця щурів обох груп виявлено наявність електроннощільних ділянок, що можуть вказувати на мінералізацію матриксу та можливе накопичення свинцю.

Отже, вплив свинцю викликає більші дегенеративні зміни у міжхребцевому диску молодих щурів, діючи як на структуру матриксу, так і на клітинний склад.

4.3 Гістологічний аналіз з ультрамікроскопією дуговідросткових суглобів щурів різного віку

4.3.1 Структурні особливості дуговідросткових суглобів молодих щурів

Під час гістологічного аналізу дуговідросткових суглобів тварин контрольної групи чіткого поділу суглобового хряща на кальцифікований і некальцифікований хрящ не було виявлено. Лінія tidemark, що відокремлює ділянки кальцифікованого і некальцифікованого хряща, була відсутня

(рис. 4.70). Суглобова поверхня мала рівномірні контури. Суглобовий хрящ складався з 3 зон – поверхневої, середньої та глибокої, відповідно до класифікації для міжхребцевих суглобів щурів (рис 4.71) [176].

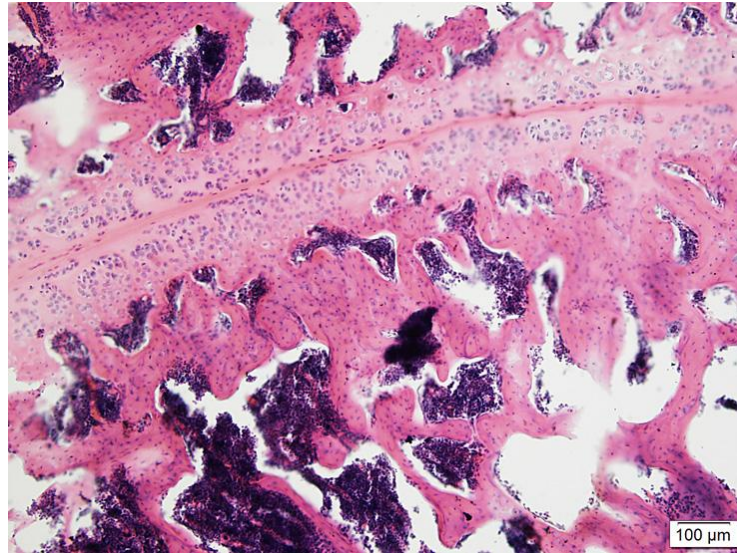


Рис. 4.70. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. Контрольна група. Зabarвлення гематоксилином та еозином. Збільшення 100.

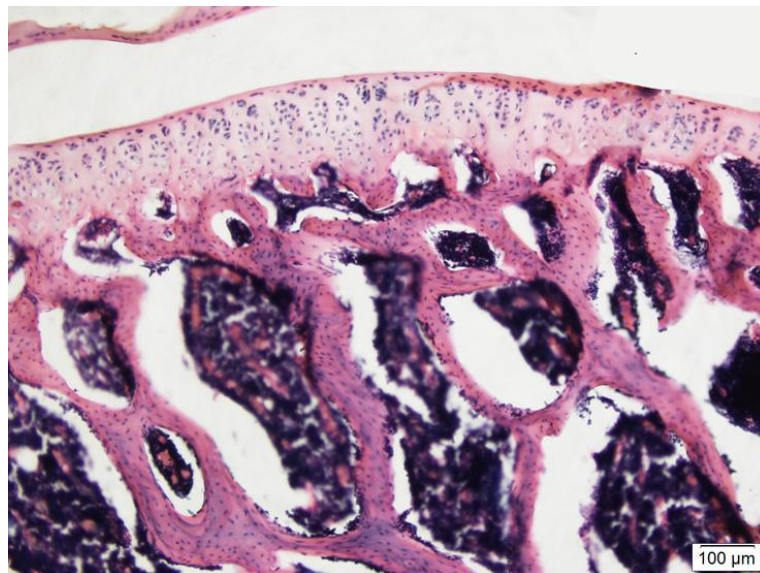


Рис. 4.71. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. Зональне розташування хондроцитів. Контрольна група. Зabarвлення гематоксилином та еозином. Збільшення 100.

У поверхневій зоні зустрічалися рідко розташовані хондроцити витягнутої форми. У середній зоні, в частині прилеглої до поверхневої зони, спостерігалися хондроцити в ізогенних групах по 2-3 клітини. У глибокій зоні клітини збільшувалися в розмірах, і відмічалася їх гіпертрофія і вакуолізація цитоплазми, зустрічалися розширені порожні лакуни.

У тварин дослідної групи в суглобовому хрящі дуговідросткових суглобів при гістологічному аналізі було виявлено, що суглобова поверхня мала переривчасті контури, зустрічалися тріщини (рис. 4.72). В разі застосування морфометричного аналізу було встановлено, що довжина суглобової поверхні, що мала нерівності, складає 14,3 % від загальної довжини суглобової поверхні, що свідчить про первинні дегенеративні зміни у суглобовій поверхні. Хондроцити цієї зони були малочисельні, в окремих клітинах спостерігався каріопікноз.

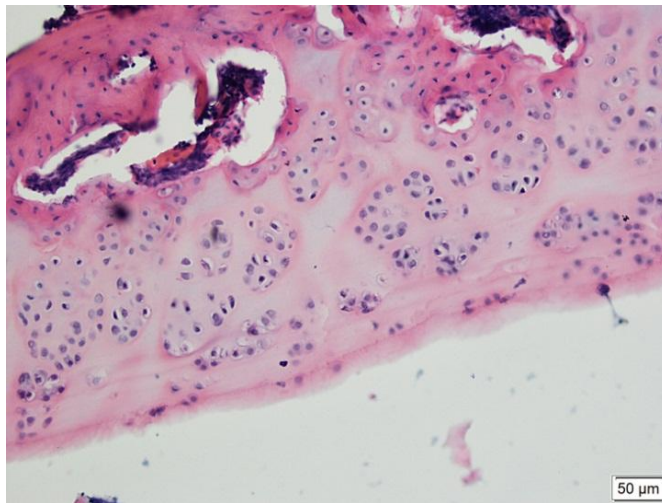
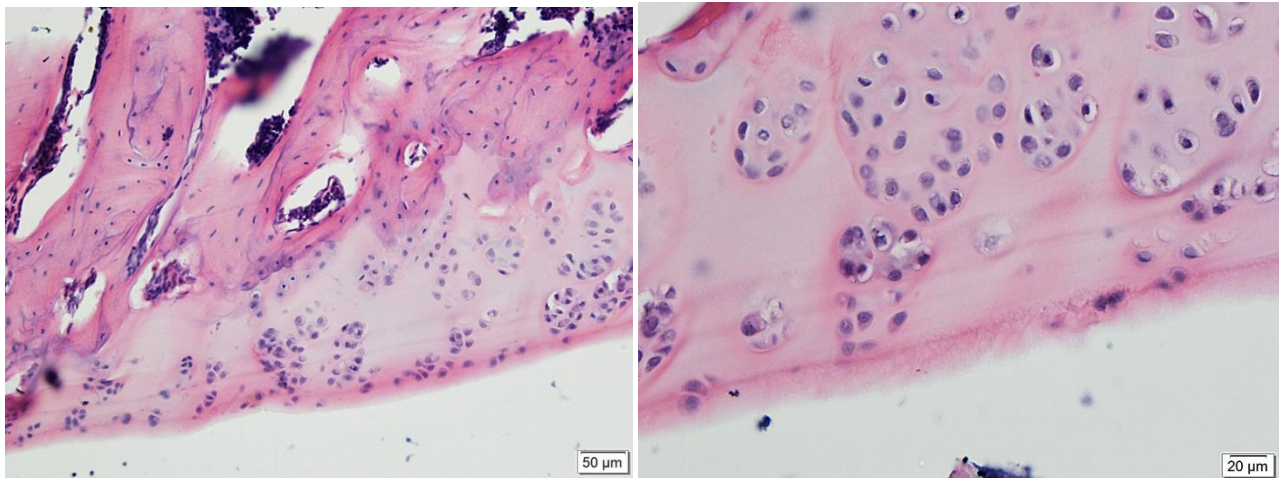


Рис. 4.72. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. Суглобова поверхня з порушеннями. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

У середній зоні суглобового хряща щільність клітин була нерівномірною – зустрічалися ділянки як з низькою щільністю клітин, так і з високою (рис. 4.73, а). Деякі клітини у ізогенних групах мали пікнотичні

ядро, навколо таких ізогенних груп спостерігали тріщини у матриксу (рис. 4.73, б).



а

б

Рис. 4.73. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. А) Нерівномірна щільність клітин у середній зоні суглобового хряща. Збільшення 200. Б) Загибель хондроцитів у ізогенних групах. Тріщини навколо них. Дослідна група. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення 400.

Матрикс суглобового хряща мав неоднорідне забарвлення, що свідчить про порушення його тінкторіальних властивостей (рис. 4.74). Структура глибокої зони не мала відмінностей від контролю.

За даними проведеного морфометричного аналізу у тварин дослідної групи було виявлено статистично значиме зниження в 1,3 раза ($p = 0,01$) висоти суглобового хряща порівняно з контролем. Так, висота суглобового хряща у тварин дослідної групи становила $128,22 \pm 1,48$ мкм, а у контрольних тварин – $162,73 \pm 1,17$ мкм.

Під час електронномікроскопічного аналізу було виявлено, що хондроцити поверхневої зони у суглобовому хрящі дуговідросткових суглобів тварин *контрольної групи* розташовувалися паралельно лінії

суглобової поверхні, мали витягнуту форму, велике гетерохромне ядро і добре розвинену гЕПС.

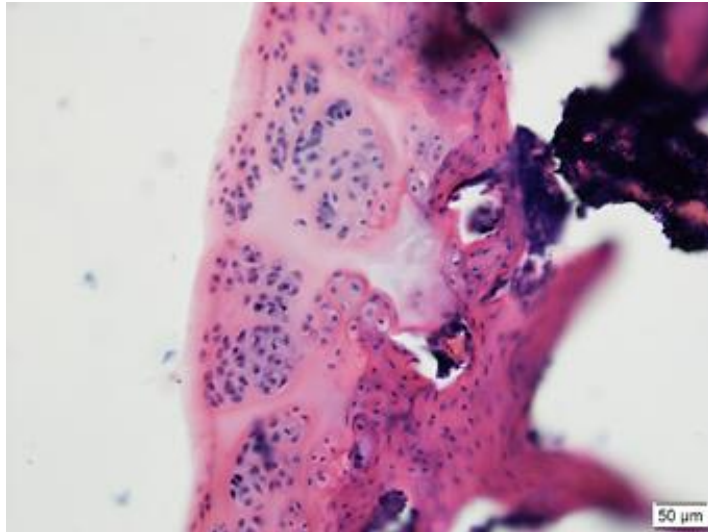


Рис. 4.74. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба Неоднорідна структура матриксу у середній зоні суглобового хряща. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

Матрикс був представлений тонкими колагеновими фібрилами. У середній зоні хондроцити розташовувалися в ізогенних групах, які склалися з двох, рідко трьох клітин, що знаходилися в лакунах. Зустрічалися клітини з гетерохромним ядром та гЕПС. Інші хондроцити мали еухромне ядро, розвинену мережу каналців агранулярної ендоплазматичної сітки (аЕПС) та комплекси Гольджі в цитоплазмі (рис. 4.75). Також відмічено велику кількість мітохондрій. Наявність хондроцитів з різним типом ендоплазматичної сітки свідчить про нормальне протікання процесу біосинтезу компонентів матриксу. Відомо, що аЕПС відповідає за синтез глікозаміногліканів, які є одним з головним компонентів матриксу, тоді як у гЕПС відбувається синтез білків та їх модифікація, а саме протеогліканів, складовою частиною яких є глікозаміноглікани, а також колагену. У матриксі середньої зони колагенові фібрили були більш товстими, порівняно з поверхневою зоною.

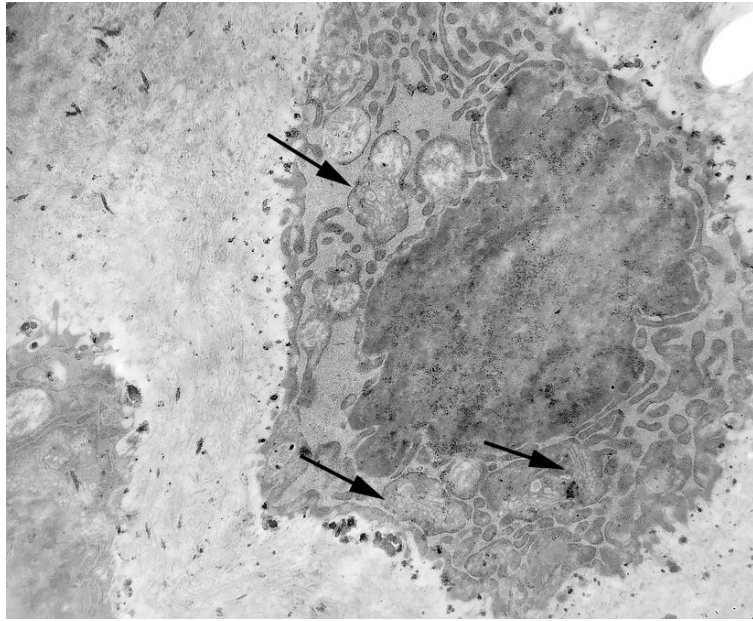


Рис. 4.75. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Середня зона. Фрагмент ізогенної групи з двох хондроцитів. Хондроцит з комплексами Гольджі (стрілки). Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

У глибокій зоні були виявлені гіпертрофовані хондроцити, що розміщувалися у лакунах, контури яких мали ознаки кальцифікації, тобто були електроннощільними.

У дослідній групі щурів в поверхневій зоні були виявлені одиничні життєздатні хондроцити. Зустрічалися ізогенні групи з двох хондроцитів, один з яких перебував у стані некрозу (рис. 4.76). У цитоплазмі хондроцитів в таких групах переважали компоненти цитоскелету, що свідчить про їх низьку біосинтетичну активність.

У середній зоні були відмічені ізогенні групи хондроцитів, що склалися з клітин з гіперхромним ядром, аЕПС та одиничними мітохондріями в цитоплазмі, які були гіпертрофовані та з порушеною структурою крист (4.77, а). Поряд з цим виявлені хондроцити з гіперхромним ядром, розширеними цистернами гЕПС та гіпертрофованим апаратом Гольджі у цитоплазмі (рис. 4.77, б).

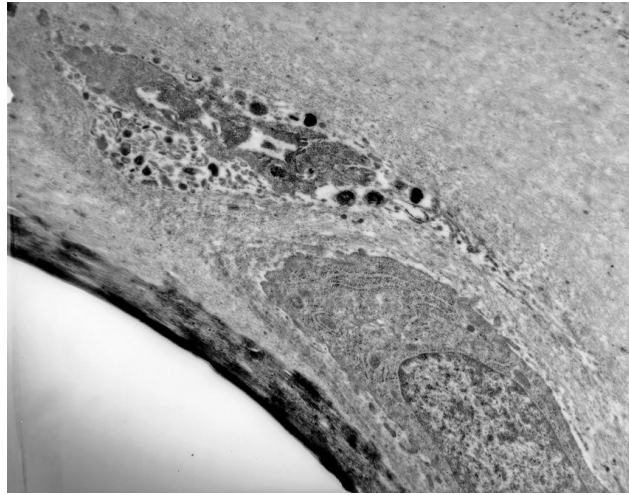


Рис. 4.76. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Хондроцит поверхневої зони з лізосомами в цитоплазмі. Детрит. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

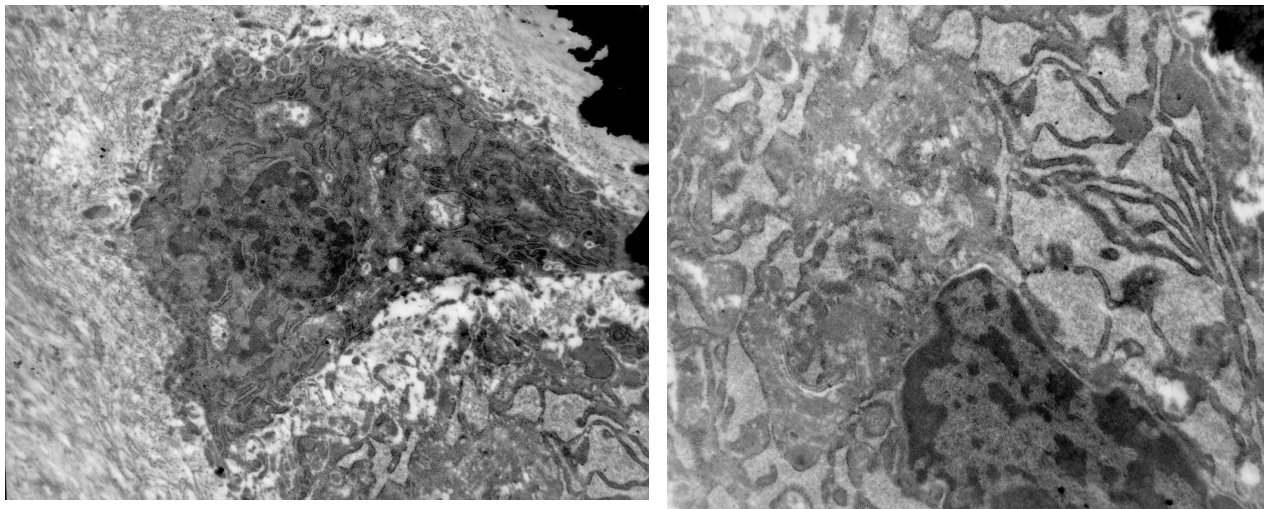


Рис. 4.77. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Середня зона. Ізогенна група хондроцитів. А) Хондроцит з аЕПС. Б) Фрагмент хондроциту з гіпертрофованим апаратом Гольджі поблизу ядра та гЕПС. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

Гіпертрофія апарату Гольджі пов'язана з переповненням діктіосом продуктами біосинтезу, можливо внаслідок порушення його секреторної функції. Матрикс середньої зони був розрідженим, колагенові фібрили розташовувалися на відстані одне від одного, зустрічалися ділянки гіалінозу

(рис. 4.78), а також зони ущільнення колагенових фібрил, що свідчить про неоднорідність структури хрящового матриксу.

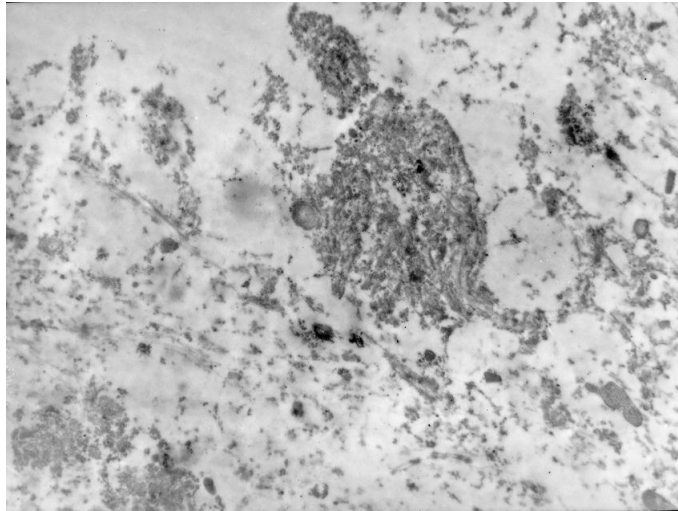


Рис. 4.78. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Порушення структурної організації матриксу суглобового хряща. Гіаліноз. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

Поблизу хондроцитів з порушеною структурною організацією в перицелюлярному матриксі виявляли ділянки глибокого розпаду. Відзначено присутність хондроцитів у стані некрозу (рис. 4.79).

У глибокій зоні суглобового хряща дослідної групи не виявлено відмінностей від структурної організації клітин та матриксу контрольних щурів.

Однією з головних причин болю у нижній частині спини вважають остеоартроз дуговідросткових суглобів [177, 178]. Згідно з клінічними дослідженнями 15-40 % пацієнтів з білью у спині мають це захворювання [178]. Крім того дегенеративні зміни у дуговідросткових суглобах виявляють як у ранньому віці (в 15 років), так і в похилому, де вони складають до 80 % [179].

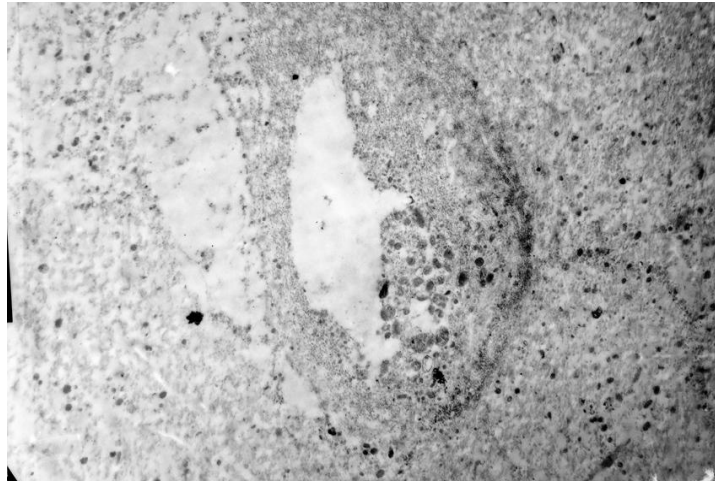


Рис. 4.79. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Середня зона. Детрит у лакуні. Порушення структури матриксу. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 10000.

Серед факторів ризику виникнення цього захворювання називають вік, надмірну вагу тіла, травми, професійні фактори, паління, дегенерацію міжхребцевого диска та інші [179]. Однією з гіпотез механізму дії свинцю на суглобовий хрящ є його вплив через суглобову рідину. У дослідженні впливу свинцю на суглобовий хрящ стегнової та великогомілкової кісток курчат, автори виявили ушкодження суглобової поверхні, що вірогідно підтверджує такий спосіб дії цього елемента [31]. Однак можна розглядати також і субхондральну кісткову тканину у якості джерела свинцю. Відомо, що на ранніх стадіях остеоартрозу зростає інтенсивність кісткової резорбції у субхондральній кістці [180], що збільшує вірогідність впливу свинцю, накопиченого у структурі кісткової тканини, на суглобовий хрящ. Крім того доведено, що між субхондральною кісткою та кальцифікованим хрящем суглоба відбувається постійний обмін поживними речовинами [181].

Вплив свинцю на дуговідросткові суглоби молодих щурів викликає порушення цілісності суглобової поверхні, що має прояв у вигляді нерівних контурів, а також зменшення кількості хондроцитів у поверхневій зоні, внаслідок їх загибелі. У середній зоні відмічено появу безклітинних ділянок, а у хондроцитах цієї зони встановлено гіпертрофію апарату Гольджі в

цитоплазмі та загибель клітин, що може свідчити про неспроможність клітин синтезувати та секретувати компоненти матриксу. Порушення структури матриксу у вигляді його розволокнення та гомогенізації, виявлене під час електронномікроскопічного дослідження підтверджує це припущення.

Отже виявлене зниження висоти суглобового хряща дуговідросткових суглобів в 1,3 раза викликано порушенням цілісності суглобової поверхні, зміною структури хрящового матриксу, а також дистрофічними порушеннями в хондроцитах поверхневої і середньої зон.

4.3.2 Структурні особливості дуговідросткових суглобів щурів зрілого віку з модельованим остеопорозом

У контрольній групі щурів під час дослідження дуговідросткових суглобів виявлено, що суглобова поверхня була на ділянках нерівною. Суглобовий хрящ був представлений трьома зонами, які чітко між собою не були чітко відокремлені (рис. 4.80, а).

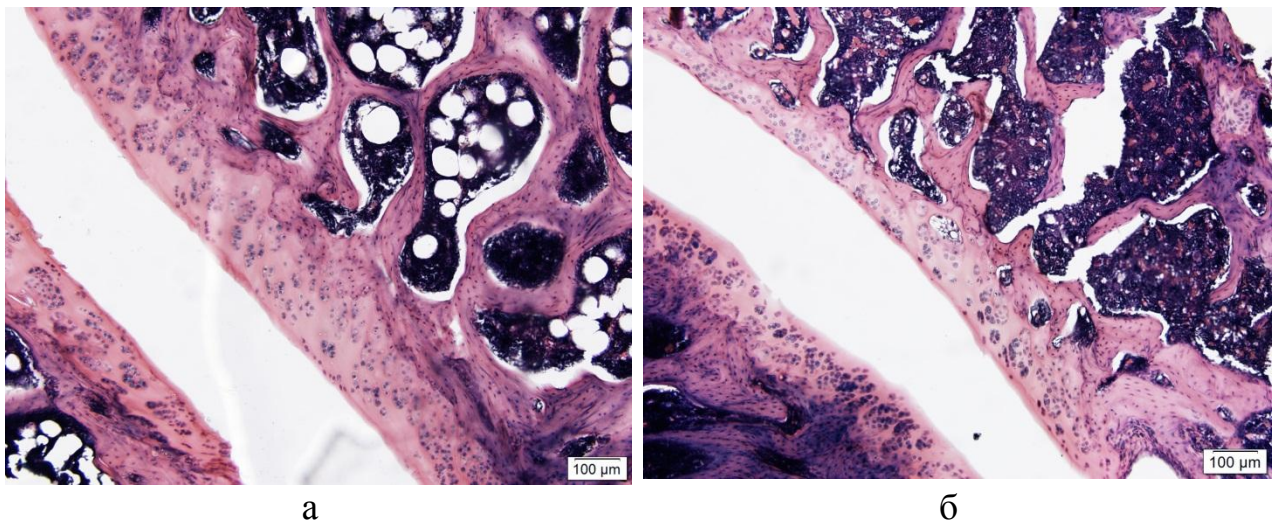


Рис. 4.80. Мікрофотографії зрізів дуговідросткових суглобів щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення 100.

Лінія, що розділяє некальцифікований та кальцифікований хрящ була переривчастою та відсутня на ділянках.

У поверхневій зоні зустрічалися поодинокі хондроцити сплющеної форми, чималі ділянки цієї зони були безклітинними (рис. 4.81). На місцях відсутності клітин спостерігали розшарування суглобової поверхні, що свідчить про первинні дегенеративні зміни хрящової тканини у суглобі. Також зрідка зустрічалися невеликі ізогенні групи хондроцитів по 2-3 клітини.

У середній зоні хондроцити зустрічалися великі групи по 4-5 хондроцитів. Клітини були значно більші за розміром відносно хондроцитів поверхневої зони за рахунок площі цитоплазми, що свідчить про їх синтетичну активність та є характерним для клітин цієї зони суглобового хряща.

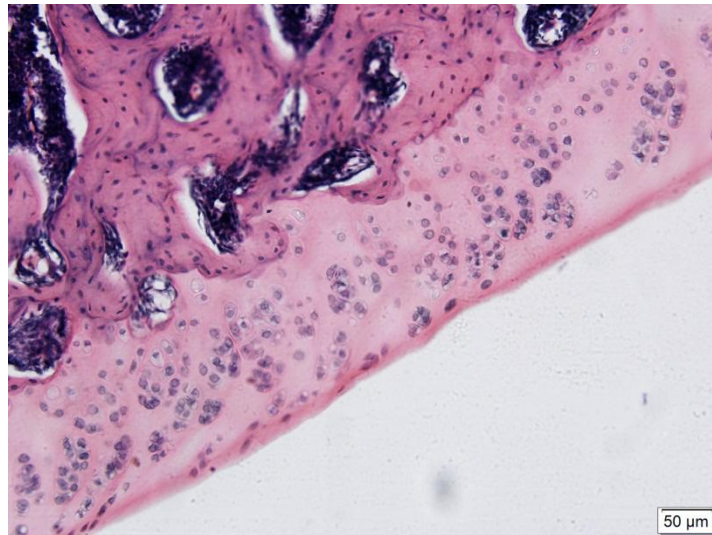


Рис. 4.81. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. Контрольна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

У глибокій зоні також спостерігали хондроцити у ізогенних групах, аналогічно до середньої зони. Однак деякі клітини у цих групах мали ядро, яке чітко не візуалізувалося, вірогідно через загибель клітини, або мали гіпертрофовані розміри за рахунок вакуолізованої цитоплазми. Часто траплялися поодинокі клітини з пікнотичним ядром.

Особливої уваги потребує вивчення стану субхондральної кісткової тканини у дуговідросткових суглобах внаслідок моделювання остеопорозу у

цій експериментальній серії щурів [182, 183]. Субхондральна кісткова тканина, що розміщувалася безпосередньо під глибокою зоною суглобового хряща була представлена кістковими трабекулами, які в переважній більшості розташовувалися перпендикулярно суглобовій поверхні та з'єднувалися між собою поперечними трабекулами (рис. 4.80, а). Однак внаслідок моделювання остеопорозу трабекули на ділянках були потоншені, а їх поверхня мала нерівні обриси. Цементні лінії розташовувалися паралельно, а у місцях з'єднання трабекул – хаотично. Остеоцити розташовувалися у лакунах та були розподілені відносно рівномірно у кістковому матриксі, однак зустрічалися і безклітинні ділянки. Міжтрабекулярні простори були заповнені червоним кістковим мозком, який межував з ділянками жовтого кісткового мозку, що свідчить про зменшення кількості мезенхімальних клітин, які можуть диференціюватися у остеобласти, а також є характерним для тварин цього віку.

У дослідній групі щурів у дуговідросткових суглобах, як і в контрольній групі виділяли 3 зони у суглобовому хрящі (рис. 4.80, б). Лінія tidemark також не була суцільною, що ймовірно є структурною особливістю дуговідросткових суглобів щурів цього віку. Суглобова поверхня мала чималі ділянки з нерівними контурами. У поверхневій зоні спостерігали великі безклітинні ділянки, що може свідчити про прогресування дегенеративних змін у суглобовому хрящу під впливом свинцю. Крім того було відзначено формування ізогенних груп хондроцитів по 5-6 клітин, що є нехарактерним для структури цієї зони та спостерігається на ранніх стадіях остеоартрозу (рис. 4.82) [178].

У середній зоні виявлено невеликі безклітинні ділянки. Також спостерігали збільшення кількості гіпертрофованих хондроцитів у ізогенних групах та клітин з каріопікнозом. Набуття хондроцитами гіпертрофічного фенотипу спостерігається у дуговідросткових суглобах при остеоартрозі [184].

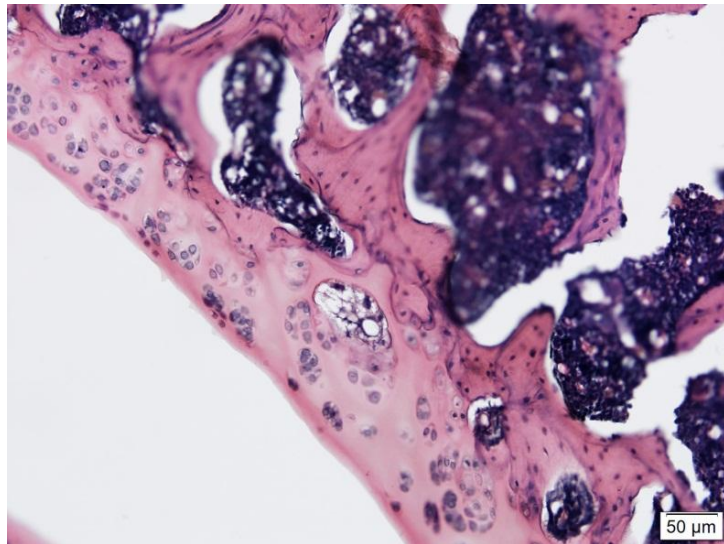


Рис. 4.82. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. Порухнення структури поверхневої зони суглобового хряща. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

У глибокій зоні суглобового хряща дослідних тварин спостерігали формування одиничних тріщин у матриксу (рис. 4.83). Вони розташовувалися біля угруповань хондроцитів та контурами нагадували обриси ізогенних груп. Клітини поблизу тріщин мали пікнотичні ядра, що свідчить про їх загибель.

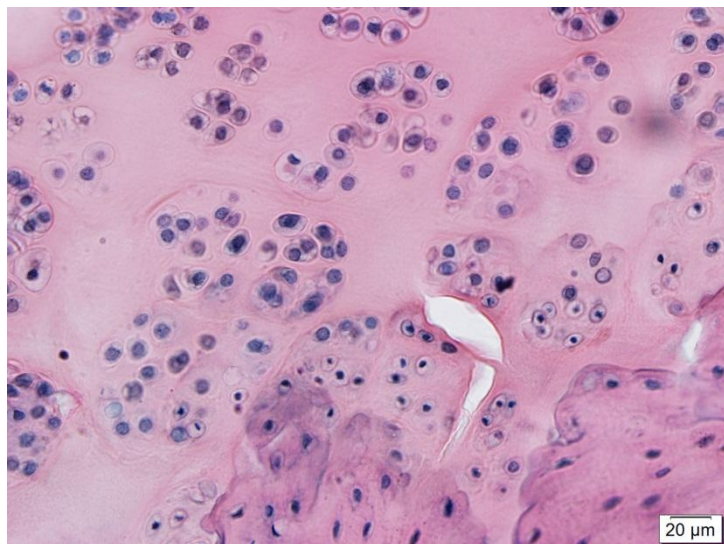


Рис. 4.83. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. Тріщини у глибокій зоні суглобового хряща. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

Поява тріщин у структурі хрящового матриксу може свідчити про порушення його тінкторіальних властивостей, внаслідок чого зменшується спроможність хряща здійснювати опір механічним навантаженням, що є головною функцією цієї структури. Також привертає увагу розташування цих тріщин, а саме у безпосередній близькості до субхондральної кісткової тканини, яка може слугувати джерелом накопиченого в ній свинцю.

У структурі субхондральної кісткової тканини спостерігали зменшення кількості кісткових трабекул безпосередньо під суглобовим хрящем (рис. 4.84).

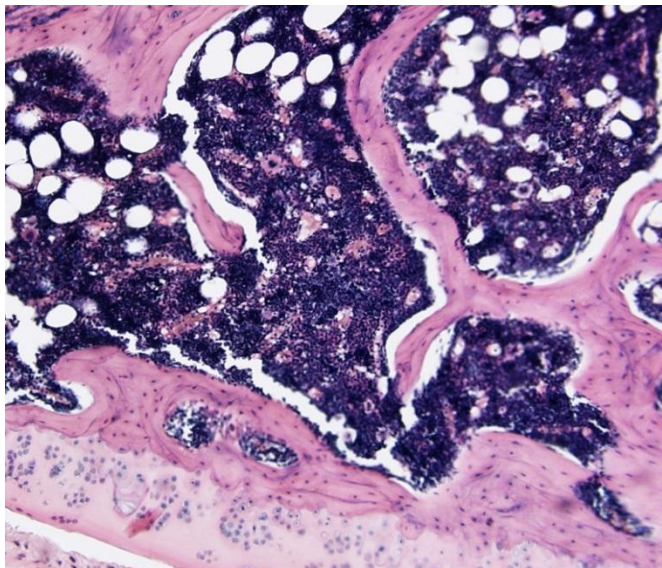


Рис. 4.84. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. Поодинокі кісткові трабекули під суглобовим хрящем. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

Зустрічалися ділянки з відсутністю трабекул. У кістковому матриксі під суглобовим хрящем відмічено появу пустих лакун без остеоцитів, вірогідно внаслідок загибелі цих клітин (рис. 4.85).

Під час морфометричного аналізу було встановлено вірогідне зменшення висоти суглобового хряща після впливу свинцю в 1,4 раза, а також збільшення тривалості ерозованої поверхні в 1,6 раза порівняно з контрольною групою (табл. 4.11).

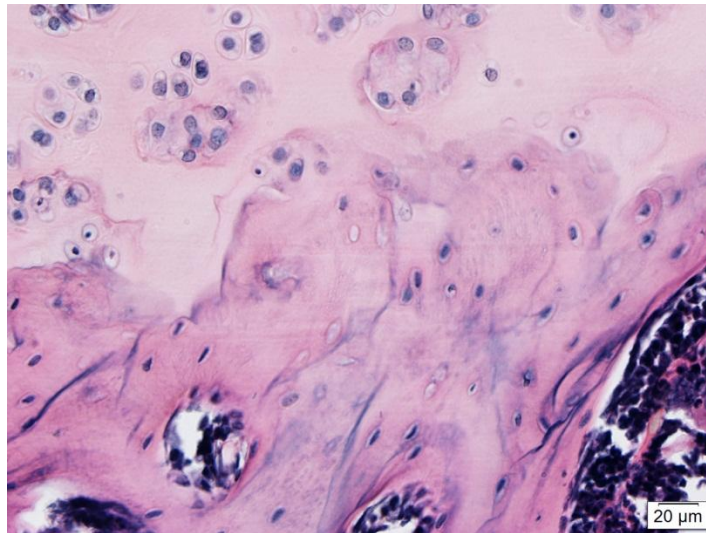


Рис. 4.85. Мікрофотографія зрізу дуговідросткового суглоба. Пусті лакуни остеоцитів у субхондральній кістці. Дослідна група. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 200.

Таблиця 4.11

Морфометричні параметри дуговідросткових суглобів щурів з модельованим остеопорозом ($M \pm m$)

| Параметри | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--|-------------------|-------------------|------|
| Висота суглобового хряща (мкм) | $150,22 \pm 2,53$ | $104,75 \pm 3,47$ | 0,01 |
| Відносна довжина ерозованої поверхні (%) | $24,86 \pm 2,34$ | $40,22 \pm 1,66$ | 0,01 |

Зменшення висоти суглобового хрящу та розшарування суглобової поверхні свідчить про первинні дегенеративні зміни у суглобах після впливу свинцю. Однією з ланок механізму впливу може бути субхондральна кісткова тканина, яка завдяки структурним особливостям здатна накопичувати свинець, на відміну від хрящової тканини, та може слугувати його джерелом і впливати на прилеглі до неї ділянки хрящової тканини.

Електронномікроскопічне дослідження. В контрольній групі щурів у поверхневій зоні суглобового хряща дуговідросткових суглобів виявляли поодинокі хондроцити видовженої форми з гетерохромним ядром та

розвиненою мережею каналців гЕПС (рис. 4.86). Крім того, у цитоплазмі цих клітин спостерігали поодинокі мітохондрії. Виявлені органели вказують на високий біосинтетичний та енергетичний потенціал клітин. Так, важливою функцією хондроцитів є підтримання цілісності структури матриксу суглобової поверхні, через це наявність цих клітин у стані функціональної активності свідчить про спроможність хрящової тканини підтримувати гомеостаз.

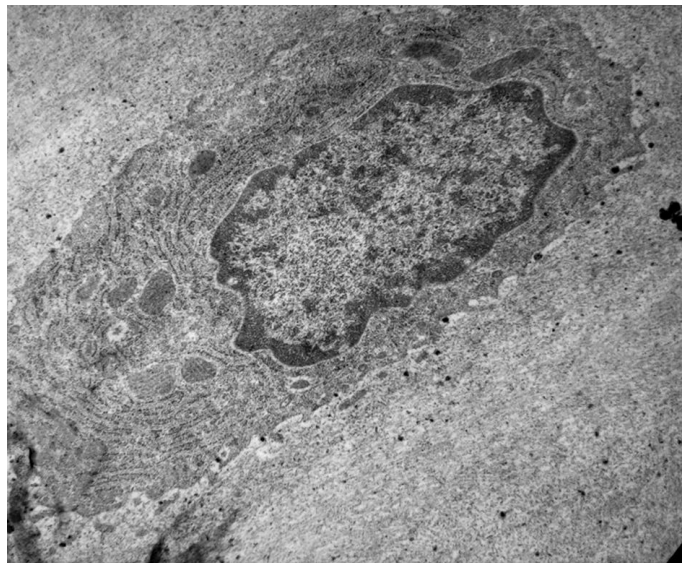


Рис. 4.86. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Поверхнева зона. Хондроцит видовженої форми з гетерохромним ядром. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

У середній зоні спостерігали ізогенні групи хондроцитів округлої форми по 2-3 клітини. Клітини в них містили гетерохромне ядро, а деякі з них – ядерце (рис. 4.87).

Відмічено зростання кількості мітохондрій в цитоплазмі порівняно з клітинами поверхневої зони. Також у хондроцитах була розвинена мережа каналців гЕПС. Зустрічалися хондроцити у ізогенних групах з великою кількістю мітохондрій у цитоплазмі, що може свідчити про високу енергетичну активність клітин (рис. 4.88, а,б).

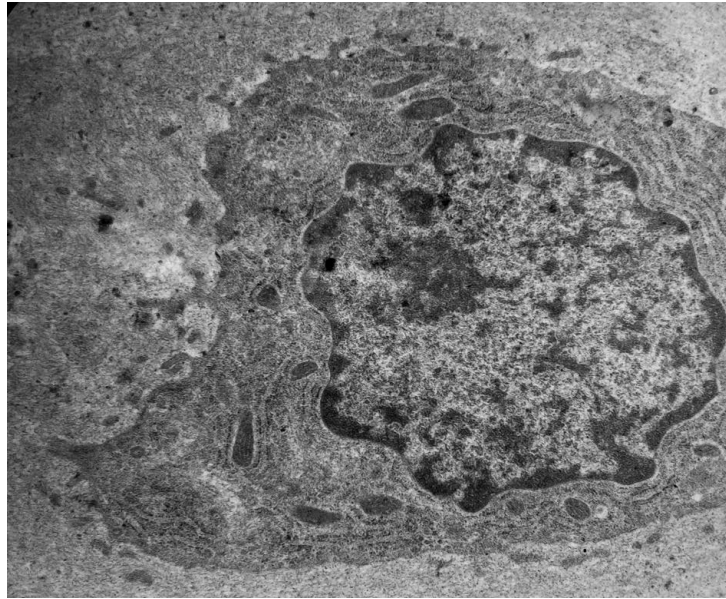
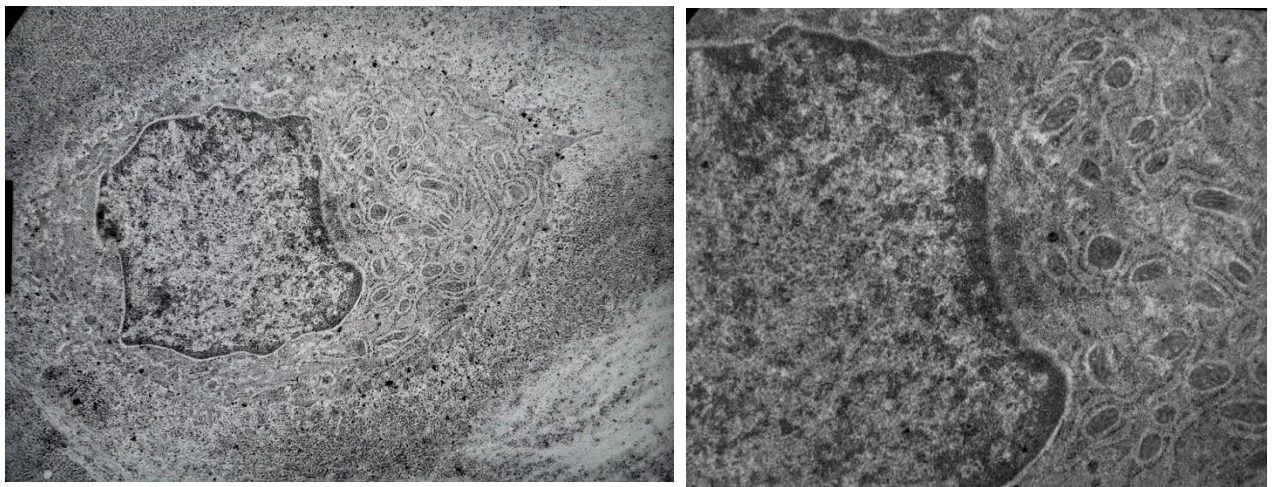


Рис. 4.87. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Середня зона. Хондроцит з ядрцем. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.



а

б

Рис. 4.88. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Середня зона. А) Хондроцит з великою кількістю мітохондрій. Збільшення 8000. Б) Фр. рис. 4.88, а. Мітохондрії поблизу ядра. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 168000.

У глибокій зоні спостерігали клітини, що мали гіперхромне ядро, а у їх цитоплазмі переважали мікротрубочки та мікрофіламенти (рис. 4.89).

Вірогідно такі клітини мали низьку біосинтетичну активність, що характерно для цієї зони.

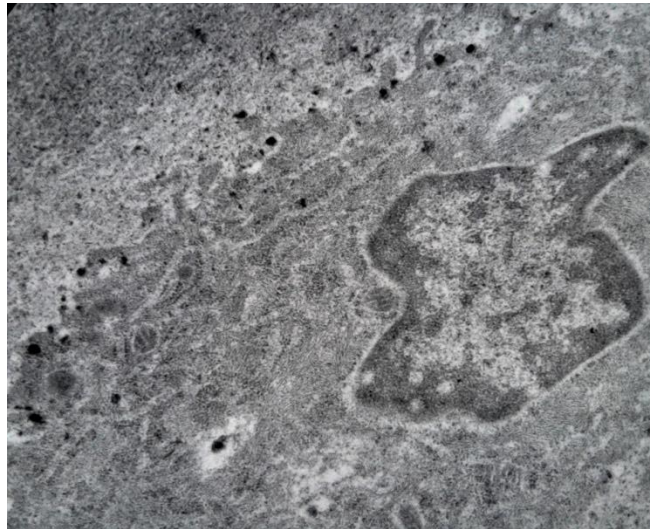


Рис. 4.89. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Глибока зона. Хондроцит з залишковим тільцем. Контрольна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 15600.

У дослідних тварин у поверхневій зоні спостерігали поодинокі хондроцити з гіперхромним ядром та численною кількістю залишкових тілець та вакуолей в цитоплазмі (рис. 4.90). Крім того, в ній переважали мікротрубочки та мікрофіламенти, що є ознакою слабкої метаболічної активності хондроцитів.

У середній зоні, як і в контрольній групі, виявляли хондроцити у ізогенних групах (рис. 4.91).

Клітини мали гетерохромні ядра та добре розвинену гЕПС, що вказувало на їх високу функціональну активність, з іншого боку наявність численних вакуолей у цитоплазмі свідчить про дистрофічні зміни у цих хондроцитах. Крім того зустрічалися клітини у цитоплазмі яких відмічено появу невеликих деструктивних порожнин різної форми, локалізованих найчастіше поблизу ядра (рис. 4.92, а, б).

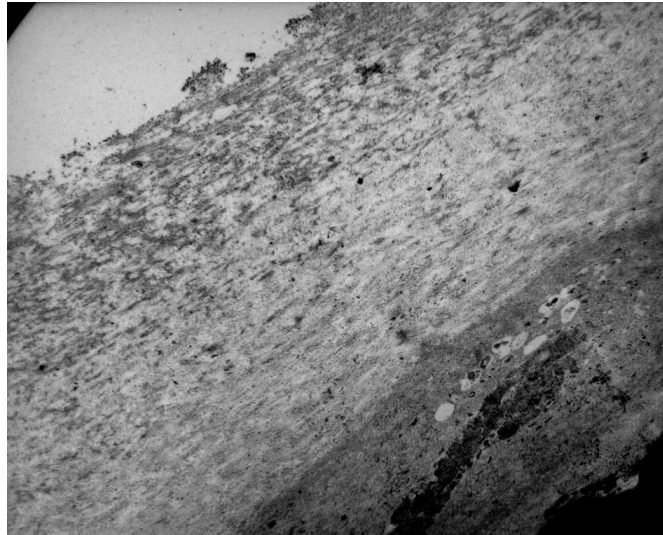


Рис. 4.90. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Поверхнева зона. Хондроцит поблизу розволокнутої суглобової поверхні. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

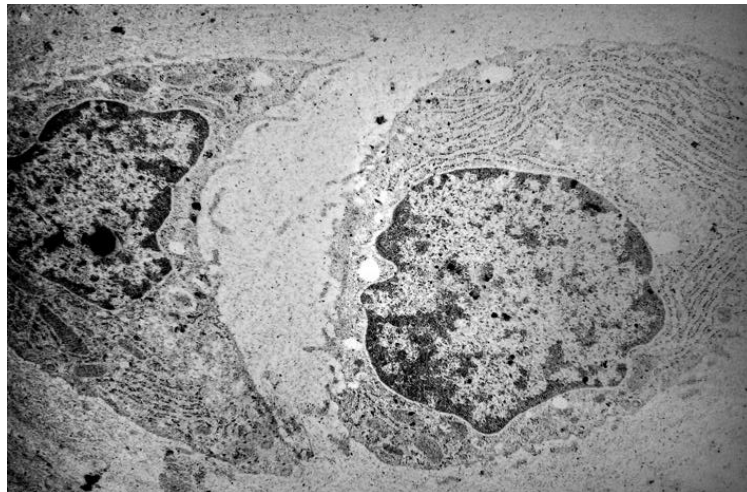


Рис. 4.91. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Середня зона. Ізогенна група хондроцитів. Вакуолізація цитоплазми. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 6000.

Так само, як і в контролі, спостерігали наявність чималої кількості мітохондрій, однак деякі з них були осміофільними, що може свідчити про їх загибель (рис. 4.92, 4.93). Поряд з цим спостерігали гомогенізацію цитоплазми у клітинах з осміофільними мітохондріями.

У глибокій зоні не були виявлено відмінностей в ультраструктурній організації порівняно з контрольною групою.

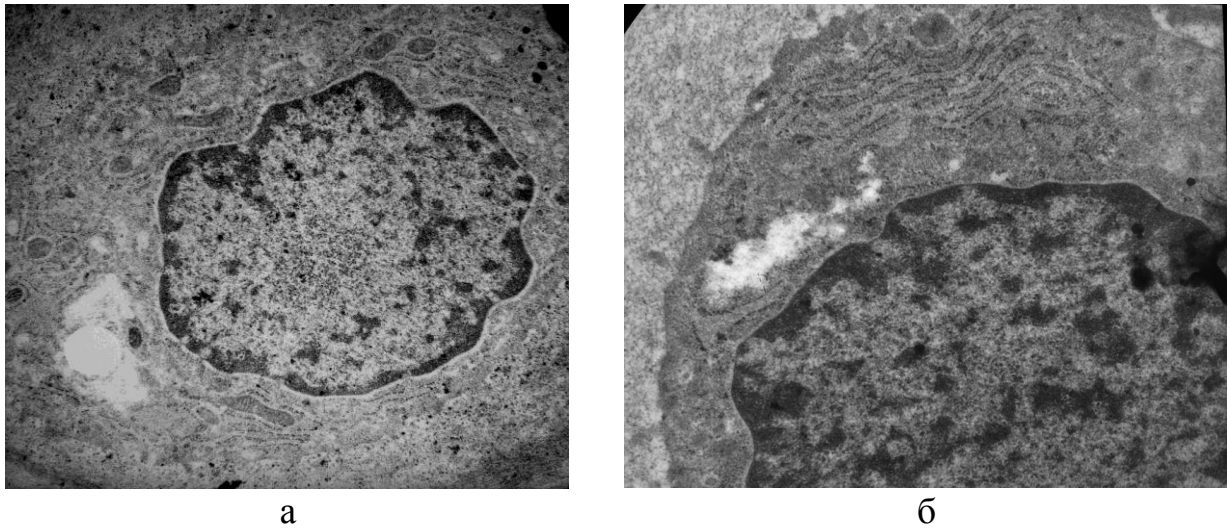


Рис. 4.92. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Середня зона. А, Б: Деструктивні порожнини різної форми у цитоплазмі хондроцитів. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. А) Збільшення 8000. Б) 15600.

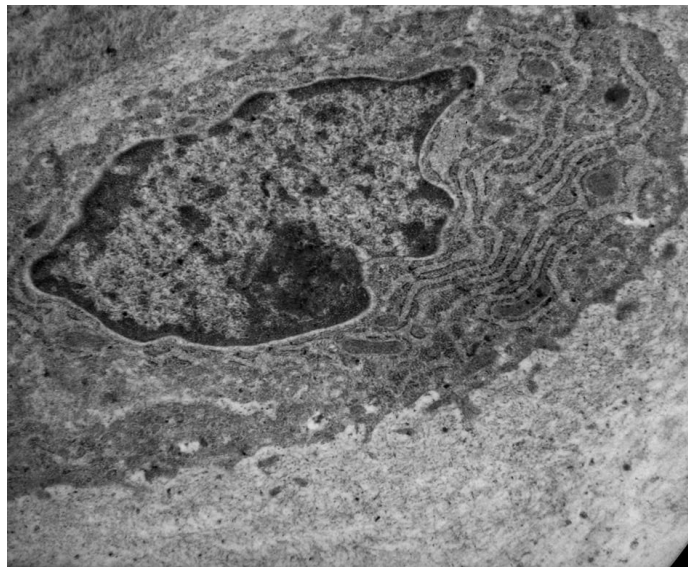


Рис. 4.93. Мікрофотографія електроннограми. Суглобовий хрящ. Середня зона. Хондроцит з ділянкою гомогенізації цитоплазми та загибеллю мітохондрій. Дослідна група. Контрастування за Рейнольдсом. Збільшення 8000.

Таким чином у дуговідросткових суглобах щурів з остеопорозом після впливу свинцю відмічено збільшення довжини нерівної суглобової поверхні через її розволокнення, внаслідок зменшення кількості клітин у поверхневій та середній зонах, що синтезують компоненти матриксу. Встановлено появу тріщин у матриксі глибокої зони, можливо внаслідок впливу свинцю, накопиченого у кістковій тканині під суглобовим хрящем. Крім того виявлено зменшення площі субхондральної кісткової тканини, також можливо через вплив свинцю у її структурі.

Під час більш детального вивчення стану клітин суглобового хрящу, шляхом використання методу електронної мікроскопії, встановлено, що у поверхневій зоні відбувається деградація мембранних органел у хондроцитах, що виражається в переважанні в їх цитоплазмі компонентів цитоскелету та появи великої кількості залишкових тілець. У середній зоні, не дивлячись на високий біосинтетичний потенціал клітин, спостерігали появу деструктивних порожнин у цитоплазмі та загибель мітохондрій. Такі структурні зміни могли призвести до зниження біосинтетичної активності клітин та порушенню їх функції біосинтезу макромолекул хрящового матриксу.

Можна припустити, що виявлене вірогідне зниження висоти суглобового хряща у дослідних тварин було наслідком виявлених структурних змін, як на тканинному, так і на клітинному рівні.

4.2.3 Порівняльний аналіз впливу свинцю на дуговідросткові суглоби щурів різного віку

У щурів обох груп були виявлені дегенеративні зміни у суглобовому хрящі дуговідросткових суглобів, однак у щурів з остеопорозом вони мали більший прояв. Так, зафіксовано зниження висоти суглобового хряща у щурів з остеопорозом в 1,4 раза, а у молодих тварин – в 1,3 раза. Довжина еродованої суглобової поверхні збільшилася у щурів з остеопорозом після впливу свинцю також більш суттєво, ніж у молодих тварин (на 61,8 та

14,3 %, відповідно). Це можливо пояснити таким чином. Згідно результатам J.D. Holz зі співав. [67] свинець може діяти на суглобову поверхню перебуваючи у складі суглобової рідини. Отже при підвищенні кісткової резорбції, що спостерігається на фоні остеопорозу, його рівень свинцю у крові зростає, а ймовірно і у суглобовій рідині, що свідчить про більший його вплив на суглобову поверхню. У поверхневій зоні обох груп спостерігали вакуолізацію цитоплазми хондроцитів, траплялися загиблі клітини. За даними експериментальних досліджень загибель хондроцитів поверхневої зони є ознакою первинної стадії остеоартрозу та супроводжується деградацією хрящового матриксу [185-187]. У щурів з остеопорозом також спостерігали кластерізацію хондроцитів у поверхневій зоні, що є порушення характерної структури цієї зони.

У середній зоні суглобів щурів з остеопорозом дегенеративні зміни в клітинах були більш виражені – спостерігали формування деструктивних порожнин, загибель мітохондрії, тоді як у молодих щурів виявлені ділянки гомогенізації цитоплазми. Однак, під час електронномікроскопічного дослідження у молодих тварин було встановлено неоднорідність будови хрящового матриксу у середній зоні суглобового хряща, його розволокнення, чого у щурів з остеопорозом не спостерігали, що можливо пояснює зниження висоти у молодих щурів внаслідок порушень структури хрящового матриксу цієї зони.

У глибокій зоні у щурів з остеопорозом відзначено появу тріщин, що можливо пов'язано з дією свинцю на цю зону внаслідок більш активної перебудови субхондральної кістки на фоні остеопорозу та вивільнення через це свинцю. Зменшення площі субхондральної кістки, встановлене у щурів з остеопорозом, є характерним для початкових стадій остеоартрозу, що доведено у різних експериментальних дослідженнях як на фоні остеопорозу [181], так і без нього [188-190].

Таким чином вплив свинцю викликає дегенеративні зміни у всіх складових хребтового сегменту щурів як молодого, так і зрілого віку з модельованим остеопорозом. Однак у молодих щурів відмічено більш суттєве зниження площі губчастої кісткової тканини, викликане ймовірно пригніченням росту тіл хребців, та рарефікацію губчастої та компактної кісткової тканини, пов'язану з остеоцитарним остеолізісом. Тоді як у щурів з остеопорозом спостерігалось більше пригнічення формування губчастої кісткової тканини, що свідчить про чутливість остеобластів до дії свинцю на фоні остеопорозу.

У міжхребцевих дисках молодих щурів також виявлені більший прояв дегенеративних порушень. А саме відмічено зниження висоти міжхребцевого диску як в центральній частині, так і в крайових відділах, викликане порушенням структури матриксу та зниженням щільності клітин. У щурів з остеопорозом виявлено лише зниження міжхребцевого відділу у крайових відділах, зниження щільності клітин не зафіксовано, однак виявлені дистрофічні порушення у клітинах волокнистого кільця.

У дуговідросткових суглобах після впливу свинцю відзначено іншу тенденцію. Так, більший прояв дегенерації зафіксовано у щурів з остеопорозом, що виражалось у збільшенні довжини розволокнутої суглобової поверхні та дистрофічних порушеннях у клітинах. Це пояснюється можливо зростанням свинцю у рівні крові внаслідок резорбції, а значить і у суглобовій рідині, а також порушеннями у субхондральній кістці, внаслідок остеопорозу.

Отримані результати потребують більш детального вивчення особливостей дії свинцю на матрикс кісткової та хрящової тканини, що відображено у наступному розділі.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ СВИНЦЮ НА МАТРИКС КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ТІЛ ХРЕБЦІВ НА ХРЯЩОВОЇ ТКАНИНИ МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

У даному розділі за результатами поляризаційно-оптичного дослідження розкриті особливості впливу свинцю на вміст колагенів у матриксі губчастої кісткової тканини тіл хребці та хрящової тканини волокнистого кільця міжхребцевого диску. А також представлено результати дослідження вмісту глікозаміногліканів у міжхребцевому диску щурів різних вікових груп після дії свинцю.

5.1 Вплив свинцю на вміст колагенів у міжхребцевому диску та губчастій кістковій тканині тіл хребців щурів різного віку

5.1.1. Вплив свинцю на вміст колагенів у міжхребцевому диску та губчастій кістковій тканині тіл хребців молодих щурів в період активного росту

Мікроскопічний аналіз кісткової тканини тіл хребців у щурів в період активного росту тіл хребців виявив особливості рефракції колагену у матриксу кісткових трабекул. У щурів контрольної групи матрикс мав інтенсивне червоно-оранжеве забарвлення (рис. 5.1, а). По крайовим поверхням трабекул та в центральній частині деяких трабекул спостерігалось зменшення інтенсивності забарвлення, що свідчить про процеси формування кісткової тканини, тобто зменшення товщини волокон та їх незрілість на цих ділянках.

У поляризованому світлі колаген на цих ділянках мав світло-оранжеву або зелену рефракцію. Зелений колір рефракції пов'язаний з вмістом колагену III типу, який формує тонші волокна. За останніми даними цей тип колагену є необхідною складовою матриксу кісткової тканини, так як

впливає на остеобластогенез [191]. Ділянки колагенових волокон з зеленою рефракцією розміщувалися уздовж цементних ліній та поміж ними (рис. 5.2).

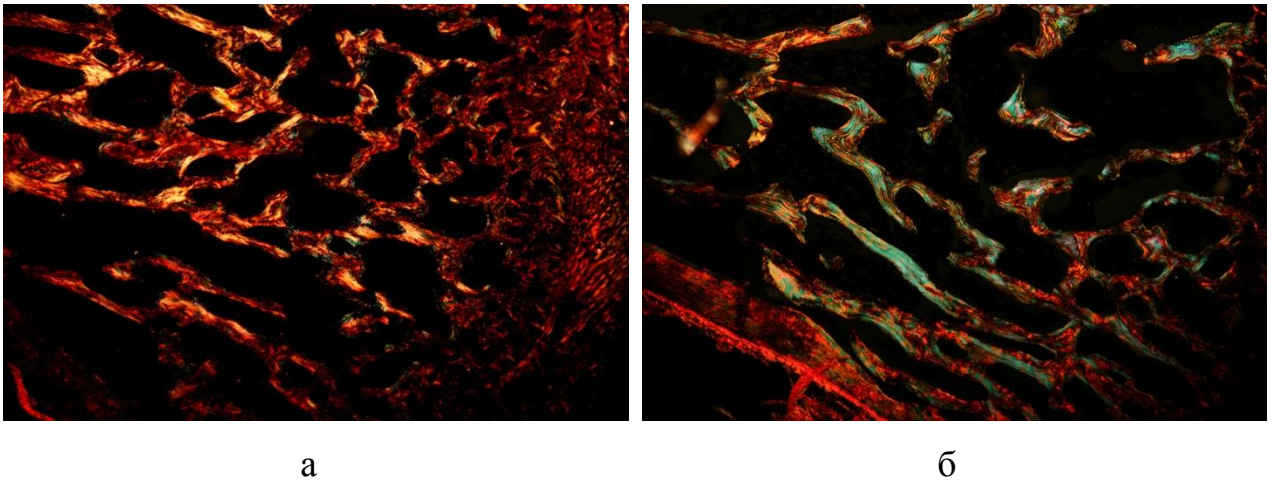


Рис. 5.1. Мікрофотографії зрізів. Губчаста кісткова тканина тіл хребців щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Поляризоване світло. Пікросиріус червоний. Збільшення 100.

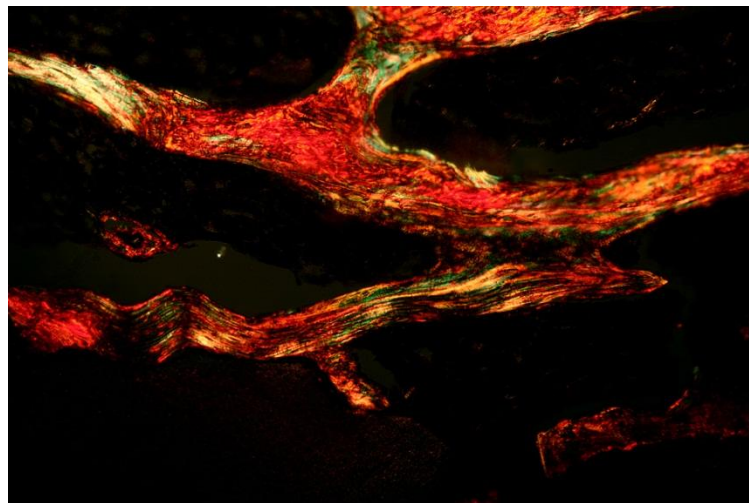
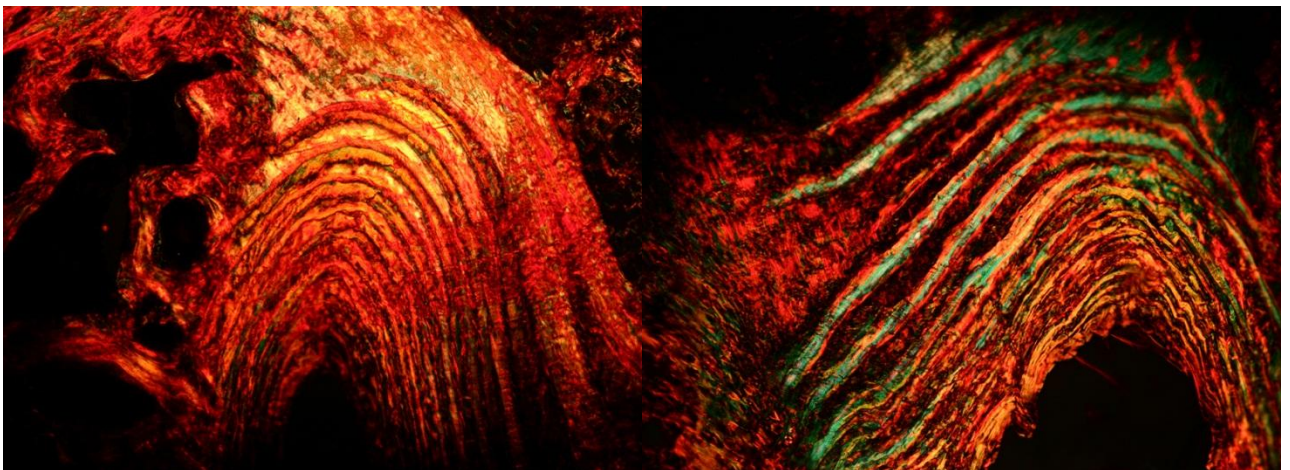


Рис. 5.2. Мікрофотографія гістопрепарата. Губчаста кісткова тканина тіл хребців. Ділянки з зеленою рефракцією у кісткових трабекулах. Контрольна група. Поляризоване світло. Пікросиріус червоний. Збільшення 200.

Контури лакун остеоцитів, що знаходилися на цих ділянках, мали яскраво-червону рефракцію в поляризованому світлі, що може свідчити про

активний синтез клітинами колагену I типу. Переважна більшість кісткових трабекул у поляризованому світлі мала яскраво-червону рефракцію, що пов'язано з вмістом в них товстих щільно розташованих колагенових волокон, які накопичують більше барвника, ніж тонкі волокна та дають рефракцію більшої довжини хвилі, ніж тонкі.

У міжхребцевому диску спостерігали рефракцію матриксу волокнистого кільця червоного кольору (рис. 5.3 а). Максимальна інтенсивність рефракції виявлялася у пластинках, які в поляризованому світлі мали яскраво-червону рефракцію. Поміж пластинками розміщувалися ділянки з меншою інтенсивністю червоної рефракції. На ділянках прикріплення волокнистого кільця до кісткової тканини апофізів тіл хребців в поляризованому світлі спостерігали тонкі волокна з зеленою рефракцією.



а

б

Рис. 5.3. Мікрофотографії зрізів. Волокнисте кільце міжхребцевого диску хребців щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Поляризоване світло. Пікосиріус червоний. Збільшення 100.

У щурів *дослідної групи*, як і в контрольній, переважна більшість кісткових трабекул представлено колагеновими волокнами I типу, їх рефракція була нерівномірною (рис. 5.1 б, рис. 5.4). В деяких трабекулах визначали великі ділянки з зеленою рефракцією.

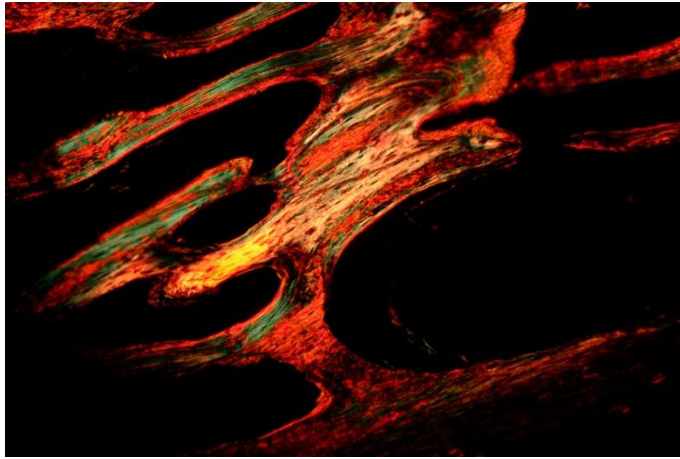


Рис. 5.4. Мікрофотографія гістопрепарата. Губчаста кісткова тканина тіл хребців. Неоднорідність забарвлення кісткового матриксу. Дослідна група. Поляризоване світло. Пікросиріус червоний. Збільшення 200.

Окремі трабекули мали суцільну зелену рефракцію по всій своїй довжині (рис. 5.5). На ділянках з зеленою рефракцією спостерігали нерівномірну щільність остеоцитів в лакунах. Забарвлення матриксу поблизу деяких лакун набувало червоної рефракції.

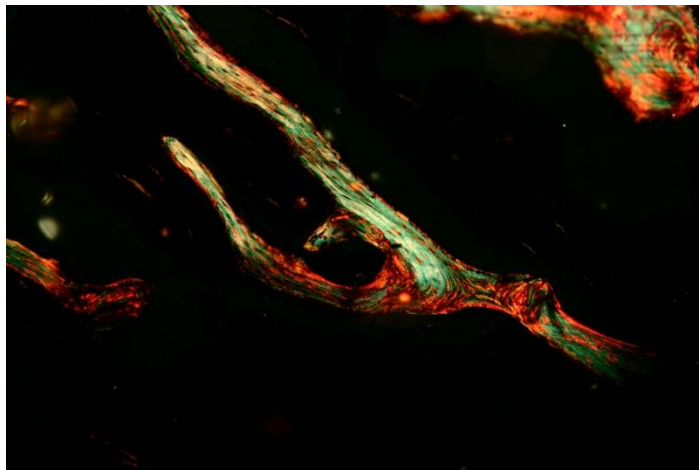


Рис. 5.5. Мікрофотографія гістопрепарата. Губчаста кісткова тканина тіл хребців. Суцільна зелена рефракція кісткової трабекули. Дослідна група. Поляризоване світло. Пікросиріус червоний. Збільшення 200.

Оцінюючи відносну частку волокон різного типу за кольором рефракції у кістковій тканині вдалося встановити, що у щурів після впливу свинцю

підвищується кількість тонких волокон, які в поляризованому світлі мають зелену рефракцію в 2,8 раза, тоді як частка волокон з червоною рефракцією знижується на 9,56 % (табл. 5.1)

Зменшення відносної кількості волокон з червоною рефракцією, які є більш товстими, щільно розташованими одне до одного та містять колаген I типу, свідчить про пригнічення біосинтезу колагену остеобластами та остеоцитами. Крім того, збільшення частки волокон з зеленою рефракцією, які є тоншими, означає зменшення міцності кісткової матриксу.

Таблиця 5.1

Розподіл вмісту колагенових волокон за типами колагенів I, II та III типів (у %) у губчастій кістковій тканині тіл хребців щурів ($M \pm m$)

| Досліджувані групи | Вміст колагенових волокон за кольором рефракції | | |
|--------------------|---|-------------|--------------|
| | Червоний | Жовтий* | Зелений |
| Серія 1 | | | |
| Контроль | 88,50 ± 0,70 | 6,61 ± 0,48 | 4,89 ± 0,83 |
| Дослід | 80,04 ± 1,55 | 6,30 ± 0,81 | 13,66 ± 1,00 |
| P | 0,01 | 0,83 | 0,001 |
| Серія 2 | | | |
| Контроль | 90,64 ± 0,21 | 4,94 ± 0,70 | 4,42 ± 0,79 |
| Дослід | 81,12 ± 0,80 | 7,31 ± 1,31 | 11,60 ± 1,17 |
| P | 0,001 | 0,23 | 0,01 |

Примітка. *Волокна II типу визначали на ділянках збереженої хрящової тканини в трабекулах, що пов'язано з процесом росту.

У дослідній групі у волокнистому кільці міжхребцевого диска виявлено збільшення площі ділянок з зеленою рефракцією в поляризованому світлі (рис. 5.3 б). Вони мали вигляд широких ліній, розміщених вздовж волокнистих пластинок або невеликих ліній, які розташовувалися паралельно чи діагонально напрямку колагенових волокон у пластинках. Ділянки зеленої

рефракції виявляли переважно у зовнішньому відділі волокнистого кільця.

Кількісна оцінка розподілу волокон різної товщини за кольором рефракції дала змогу встановити, що у волокнистому кільці після впливу свинцю підвищується частка волокон з зеленою рефракцією в 4,2 раза, з жовтою – в 2 рази, а з червоною знижується на 9,8 % (табл. 5.2).

Відомо, що колаген III типу, що входить до складу волокон, які набувають зеленої рефракції, міститься у волокнистому кільці міжхребцевого диску в нормі, але встановлено, що у разі дегенеративних процесів його кількість зростає [192]. Саме тому підвищення вмісту волокон з зеленою рефракцією колагену може свідчити про дегенеративні зміни у міжхребцевому диску дослідних щурів.

Зниження вмісту волокон з червоною рефракцією колагену, характерних для структури матриксу волокнистого кільця, можливо пов'язано зі зниженням щільності клітин, які синтезують компоненти матриксу, що було встановлено під час морфометричного аналізу у попередньому розділі.

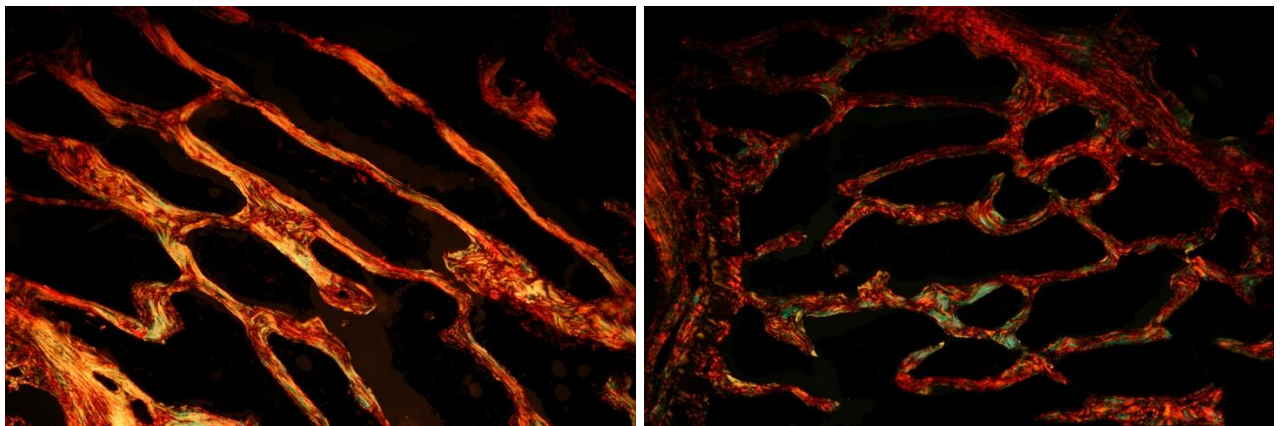
Таблиця 5.2

Розподіл вмісту колагенових волокон за типами колагенів I, II та III типів (у %) у волокнистому кільці міжхребцевого диску щурів ($M \pm m$)

| Досліджувані групи | Вміст колагенових волокон за кольором рефракції | | |
|--------------------|---|-------------|-------------|
| | Червоний | Жовтий | Зелений |
| Серія 1 | | | |
| Контроль | 95,50 ± 1,64 | 2,34 ± 0,93 | 2,17 ± 0,75 |
| Дослід | 86,15 ± 1,41 | 4,68 ± 0,34 | 9,17 ± 1,43 |
| P | 0,01 | 0,01 | 0,02 |
| Серія 2 | | | |
| Контроль | 96,12 ± 0,74 | 1,79 ± 0,56 | 2,10 ± 0,19 |
| Дослід | 92,18 ± 0,36 | 2,39 ± 0,31 | 5,42 ± 0,37 |
| P | 0,01 | 0,34 | 0,001 |

5.1.2. Вплив свинцю на вміст колагенів у міжхребцевому диску та губчастій кістковій тканині тіл хребців зрілих щурів з модельованим остеопорозом

У контрольній групі щурів з модельованим остеопорозом в тілах хребців спостерігали кісткові трабекули, матрикс яких мав червону рефракцію, що свідчить про присутність колагену I типу (рис. 5.6, а), в центральній частині деяких трабекул у матриксі виявляли ділянки з зеленою рефракцією колагену, які розміщувалися вздовж цементних ліній. Матрикс окремих трабекул набував жовтої рефракції в поляризованому світлі, що може свідчити про зменшення вмісту колагенових волокон з колагену I типу, та збільшення площі волокон з колагену II типу, що є нехарактерним для кісткового матриксу у тварин цього віку.



а

б

Рис. 5.6. Мікрофотографії зрізів. Губчаста кісткова тканина тіл хребців щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Поляризоване світло. Пікросиріус червоний. Збільшення 200.

У волокнистому кільці міжхребцевого диску спостерігали переважно червону рефракцію колагену, аналогічно зафіксованому у контрольній групі молодих щурів (рис. 5.7, а). Однак пластинки у волокнистому кільці мали менш чіткі контури.

У дослідній групі в кісткових трабекулах виявлено збільшення кількості

ділянок з зеленою та жовтою рефракцією колагену, але в переважній більшості в кістковому матриксі переважали колагенові волокна I типу, які мали червону рефракцію (рис. 5.6, б).

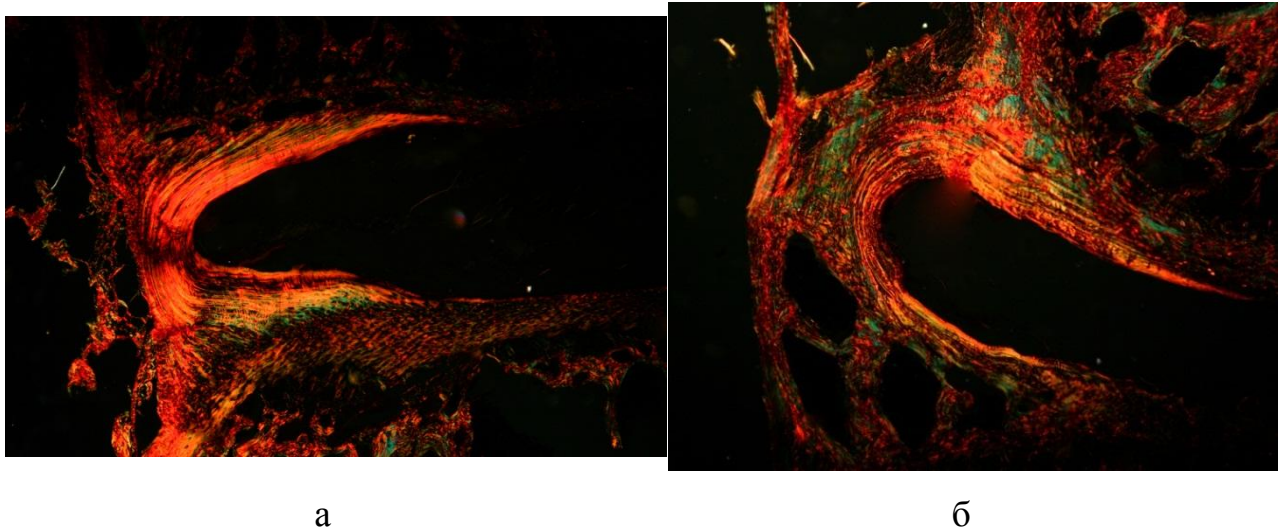


Рис. 5.7. Мікрофотографії зрізів. Волокнисте кільце міжхребцевого диску хребців щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Поляризоване світло. Пікосиріус червоний. Збільшення 100.

Ділянки з зеленою рефракцією колагену мали вигляд плям та розміщувалися незалежно від розташування цементних ліній, на відміну від молодих тварин, що може означати наявність іншого механізму формування таких ділянок (рис. 5.8).

В губчастій кістковій тканині щурів виявлено збільшення вмісту волокон з зеленою рефракцією колагену III типу в 2,6 раза, та зниження відносної кількості волокон з червоною рефракцією колагену I типу на 10,5 % після впливу свинцю (табл. 5.1).

У волокнистому кільці щурів дослідної групи виявлено появу ділянок колагену III типу не тільки в місцях прикріплення диску до апофізів тіл хребців, але й в центральній частині (рис. 5.7, б). Колагенові волокна з колагену III типу мали вигляд товстих ліній, які розташовувалися паралельно волокнистим пластинкам у зовнішньому відділі волокнистого кільця. У

волокнистому кільці після впливу свинцю встановлено збільшення вмісту волокон з колагену III типу в 2,6 раза, та зниження відносної кількості волокон з колагену I типу на 4,1 % (табл. 5.2).

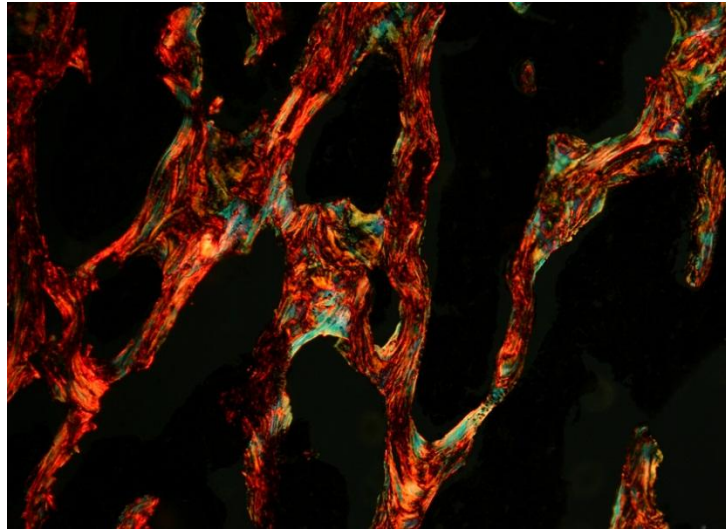


Рис. 5.8. Мікрофотографія гістопрепарата. Губчаста кісткова тканина тіл хребців. Ділянки з зеленою рефракцією у вигляді пляму матриці. Дослідна група. Полярзоване світло. Пікосиріус червоний. Збільшення 400.

Опір кісткової тканини різним навантаженням залежить не тільки від мінерального складу, але і від органічного, більшу частину якого складає колаген. Перерозподіл співвідношення різних типів колагену призводить до зміни товщини волокон та може вплинути на збільшення ризику деформації тіл хребців.

За даними проведеного дослідження вміст колагенових волокон з колагену I типу після впливу свинцю знижується в обох групах, але більший прояв ці зміни мають на фоні модельованого остеопорозу. Крім того, зростає частка колагенових волокон з колагену III типу, які є тоншими та розміщуються менш щільно за колагенові волокна з колагену I типу, та, вірогідно, можуть впливати на міцність кістки.

У волокнистому кільці міжхребцевого диску зафіксовано аналогічну тенденцію до підвищення вмісту колагенових волокон з колагену III типу, та

зменшенню волокон з колагену I типу. Найбільш виражені зміни зафіксовано у групі молодих щурів.

5.2 Вплив свинцю на вміст глікозаміногліканів у міжхребцевому диску щурів різного віку

5.2.1. Вплив свинцю на вміст глікозаміногліканів у міжхребцевому диску молодих щурів в період активного росту

Під час дослідження міжхребцевих дисків щурів *контрольної групи* забарвлених толуїдиновим синім виявлялася пластинчата структура волокнистого кільця, яка мала різну інтенсивність метакромазії, а саме набувала пурпурного забарвлення різної інтенсивності (рис. 5.9, а). На більшій площі волокнистого кільця спостерігали рівномірну метакромазію, але деякі ділянки пластинок у волокнистому кільці були ортохроматичні. У зовнішньому відділі зовнішнього кільця виявлено меншу інтенсивність забарвлення у порівнянні з внутрішнім відділом, що ймовірно пов'язано з тим, що у внутрішньому відділі міститься більша частина глікозаміногліканів та колагену II типу, з яким вони формують сполуки [146]. В обох відділах міжхребцевого диску клітини мали блакитно забарвлене ядро та розміщувалися у лакунах.

У *дослідній групі* щурів спостерігали ортохроматичне забарвлення пластинок по всій довжині, але на ділянках, що розташовувалися під кутом до прилеглих пластинок зберігалася метакромазія (рис. 5.9, б). Матрикс волокнистого кільця як у зовнішньому, так і у внутрішньому відділах мав майже однакове забарвлення, а на ділянках ставав ортохроматичним. При цьому порівняно з контрольною групою інтенсивність метакромазії різко зменшилася особливо у внутрішньому відділі волокнистого кільця.

Ортохроматичне забарвлення пластинок волокнистого кільця та ділянок, що розташовувалися під кутом до них, свідчить про зменшення вмісту глікозаміногліканів у структурі матриксу.

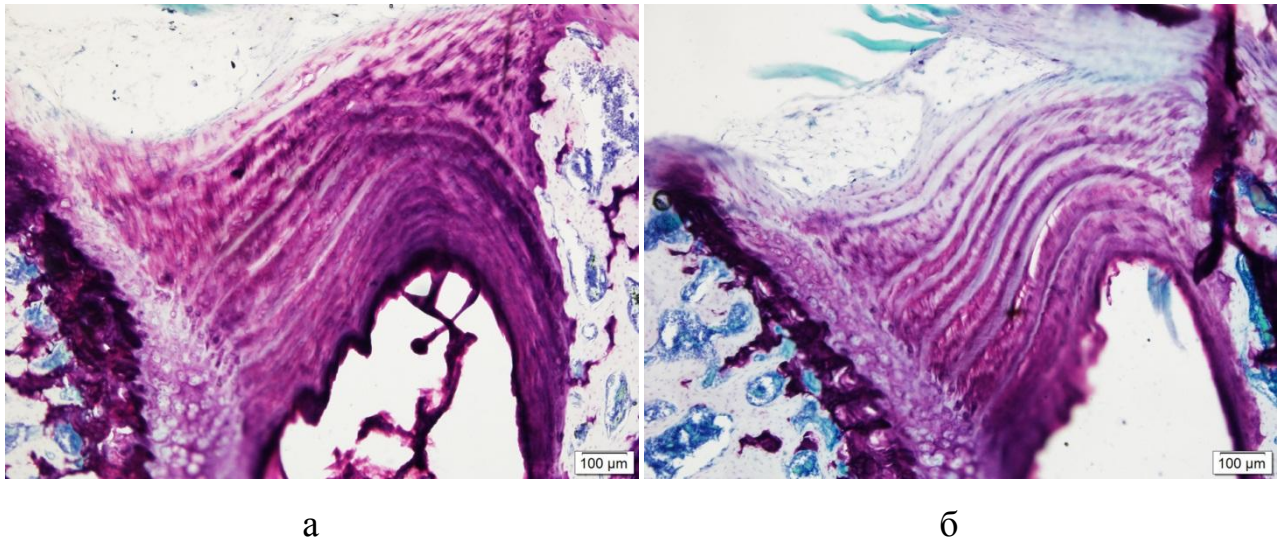
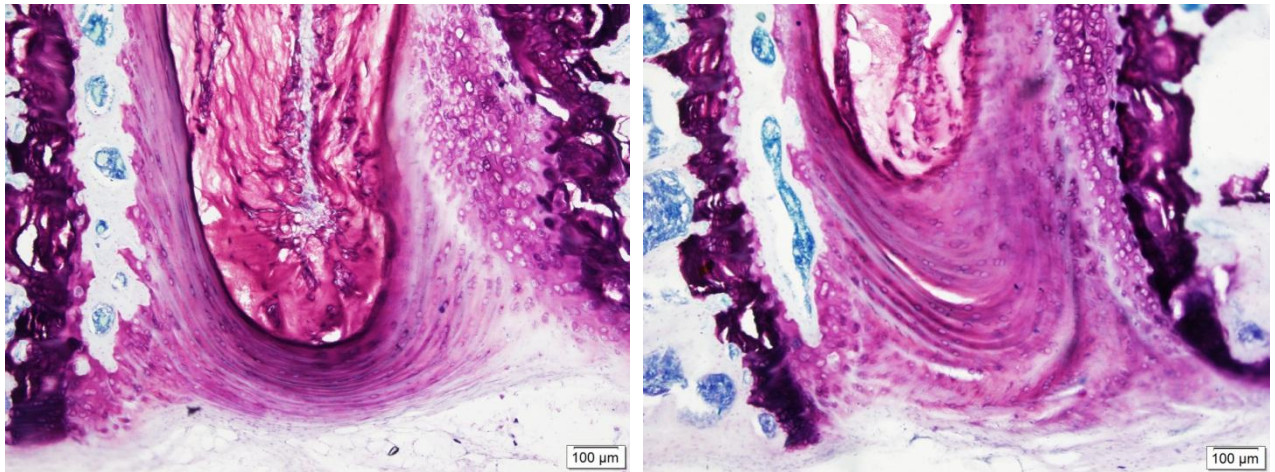


Рис. 5.9. Мікрофотографії зрізів. Волокнисте кільце міжхребцевого диску щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Толуїдиновий синій. Збільшення 100.

5.2.2. Вплив свинцю на вміст глікозаміногліканів у міжхребцевому диску зрілих щурів з модельованим остеопорозом

У щурів контрольної групи у волокнистому кільці міжхребцевого диску спостерігали метахромазію матриксу, інтенсивність, якої зростала з наближенням до драглистого ядра, але у місцях прикріплення диску до апофізів її інтенсивність зменшувалася (рис. 5.10, а). Клітини розміщувалися у лакунах та мали слабо-блакитне забарвлення.

У дослідній групі матрикс волокнистого кільця мав метахромазію однакової інтенсивності незалежно від відділу, на відміну від контрольної групи (рис. 5.10, б). Однак на ділянках матрикс був ортохроматичним, що простежували не тільки поблизу апофізів, як і в контрольній групі, але й в центральній частині волокнистого кільця. Ортохроматичне забарвлення матриксу свідчить про зменшення вмісту глікозаміногліканів на цих ділянках. Відомо, що втрата глікозаміногліканів має критичне значення для функціонування диску через погіршення його пружних якостей, що може призвести до появи дегенеративних змін у матриксі після навантажень.



а

б

Рис. 5.10. Мікрофотографії зрізів. Волокнисте кільце міжхребцевого диску щурів контрольної (а) та дослідної (б) груп. Збільшення 100. Толуїдиновий синій.

Таким чином встановлено, що після впливу свинцю відбувається зменшення вмісту сульфатованих глікозаміногліканів у матриксу волокнистого кільця як молодих тварин, так і зрілих з модельованим остеопорозом. Однак у молодих щурів виявлено більш значну втрату цих компонентів матриксу в обох відділах волокнистого кільця. У щурів з модельованим остеопорозом зменшення вмісту глікозаміногліканів спостерігалось переважно тільки у внутрішньому відділі волокнистого кільця. Зменшення вмісту глікозаміногліканів у хрящовому матриксі міжхребцевого диску щурів є ознакою дегенеративних змін та причиною появи тріщин та розволокнення, внаслідок втрати матриксом характерних для нього пружних властивостей та неспроможності протистояти навантаженням. Отримані результати співпадають з даними інших експериментальних досліджень, в яких було встановлено, що вплив свинцю викликає пригнічення біосинтезу протеогліканів у хондроцитах [59, 67]. Головною функцією міжхребцевого диску є забезпечення стабільності хребта під впливом навантажень. Виконання цієї функції переважно залежить від вмісту протеогліканів у матриксі волокнистого кільця та драглистого ядра,

більша частина яких міститься у драглистому ядрі. Протеоглікани – це високомолекулярні сполуки, що складаються з білка та глікозаміногліканів, і можуть приєднувати велику кількість молекул води, забезпечуючи тим самим пружність матриксу та його здатність витримувати навантаження. У міжхребцевому диску протеоглікани представлені агреманами, до складу яких входять такі глікозаміноглікани, як хондроїтинсульфат, а також в меншій кількості – кератансульфат [146]. Фактори, що призводять до дегенерації міжхребцевого диску багаточисельні, серед них виділяють біомеханічні, такі як компресійне навантаження, shear stress (напруга зсуву) та вібрація, а також інші: старіння, генетичні фактори, системні та токсичні фактори, які призводять до дегенеративних змін шляхом біохімічних реакцій. На думку L. Jin та співав. [166] у дегенеративному диску порушується баланс катаболічних та метаболічних процесів, тобто порушується синтез та деградація компонентів матриксу, що в свою чергу призводить до виникнення дегенеративних змін.

Таким чином вплив свинцю викликає аналогічні зміни розподілу вмісту колагенових волокон, як у губчастій кістковій тканині, так і в міжхребцевому диску молодих щурів та на фоні модельованого остеопорозу з тенденцією до зростання вмісту колагенових волокон III типу та зменшення волокон I типу, що свідчить про порушення структурної організації матриксу, збільшує ризик переломів у кістковій тканині та є ознакою дегенеративних змін в міжхребцевому диску.

Отримані результати потребують більш детального вивчення особливостей дії накопичення свинцю у кістковій та хрящовій тканинах, що відображено у наступному розділі.

РОЗДІЛ 6

ОСОБЛИВОСТІ НАКОПИЧЕННЯ СВИНЦЮ В ТІЛАХ ХРЕБЦІВ І МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКАХ ТА МІНЕРАЛЬНА ЩІЛЬНІСТЬ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ДІЇ СВИНЦЮ

У даному розділі досліджено вміст свинцю в тілах хребців та міжхребцевих дисках, а також мінеральну щільність кісткової тканини у молодих щурів в період активного росту та у зрілих тварин на фоні модельованого остеопорозу після впливу свинцю.

Свинець має споріднені властивості до багатьох елементів, що містяться в організмі людини і впливають на формування та метаболізм кісткової тканини. Основним компонентом кісткової тканини є гідроксилапатит, до складу якого входить кальцій та фосфор. Відомо, що свинець може заміщувати кальцій у структурі гідроксилапатиту, тим самим порушуючи біомеханічні властивості кісткового матриксу. У дослідженні зразків дегенеративних міжхребцевих дисків, отриманих в результаті дискектомії, було виявлено вміст свинцю, який зростає з віком [43]. Крім того є дані, що мікроскопічна кальцифікація зустрічається у міжхребцевому диску в нормі, а саме у драглистому ядрі [164]. Це свідчить про можливість накопичення свинцю в першу чергу в цьому відділі диску, шляхом заміщення кальцію, як і в кістковій тканині.

Двоатомна двоенергетична рентгенівська абсорбціометрія (DEXA) – метод, що дозволяє оцінити мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ) та є «золотим стандартом» діагностики остеопорозу. Цей метод застосовують також у експериментальних дослідженнях для оцінки стану кісткової тканини. Саме тому у цьому розділі ми присвятили увагу результатам застосування цього методу.

6.1. Особливості накопичення свинцю в тілах хребців та міжхребцевих дисках щурів різного віку після впливу свинцю

6.1.1. Вміст свинцю у тілах хребців щурів в період активного росту та на фоні модельованого остеопорозу після впливу цього елемента

У молодих тварин, як контрольної, так і дослідної групи в тілах хребців шляхом флуоресцентного спектрометричного аналізу було встановлено наявність свинцю. Однак у щурів дослідної групи вміст свинцю в тілах хребців після моделювання його впливу протягом 10 тижнів збільшився у 6,4 раза ($p = 0,02$) порівняно з контрольною групою (табл. 6.1). Накопичення свинцю в тілах хребців контрольної групи у невеликій концентрації свідчить про потрапляння цього елемента в організм тварин не тільки впродовж їх життя, не дивлячись на те, що протягом експерименту вони вживали дистильовану воду у якості питної починаючи з 1,5-місячного віку, але й з організму їх матері. В дослідженнях, які були надруковані у 2016 році висунута проблема переходу свинцю з організму матері до новонародженого протягом вагітності та лактації через те, що ці процеси викликають посилення резорбції кісткової тканини та вивільняють цей елемент у кров матері [194-196].

У щурів з модельованим остеопорозом виявлено зростання вмісту свинцю в тілах хребців після впливу цього елемента в 1,23 раза ($p = 0,05$) в порівнянні з контрольною групою (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Масова частка свинцю у кістковій тканині тіл хребців щурів досліджуваних груп (у %)

| Групи | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------|
| В період активного росту | $(0,07 \pm 0,014) \cdot 10^{-2}$ | $(0,45 \pm 0,097) \cdot 10^{-2}$ | 0,02 |
| На фоні остеопорозу | $(0,74 \pm 0,035) \cdot 10^{-2}$ | $(0,91 \pm 0,052) \cdot 10^{-2}$ | 0,05 |

Вміст свинцю в кістковій тканині був вищим майже в 5 раз 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. Також привертає увагу, що вміст свинцю у кістковій тканині у щурів з віком зростає можливо за рахунок потрапляння та накопичення цього елемента в організмі щурів до початку експериментального моделювання впливу свинцю.

6.1.2. Вміст свинцю у міжхребцевих дисках щурів в період активного росту та на фоні модельованого остеопорозу після впливу цього елемента

Аналогічно дослідженню кісткової тканини тіл хребців було проведено визначення вмісту свинцю у міжхребцевих дисках щурів досліджуваних груп.

У молодих тварин в період активного росту після впливу свинцю встановлено достовірне зростання рівня свинцю в тканинах міжхребцевого диску в 4,6 раза ($p = 0,02$) порівняно з контрольною групою, тоді як у тварин з модельованим остеопорозом достовірної різниці між дослідною та контрольною групами не виявлено (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Масова частка свинцю у міжхребцевих дисках щурів досліджуваних груп (у %)

| Групи | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------|
| В період активного росту | $(0,08 \pm 0,031) \cdot 10^{-2}$ | $(0,37 \pm 0,093) \cdot 10^{-2}$ | 0,02 |
| На фоні остеопорозу | $(0,81 \pm 0,052) \cdot 10^{-2}$ | $(1,00 \pm 0,233) \cdot 10^{-2}$ | 0,48 |

Накопичення свинцю та інших елементів в міжхребцевому диску було вивчено в клінічному дослідженні, де цей процес був пов'язаний з

мініралізацією хрящової тканини диску з віком [197]. Крім того автори виділили 2 типи мініралізації міжхребцевого диску: видимої та невидимої. Видима мініралізація характеризувалася присутністю кристалів мінералів під час мікроскопічного дослідження тканини диску, а невидима, розглядалася авторами як первинний етап видимої мініралізації та могла бути визначена тільки за допомогою хімічного аналізу тканин. Під час гістологічного дослідження тканин диску щурів обох груп після впливу свинцю нами не було виявлено ознак мініралізації тканин, тож можна припустити, що встановлений вміст свинцю у міжхребцевому диску ще є ознакою невидимої мініралізації, але може слугувати первинною ланкою в дегенерації диску.

Треба також відзначити, що накопичення свинцю у тілах хребців молодих тварин відбувалося більш швидко порівняно з міжхребцевим диском (в 6,4 та в 4,6 разів, відповідно).

Але порівнюючи масову частку свинцю у тілах хребців та міжхребцевих дисках тварин різного віку можна помітити, що вміст цього елемента у міжхребцевих дисках майже дорівнює, а у зрілих щурів навіть перевищує його частку у тілах хребців. Це можливо пояснити тим, що зразки тіл хребців та міжхребцевих дисків перед спектрометричним дослідженням були зафіксовані у 70° спирті внаслідок чого відбулася їх дегідратація. Відомо, що у драглистому ядрі, яке займає великий об'єм у міжхребцевому диску, міститься приблизно 80 % води [198], тоді як тіла хребців – менш гідратована структура. Тож внаслідок дегідратації відбувається зменшення вмісту води та збільшення кількості мінеральних речовин у досліджуваному об'ємі зразку диску. При виконанні рентгенфлуоресцентної спектрометрії проводять опромінення поверхні зразку, внаслідок чого відбувається флуоресцентне випромінювання атомів елементів, яке відповідає їх вмісту у зразку. Через зменшення площі зразку диску внаслідок його дегідратації порівняно з його нативним розміром, кількість мінеральних речовин буде зростати. Тоді як для кістки це не буде характерно через меншу зміну у розмірі після дегідратації. Отже порівнювати ці дві структурні одиниці (тіла

хребців та міжхребцеві диски) між собою на вміст у них свинцю є неправомочним у цьому випадку.

6.2. Мінеральна щільність кісткової тканини у щурів різного віку після впливу свинцю

Згідно з результатами проведеного сенситометричного обстеження сегмента L_I–L_{IV} поперекового відділу хребта у *молодих щурів* показник МЦКТ у тварин дослідної групи після впливу свинцю достовірно знизився на 14,4 % (табл. 6.3). Зниження показника МЦКТ у щурів вказує на наявність негативного впливу свинцю на кісткову тканину хребта.

Необхідно відзначити, що за даними опублікованими на сайті International Osteoporosis Foundation, зниження МЦКТ на 10 % у поперековому відділі хребта збільшує ризик перелому вдвічі [199]. У разі якщо таке зниження відбувається в молодому віці, то це тягне за собою формування низького піка кісткової маси, збільшуючи ризик виникнення остеопорозу в майбутньому.

Таблиця 6.3

Показники мінеральної щільності кісткової тканини (г/см²) тіл хребців у щурів досліджуваних груп

| Групи | Контрольна група | Дослідна група | P |
|--------------------------|------------------|----------------|-------|
| В період активного росту | 0,209 ± 0,003 | 0,179 ± 0,004 | 0,001 |
| На фоні остеопорозу | 0,125 ± 0,005 | 0,152 ± 0,005 | 0,004 |

У щурів з модельованим остеопорозом були отримані суперечливі дані, а саме встановлено достовірне підвищення показника МЦКТ у дослідній групі на 21,6 % порівняно з контрольною групою (табл. 6.3), у той час як під час морфометричного дослідження було виявлено зниження площі губчастої кісткової тканини в 1,5 раза. Однак, під час аналізу результатів

експериментальних та клінічних досліджень, в яких вивчали вплив свинцю на кісткову тканину було виявлено, що деякі автори отримали результати аналогічні нашим. Так в експериментальних дослідженнях на щурах було встановлено, що МЩКТ у групі з впливом свинцю підвищилася, хоча згідно морфометричному дослідженню об'єм кісткової тканини знизився. [15, 128, 200]. Крім того у клінічному дослідженні, в якому взяло участь 943 особи, встановлено зворотню залежність між рівнем свинцю у крові та показником МЩКТ [201].

Такі результати на нашу думку, можна пояснити накопичення великої кількості свинцю у кістковій тканині тіл хребців, і через це завищення показників МЩК у щурів дослідної групи з модельованим остеопорозом. Свинець є важким металом, з атомною масою більшою ніж кальцій майже в 5 разів. Накопичення свинцю впродовж життя у кістковій тканині щурів з модельованим остеопорозом до початку експерименту по впливу свинцю ймовірно і є причиною того, що вміст свинцю у тварин дослідної групи цієї серії був значно більшим порівняно з аналогічною групою молодих щурів. Метод DEXA заснований на використанні рентгенівського випромінювання, яке свинець у певній кількості може затримувати при проходженні його крізь кісткову тканину, тим самим вносячи похибку у вимірювання МЩКТ. Відсутність такого ефекту у молодих тварин можливо є результатом недостатньої кількості свинцю у кістковій тканині для виявлення такої похибки.

Таким чином встановлено, що під впливом свинцю у щурів в період активного росту спостерігається зниження мінеральної щільності кісткової тканини на 14,4 %, що може підвищувати ризик переломів. У той час як у щурів з модельованим остеопорозом отримані протилежні результати, які суперечать результатам проведеного нами морфометричного дослідження, однак через наявність аналогічних результатів отриманих авторами інших досліджень їх можна пояснити особливістю накопичення свинцю з віком та завищенням показника МЩКТ внаслідок цього.

Виявлено, що акумуляція свинцю у кістковій тканині тіл хребців після моделювання його впливу відбувається як у молодих тварин в період активного росту, так і на фоні модельованого остеопорозу, але швидше у тварин в період активного росту. У міжхребцевих дисках достовірне накопичення свинцю виявлене лише у групі молодих тварин. Крім того накопичення свинцю може відбуватися не тільки в матриксі хрящової тканини, але й в її клітинах – хондроцитах. Так під час електронномікроскопічного дослідження в хондроцитах зовнішнього відділу волокнистого кільця було виявлено електроннощільні мітохондрії, у яких, як відомо переважно накопичується свинець, а також осміофільні залишкові тільця, що теж можуть бути ознакою накопичення цього елемента в хондроцитах. У матриксі зовнішнього відділу міжхребцевого диску було відзначено формування щільних та осміофільних ділянок, з ознаками кальцифікації, які могли слугувати місцями акумуляції свинцю.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В проведеному експериментальному дослідженні на білих лабораторних щурах виявлено особливості впливу свинцю у молодому віці та на фоні остеопорозу на хребтовий руховий сегмент поперекового відділу хребта. Вплив свинцю, що відповідає дії цього елемента на людей, які мешкають в урбанізованому середовищі, спричиняє структурно-функціональні зміни у хребтовому руховому сегменті поперекового відділу хребта молодих щурів та щурів з остеопорозом як на тканинному, так і на клітинному рівні. Дія свинцю призводить до його накопичення у кістковій тканинній тіл хребців обох груп, особливо у молодих щурів, що пов'язано з інтенсивними процесом росту порівняно з щурами з остеопорозом [202]. Також свинець накопичується у міжхребцевому диску молодих щурів, тоді як у щурів з остеопорозом вірогідної різниці між контрольною та дослідною групами не встановлено [203]. Це можна пояснити більшим накопиченням свинцю у кістковій тканині молодих щурів, яка, можливо, також є джерелом свинцю, що потрапляє у міжхребцевий диск.

Вплив свинцю у молодих щурів призводить до пригнічення росту хребта, що встановлено в результаті вимірювання маси тіла та довжини тіла в динаміці з першого тижня експерименту [204]. Ріст хребців у хребтовому руховому сегменті поперекового відділу хребта молодих щурів пригнічується під впливом свинцю у всіх площинах. У щурів з остеопорозом вплив свинцю викликає зниження висоти тіл хребців, що можна пояснити виникненням компресійних деформацій, характерних ускладнень остеопорозу.

На тканинному рівні у тілах хребців вплив свинцю призводить до зниження площі губчастої кісткової тканини з більшим проявом у молодих тварин, ніж у щурів з остеопорозом, що можна пояснити інтенсивним ростом у цей віковий період, на відміну від тварин з остеопорозом [205]. У

міжхребцевому диску більший прояв дегенеративних змін під дією свинцю зафіксовано також у молодих щурів – у вигляді порушення будови хрящового матриксу та формування великих ізогенних груп хондроцитів, що призводить в свою чергу до зниження висоти диску [203, 206]. У дуговідросткових суглобах дегенеративні зміни були більш виразними у щурів з остеопорозом, що виражалося у розволокненні суглобової поверхні та формуванню тріщин у хрящовому матриксі [207]. Особливої уваги потребує стан матриксу всіх досліджених тканин через його здатність протистояти механічним навантаженням зовнішнього середовища. Як у губчастій кістковій тканині, так і у волокнистому хрящі міжхребцевого диску щурів обох груп з більшим проявом у молодих щурів дія свинцю викликає зниження вмісту волокон колагену I типу та підвищення – волокон колагену III типу, що підвищує ризик переломів та вірогідність розтріскування хрящового матриксу [208]. Крім того дія свинцю викликає зниження вмісту глікозаміногліканів, компонентів матриксу, які відповідають за утримання води у міжхребцевому диску та забезпечують його пружні властивості, у волокнистому кільці молодих щурів, а у щурів з остеопорозом тільки у внутрішньому відділі між хребцевого диску.

На клітинному рівні у губчастій та компактній кістковій тканинах молодих щурів в плив свинцю викликає зниження щільності остеоцитів та рарефікацію кісткового матриксу за рахунок збільшення розширених лакун остеоцитів, внаслідок остеоцитарного остеолізу. Аналогічні зміни зафіксовані у щурів з остеопорозом, однак посилення остеоцитарного остеолізу зафіксовано тільки у компактній кістковій тканині, що пов'язано з її здатністю до накопичення більшої кількості свинцю у структурі через повільніше ремоделювання порівняно з губчастою кістковою тканиною [209]. У остеобластах щурів обох груп вплив свинцю викликав руйнування клітинної мембрани, порушення організації гЕПС, гіпертрофію мітохондрій з лізісом крист, збільшення кількості вторинних лізосом у цитоплазмі, що свідчить про пригнічення біосинтетичної та енергетичної функцій цих клітин

та пригнічення формування кісткової тканини, що підтверджено зниженням ширини остеїду особливо у молодих тварин. У остеокластах молодих щурів дія свинцю призводить до накопичення його у мітохондріях, що за даними інших авторів [155], викликає пригнічення синтезу АТФ та посилення процесу резорбції, що було підтверджено підвищенням довжини поверхні резорбції у кісткових трабекулах. У остеокластах щурів з остеопорозом не виявлено структурних порушень, однак також встановлене підвищення довжини поверхні резорбції, що разом з пригніченням формування кісткової тканини є фактором ризику подальшого зниження кісткової маси.

У міжхребцевому диску молодих щурів у хондроцитах зовнішнього відділу волокнистого кільця після впливу свинцю виявлено вакуолізацію цитоплазми та конденсацію хроматину у ядрі, що свідчить про порушення їх біосинтетичних функцій [203]. Тоді як у внутрішньому відділі поряд з деструктивними змінами у клітинах у вигляді появи порожнин в цитоплазмі, відзначено поділ хондроцитів, що може свідчити наявність компенсаторного механізму для відновлення структурного гомеостазу тканини. Збільшення проліферативної активності клітин у вигляді формування великих ізогенних груп хондроцитів, що було підтверджено гістологічно, є ознакою дегенерації міжхребцевого диску. Також встановлено зниження щільності нотохордальних клітин у драглистому ядрі, що свідчить про можливість дії свинцю шляхом проникнення разом з поживними речовинами до драглистого ядра та пригнічення біосинтетичних функцій нотохордальних клітин внаслідок порушення їх структури та призводячи з часом до їх загибелі. Аналогічні зміни спостерігали у хондроцитах волокнистого кільця міжхребцевого диску щурів з остеопорозом, однак вірогідне зниження щільності клітин не встановлено.

У дуговідросткових суглобах молодих щурів дія свинцю призводить до загибелі клітин у поверхневій зоні, а у середній зоні – загибелі клітин та гіпертрофії апарату Гольджі, що може свідчити про неспроможність клітин синтезувати та секретувати компоненти матриксу [210]. Також виявлено

порушення структури матриксу у вигляді його розволокнення та гомогенізації. У щурів з остеопорозом дія свинцю викликає у поверхневій зоні деградацію мембранних органел у хондроцитах, що виражається в переважанні в їх цитоплазмі компонентів цитоскелету та появі великої кількості залишкових тілець [207]. У середній зоні, не дивлячись на високий біосинтетичний потенціал клітин – появу деструктивних порожнин у цитоплазмі та загибель мітохондрій. Такі структурні зміни могли призвести до зниження біосинтетичної активності клітин та порушенню їх функції біосинтезу макромолекул хрящового матриксу.

Таким чином, низькорівнева дія свинцю викликає дегенеративні зміни у хребтовому руховому сегменті щурів обох груп, з більшим проявом у молодих щурів – в тілах хребців та міжхребцевих дисках, а на фоні остеопорозу – у дуговідросткових суглобах.

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 раза відповідно), а в компактній кістковій тканині виявлено рарифікацію. Ультраматроскопічно 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 мг×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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Smith, L., Nerurkar, N., Choi, K., Harfe, B. and Elliott, D. (2011). Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. *Disease Models & Mechanisms*, 4(1), 31-41.
2. Clarençon, F., Law-Ye, B., Bienvenot, P., Cormier, É., & Chiras, J. (2016). The Degenerative Spine. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, 24(3), 495-513. doi:10.1016/j.mric.2016.04.008
3. Izzo, R., Popolizio, T., D'Aprile, P., & Muto, M. (2015). Spinal pain. *European Journal of Radiology*, 84(5), 746-756. doi:10.1016/j.ejrad.2015.01.018
4. Корж, Н. А., Поворознюк, В. В., Дедух, Н. В., Зупанец, И. А. (2002). *Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение: монография*. Харьков: Золотые страницы.
5. Поворознюк, В. В. (2014). *Захворювання кістково-м'язової системи в людей різного віку (вибрані лекції, огляди, статті)* (Том 4). – Київ: Експрес.
6. Lead poisoning and health. (2016). Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/en/>
7. Международная программа по химической безопасности. Свинец. (2010). Retrieved from http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/lead/ru
8. Reuben, A., Caspi, A., Belsky, D.W., Broadbent, J., Harrington, H., Sugden, K., Houts, R.M., Ramrakha, S., Poulton, R., & Moffitt, T.E. (2017). Association of childhood blood lead levels with cognitive function and socioeconomic status at age 38 years and with IQ change and socioeconomic mobility between childhood and adulthood. *Journal of the American Medical Association*, 317(12), 1244–1251. doi:10.1001/jama.2017.1712.
9. Almeida Lopes, A. C., Silbergeld, E. K., Navas-Acien, A., Zamoiski, R., Martins, A. D. Jr., Camargo, A. E., Urbano, M. R., Mesas, A. E., & Paoliello, M. M. (2017). Association between blood lead and blood pressure: a population-based study in Brazilian adults. *Environmental Health*, 16(1), 27–37. doi: 10.1186/s12940-017-0233-5.

10. Ding, N., Wang, X., Weisskopf, M.G., Sparrow, D., Schwartz, J., Hu, H., & Park, S. K. (2016). Lead-related genetic loci, cumulative lead exposure and incident coronary heart disease: the normative aging study. *PLoS One*, 11(9). doi: 10.1371/journal.pone.0161472.
11. Buser, M. C., Ingber, S. Z., Raines, N., Fowler, D. A., & Scinicariello, F. (2016). Urinary and blood cadmium and lead and kidney function: NHANES 2007-2012. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(3), 261–217. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.01.005.
12. Wiener, R. C., Long, D. L., & Jurevic, R. J. (2015). Blood levels of the heavy metal, lead, and caries in children aged 24-72 months: NHANES III. *Caries Research*, 49(1), 26–33. doi:10.1159/000365297
13. Modabbernia, A., Velthorst, E., Gennings, C., De Haan, L., Austin, C., Sutterland, A., Mollon, J., Frangou, S., Wright, R., Arora, M., & Reichenberg, A. (2016). Early-life metal exposure and schizophrenia: A proof-of-concept study using novel tooth-matrix biomarkers. *European Psychiatry*, 36, 1–6. doi:10.1016/j.eurpsy.2016.03.006.
14. Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, 8, 13–28. doi:10.1186/s13229-017-0121-4.
15. Escribano, A., Revilla, M., Hernández, E. R., Seco, C., González-Riola, J., Villa, L. F., & Rico, H. (1997). Effect of Lead on Bone Development and Bone Mass: A Morphometric, Densitometric, and Histomorphometric Study in Growing Rats. *Calcified Tissue International*, 60(2), 200-203. doi:10.1007/s002239900214
16. Olchowik, G., Widomska, J., Tomaszewski, M., Gospodarek, M., Tomaszewska, M., & Jagiełło - Wójtowicz, E. (2014). The influence of lead on the biomechanical properties of bone tissue in rats. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21(2), 278-281. doi:10.5604/1232-1966.1108591
17. Campbell, J. R., & Auinger, P. (2007). The Association between Blood Lead Levels and Osteoporosis among Adults—Results from the Third National Health

- and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Environmental Health Perspectives*, 115(7), 1018-1022. doi:10.1289/ehp.9716
18. Nash, D. (2003). Blood Lead, Blood Pressure, and Hypertension in Perimenopausal and Postmenopausal Women. *JAMA*, 289(12), 1523. doi:10.1001/jama.289.12.1523
 19. Sun, Y., Sun, D. H., Zhu, G. Y. Lei, L. J., & Jin, T. Y. (2007) Effects of occupational lead exposure on lumbar vertebral fracture in male workers. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 25(11), 645-648.
 20. Khalil, N., Cauley, J. A., Wilson, J. W., Talbott, E. O., Morrow, L., Hochberg, M. C., Cummings, S. R. (2008). Relationship of Blood Lead Levels to Incident Nonspine Fractures and Falls in Older Women: The Study of Osteoporotic Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(9), 1417-1425. doi:10.1359/jbmr.080404
 21. Lee, C. M., Terrizzi, A. R., Bozzini, C., Piñeiro, A. E., Conti, M. I., & Martínez, M. P. (2016). Chronic lead poisoning magnifies bone detrimental effects in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 68(1), 47-53. doi:10.1016/j.etp.2015.09.007
 22. Monir, A., Gundberg, C., Yagerman, S., Van der Meulen, M., Budell, W., Boskey, A., & Dowd, T. (2010). The effect of lead on bone mineral properties from female adult C57/BL6 mice. *Bone*, 47(5), 888-894. doi:10.1016/j.bone.2010.07.013
 23. Eum, K., Weisskopf, M. G., Nie, L. H., Hu, H., & Korrick, S. A. (2014). Cumulative Lead Exposure and Age at Menopause in the Nurses' Health Study Cohort. *Environmental Health Perspectives*. doi:10.1289/ehp.1206399
 24. Mendola, P., Brett, K., DiBari, J. N., Pollack, A. Z., Tandon, R., & Shenassa, E. D. (2013). Menopause and lead body burden among US women aged 45–55, NHANES 1999–2010. *Environmental Research*, 121, 110-113. doi:10.1016/j.envres.2012.12.009

25. Carmouche, J. J., Puzas, J. E., Zhang, X., Tiyapatanaputi, P., Cory-Slechta, D. A., Gelein, R., Schwarz, E. M. (2005). Lead Exposure Inhibits Fracture Healing and Is Associated with Increased Chondrogenesis, Delay in Cartilage Mineralization, and a Decrease in Osteoprogenitor Frequency. *Environmental Health Perspectives*, *113*(6), 749-755. doi:10.1289/ehp.7596
26. Beier, E. E., Maher, J. R., Sheu, T., Cory-Slechta, D. A., Berger, A. J., Zuscik, M. J., Puzas, J. E. (2013). Heavy Metal Lead Exposure, Osteoporotic-like Phenotype in an Animal Model, and Depression of Wnt Signaling. *Environmental Health Perspectives*, *121*(1), 97-104. doi:10.1289/ehp.1205374
27. Hicks, D. G., O'Keefe, R. J., Reynolds, K. J., Cory-Slechta, D. A., Puzas, J., Judkins, A., & Rosier, R. N. (1996). Effects of Lead on Growth Plate Chondrocyte Phenotype. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *140*(1), 164-172. doi:10.1006/taap.1996.0209
28. Ronis, M. J. (2001). Skeletal Effects of Developmental Lead Exposure in Rats. *Toxicological Sciences*, *62*(2), 321-329. doi:10.1093/toxsci/62.2.321
29. González-Riola, J., Hernández, E., Escribano, A., Revilla, M., Ca-Seco, Villa, L., & Rico, H. (1997). Effect of Lead on Bone and Cartilage in Sexually Mature Rats: A Morphometric and Histomorphometry Study. *Environmental Research*, *74*(1), 91-93. doi:10.1006/enrs.1997.3760
30. Hamilton, J. (1994). Effects of Lead Exposure on Skeletal Development in Rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, *22*(4), 594-604. doi:10.1006/faat.1994.1066
31. Beier, E. E., Holz, J. D., Sheu, T., & Puzas, J. E. (2016). Elevated Lifetime Lead Exposure Impedes Osteoclast Activity and Produces an Increase in Bone Mass in Adolescent Mice. *Toxicological Sciences*, *149*(2), 277-288. doi:10.1093/toxsci/kfv234

32. Ma, Y., Fu, D., & Liu, Z. (2012). Effect of lead on apoptosis in cultured rat primary osteoblasts. *Toxicology and Industrial Health*, 28(2), 136-146. doi:10.1177/0748233711407956
33. Fleisch, A. F., Burns, J. S., Williams, P. L., Lee, M. M., Sergeev, O., Korrick, S. A., & Hauser, R. (2013). Blood Lead Levels and Serum Insulin-Like Growth Factor 1 Concentrations in Peripubertal Boys. *Environmental Health Perspectives*, 121(7), 854-858. doi:10.1289/ehp.1206105
34. Yang, H., Huo, X., Yekeen, T. A., Zheng, Q., Zheng, M., & Xu, X. (2012). Effects of lead and cadmium exposure from electronic waste on child physical growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4441-4447. doi:10.1007/s11356-012-1366-2
35. Ballew, C., Khan, L. K., Kaufmann, R., Mokdad, A., Miller, D. T., & Gunter, E. W. (1999). Blood lead concentration and children's anthropometric dimensions in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-1994. *The Journal of Pediatrics*, 134(5), 623-630. doi:10.1016/s0022-3476(99)70250-7
36. Kafourou, A., Touloumi, C., Makropoulos, V., Loutradi, A., Papanagiotou, A., & Hatzakis, A. (1997). Effects of Lead on the Somatic Growth of Children. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 52(5), 377-383. doi:10.1080/00039899709602214
37. Zuscik, M. J., Pateder, D. B., Edward Puzas, J., Schwarz, E. M., Rosier, R. N., & O'Keefe, R. J. (2002). Lead alters parathyroid hormone-related peptide and transforming growth factor- β 1 effects and AP-1 and NF- κ B signaling in chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, 20(4), 811-818. doi:10.1016/s0736-0266(02)00007-4
38. Meirer, F., Pemmer, B., Pepponi, G., Zoeger, N., Wobrauschek, P., Sprio, S., ... Strel, C. (2011). Assessment of chemical species of lead accumulated in tidemarks of human articular cartilage by X-ray absorption near-edge structure analysis. *Journal of Synchrotron Radiation*, 18(2), 238-244. doi:10.1107/s0909049510052040

39. Roschger, A., Hofstaetter, J., Pemmer, B., Zoeger, N., Wobrauschek, P., Falkenberg, G., ... Strel, C. (2013). Differential accumulation of lead and zinc in double-tidemarks of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(11), 1707-1715. doi:10.1016/j.joca.2013.06.029
40. Brodziak-Dopierała, B., Kowol, J., Kwapuliński, J., Kusz, D., & Cieliński, Ł. (2011). Lead and Calcium Content in the Human Hip Joint. *Biological Trace Element Research*, 144(1-3), 6-16. doi:10.1007/s12011-011-9014-0
41. Nelson, A. E., Chaudhary, S., Kraus, V. B., Fang, F., Chen, J., Schwartz, T. A., ... Jordan, J. M. (2011). Whole blood lead levels are associated with biomarkers of joint tissue metabolism in African American and white men and women: The Johnston County Osteoarthritis Project. *Environmental Research*, 111(8), 1208-1214. doi:10.1016/j.envres.2011.08.002
42. Jordan, J. M., Callahan, L. F. (2007). Community and environmental factors and arthritis outcomes. *North Carolina Medical Journal*, 68(6), 439-443.
43. Nowakowski, A., Kubaszewski, Ł., Frankowski, M., Wilk-Frańczuk, M., Ziola-Frankowska, A., Czabak-Garbacz, R., ... Gasik, R. (2015). Analysis of trace element in intervertebral disc by Atomic Absorption Spectrometry techniques in degenerative disc disease in the Polish population. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(2), 362-367. doi:10.5604/12321966.1152096
44. Авцын, А. П., Жаворонков, А. А., Риш, М. А., Строчкова, Л. С. (1991). *Микроэлементозы человека*. Москва: Медицина.
45. Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution. Joint WH. Convention task force on the health aspects of air pollution. (2007). Retrieved from http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/78649/E91044.pdf?ua=1
46. Обзорная сводка о состоянии здоровья в Украине. (2005). Retrieved from <http://www.euro.who.int/ru/countries/ukraine/publications3/highlights-on-health-in-ukraine>

47. Теплая, Г. А. (2013). Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды. *Астраханский вестник экологического образования*, 1(23), 182-192.
48. Vahter, M., Berglund, M., & Åkesson, A. (2004). Toxic metals and the menopause. *British Menopause Society Journal*, 10(2), 60-65. doi:10.1258/136218004774202364
49. Morrow, L., Needleman, H. L., McFarland, C., Metheny, K., & Tobin, M. (2007). Past Occupational Exposure to Lead: Association Between Current Blood Lead and Bone Lead. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 62(4), 183-186. doi:10.3200/aeoh.62.4.183-186
50. Hu, H., Shih, R., Rothenberg, S., & Schwartz, B. S. (2007). The Epidemiology of Lead Toxicity in Adults: Measuring Dose and Consideration of Other Methodologic Issues. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 455-462. doi:10.1289/ehp.9783
51. Schwartz, B. S., & Hu, H. (2007). Adult Lead Exposure: Time for Change. *Environmental Health Perspectives*, 115(3), 451-454. doi:10.1289/ehp.9782
52. Grandjean, P. (2010). Even low-dose lead exposure is hazardous. *The Lancet*, 376(9744), 855-856. doi:10.1016/s0140-6736(10)60745-3
53. Schwartz, J., Angle, C. R., Pirkle, J., L., & Pitcher, H. (1986). Childhood blood-lead levels and stature. *Pediatrics*, 77, 281-288.
54. Пермякова, И. А., Устинова, О. Ю. (2013). Состояние опорно-двигательного аппарата у детей с различным уровнем содержания металлов в крови. *Вестник Пермского университета. Биология*, 1, 71-76.
55. Doumouchsis, K. K., Doumouchsis, S. K., Doumouchsis, E. K., & Perrea, D. N. (2009). The effect of lead intoxication on endocrine functions. *Journal of Endocrinological Investigation*, 32(2), 175-183. doi:10.1007/bf03345710

56. Lau, Y., Camoratto, A., Mullerwhite, L., & Moriarty, C. (1991). Effect of lead on TRH and GRF binding in rat anterior pituitary membranes. *Toxicology*, 68(2), 169-179. doi:10.1016/0300-483x(91)90019-w
57. Martin J. J. Ronis Thomas M. Badger. (1998). Endocrine mechanisms underlying the growth effects of developmental lead exposure in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 54(2), 101-120. doi:10.1080/009841098158944
58. Zuscik, M. J., Ma, L., Buckley, T., Puzas, J. E., Drissi, H., Schwarz, E. M., & O'Keefe, R. J. (2007). Lead Induces Chondrogenesis and Alters Transforming Growth Factor- β and Bone Morphogenetic Protein Signaling in Mesenchymal Cell Populations. *Environmental Health Perspectives*, 115(9), 1276-1282. doi:10.1289/ehp.10028
59. Побел, Н. А., Дедух, Н. В. (2007). *Микроэлементы, химические токсикогены, нарушение экологического равновесия и артроз*. В Корж, Н. А., Хвисяк, А. Н., Дедух, Н. В. *Остеоартроз: консервативная терапия: монография*. Харьков: Золотые страницы.
60. Hammond, P., Chernausk, S., Succop, P., Shukla, R., & Bornschein, R. (1989). Mechanisms by which lead depresses linear and ponderal growth in weanling rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 99(3), 474-486. doi:10.1016/0041-008x(89)90155-5
61. Zoeger, N., Roschger, P., Hofstaetter, J., Jokubonis, C., Pepponi, G., Falkenberg, G., ... Wobrauschek, P. (2006). Lead accumulation in tidemark of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(9), 906-913. doi:10.1016/j.joca.2006.03.001
62. Lilis, R., Fischbein, A., Diamond, S., Anderson, H. A., Selikoff, I. J., Blumberg, W. E., & Eisinger, J. (1977). Lead Effects among Secondary Lead Smelter Workers with Blood Lead Levels below 80 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 32(6), 256-266. doi:10.1080/00039896.1977.10667292

63. Yıldızgören, M. T., Baki, A. E., Kara, M., Ekiz, T., Tiftik, T., Tutkun, E., ... Özçakar, L. (2015). Ultrasonographic measurement of the femoral cartilage thickness in patients with occupational lead exposure. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 25(4), 417-419. doi:10.1038/jes.2014.64
64. Peh, W., & Reinus, W. (1995). Lead arthropathy: a cause of delayed onset lead poisoning. *Skeletal Radiology*, 24(5). doi:10.1007/bf00197067
65. Crabill, M. R., Watkins, J. P., Morris, E. L. Helman, R. G., & Schmitz, D. G. (1994). Lead foreign body arthropathy in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205(6), 864-866.
66. Zuscik, M. J., Puzas, E., O'Keefe, R. J. (2006). Pb exposure regulates a complex interplay of signaling pathways in articular chondrocytes that ultimately leads to phenotypic changes resembling osteoarthritis. *The Toxicologist CD-An official Journal of the Society of Toxicology*, 90, 3-12.
67. Holz, J. D., Beier, E., Sheu, T., Ubayawardena, R., Wang, M., Sampson, E. R., ... Puzas, J. E. (2012). Lead induces an osteoarthritis-like phenotype in articular chondrocytes through disruption of TGF- β signaling. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(11), 1760-1766. doi:10.1002/jor.22117
68. Hamilton, J. (1995). Influence of Lead on Mineralization during Bone Growth. *Fundamental and Applied Toxicology*, 26(2), 265-271. doi:10.1006/faat.1995.1097
69. Pounds, J. G., Long, G. J., & Rosen, J. F. (1991). Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environmental Health Perspectives*, 91, 17-32. doi:10.1289/ehp.919117
70. White, P. D., Van Leeuwen, P., Davis, B. D., Maddaloni, M., Hogan, K. A., Marcus, A. H., ... Elias, R. W. (1998). The conceptual structure of the integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children. *Environmental Health Perspectives*, 106(suppl. 6), 1513-1530.

71. Potula, V., Kleinbaum, D., & Kaye, W. (2006). Lead Exposure and Spine Bone Mineral Density. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 48(6), 556-564. doi:10.1097/01.jom.0000222556.89044.90
72. Monro, J., Leon, R., & Puri, B. (2013). The risk of lead contamination in bone broth diets. *Medical Hypotheses*, 80(4), 389-390. doi:10.1016/j.mehy.2012.12.026
73. Park, S., & Lee, B. (2012). Inverse relationship between fat intake and blood lead levels in the Korean adult population in the KNHANES 2007–2009. *Science of The Total Environment*, 430, 161-166. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.009
74. Sawan, R. M., Leite, G. A., Saraiva, M. C., Barbosa, F., Tanus-Santos, J. E., & Gerlach, R. F. (2010). Fluoride increases lead concentrations in whole blood and in calcified tissues from lead-exposed rats. *Toxicology*, 271(1-2), 21-26. doi:10.1016/j.tox.2010.02.002
75. Kern, M., Wisniewski, M., Cabell, L., Audesirk, G. (2000). Inorganic lead and calcium interact positively in activation of calmodulin. *Neurotoxicology*, 21(3), 353-363.
76. Rabinowitz, M. B. (1991). Toxicokinetics of Bone Lead. *Environmental Health Perspectives*, 91, 33. doi:10.2307/3430979
77. Brochin R., Leone S., Phillips D., Shepard N., Zisa D., Angerio A. (2008). The cellular effect of lead poisoning and its clinical picture. *Journal of Health Sciences*, 5(2). Retrieved from <https://blogs.commonsgorgetown.edu/journal-of-health-sciences/issues-2/previous-volumes/vol-5-no-2-december-2008/the-cellular-effect-of-lead-poisoning-and-its-clinical-picture/>
78. Leonas R., Noor Z., Rasyid H. N., Madjid T. H., Tanjung F. A. (2016). Effect of lead nanoparticles inhalation on bone calcium sensing receptor, hydroxyapatite crystal and receptor activator of nuclear factor-kappa b in rats. *Acta Informatica Medica*, 24(5), 343–346. doi: 10.5455/aim.2016.24.343-346.
79. Rosin, A. (2009). The long-term consequences of exposure to lead. *The Israel Medical Association Journal*, 11, 689-694.

80. Brito, J. A., McNeill, F. E., Stronach, I., Webber, C. E., Wells, S., Richard, N., & Chettle, D. R. (2001). Longitudinal changes in bone lead concentration: implications for modelling of human bone lead metabolism. *Journal of Environmental Monitoring*, 3(4), 343-351. doi:10.1039/b101493p
81. Miculescu, F., Miculescu, M., Ciocan, L. T., Ernuteanu, A., Antoniac, I., Pencea I., ... Matei E. (2011). Comparative studies regarding heavy elements concentration in human cortical bone. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(3), 1117-1127.
82. Farias, P., Echavarria, M., Hernandez-Avila, M., Villanueva, C., Amarasiriwardena, C., Hernandez, L., ... Hu, H. (2005). Bone, blood and semen lead in men with environmental and moderate occupational exposure. *International Journal of Environmental Health Research*, 15(1), 21-31. doi:10.1080/09603120400018782
83. Wiechuła, D., Jurkiewicz, A., & Loska, K. (2008). An assessment of natural concentrations of selected metals in the bone tissues of the femur head. *Science of The Total Environment*, 406(1-2), 161-167. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.07.068
84. In vivo Measurements of Lead in Bone in Long-term Exposed Lead Smelter Workers. (1993). *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 48(3), 147-156. doi:10.1080/00039896.1993.9940813
85. Silbergeld, E. K., Schwartz, J., & Mahaffey, K. (1988). Lead and osteoporosis: Mobilization of lead from bone in postmenopausal women. *Environmental Research*, 47(1), 79-94. doi:10.1016/s0013-9351(88)80023-9
86. Manton, W., Angle, C., Stanek, K., Kuntzelman, D., Reese, Y., & Kuehnemann, T. (2003). Release of lead from bone in pregnancy and lactation. *Environmental Research*, 92(2), 139-151. doi:10.1016/s0013-9351(03)00020-3
87. Nie, H., Sánchez, B. N., Wilker, E., Weisskopf, M. G., Schwartz, J., Sparrow, D., & Hu, H. (2009). Bone Lead and Endogenous Exposure in an Environmentally Exposed Elderly Population: The Normative Aging

- Study. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 51(7), 848-857. doi:10.1097/jom.0b013e3181aa0106
88. Chu, P., Wu, C., Chen, C., & Lu, K. (2012). Parathyroidectomy leads to decreased blood lead levels in patients with refractory secondary hyperparathyroidism. *Bone*, 50(5), 1032-1038. doi:10.1016/j.bone.2012.02.011
 89. Korrick, S. A., Schwartz, J., Tsaih, S., Hunter, D. J., Aro, A., Rosner, B., ... Hu, H. (2002). Correlates of Bone and Blood Lead Levels among Middle-aged and Elderly Women. *American Journal of Epidemiology*, 156(4), 335-343. doi:10.1093/aje/kwf042
 90. Pemmer, B., Roschger, A., Wastl, A., Hofstaetter, J., Wobrauschek, P., Simon, R., ... Strel, C. (2013). Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. *Bone*, 57(1), 184-193. doi:10.1016/j.bone.2013.07.038
 91. Dowd, T., Rosen, J., Gundberg, C., & Gupta, R. (1994). The displacement of calcium from osteocalcin at submicromolar concentrations of free lead. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1226(2), 131-137. doi:10.1016/0925-4439(94)90020-5
 92. Dowd, T., Rosen, J., Mints, L., & Gundberg, C. (2001). The effect of Pb²⁺ on the structure and hydroxyapatite binding properties of osteocalcin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1535(2), 153-163. doi:10.1016/s0925-4439(00)00094-6
 93. Álvarez-Lloret P., Lee C.M., Conti M. I., Terrizzi A. R., González-López S., Martínez M. P. (2017). Effects of chronic lead exposure on bone mineral properties in femurs of growing rats. *Toxicology*, 377, 64-72. doi: 10.1016/j.tox.2016.11.017.
 94. Arruda-Neto, J., De Oliveira, M., Sarkis, J., Bordini, P., Manso-Guevara, M., Garcia, F., ... Genofre, G. (2009). Study of environmental burden of lead in children using teeth as bioindicator. *Environment International*, 35(3), 614-618. doi:10.1016/j.envint.2008.12.005

95. Arora, M., Weuve, J., Weisskopf, M. G., Sparrow, D., Nie, H., Garcia, R. I., & Hu, H. (2009). Cumulative Lead Exposure and the Risk of Tooth Loss in Men: The Normative Aging Study. *Epidemiology*, *20*, S25-S26. doi:10.1097/01.ede.0000362254.42071.6b
96. Theppeang, K., Glass, T. A., Bandeen-Roche, K., Todd, A. C., Rohde, C. A., & Schwartz, B. S. (2008). Gender and Race/Ethnicity Differences in Lead Dose Biomarkers. *American Journal of Public Health*, *98*(7), 1248-1255. doi:10.2105/ajph.2007.118505
97. Kosnett, M. J. (1994). Factors influencing bone lead concentration in a suburban community assessed by noninvasive K x-ray fluorescence. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *271*(3), 197-203. doi:10.1001/jama.271.3.197
98. Brown, M. J. (2000). Determinants of bone and blood lead concentrations in the early postpartum period. *Occupational and Environmental Medicine*, *57*(8), 535-541. doi:10.1136/oem.57.8.535
99. Popovic, M., McNeill, F. E., Chettle, D. R., Webber, C. E., Lee, C. V., & Kaye, W. E. (2005). Impact of Occupational Exposure on Lead Levels in Women. *Environmental Health Perspectives*, *113*(4), 478-484. doi:10.1289/ehp.7386
100. Wilker, E., Korrick, S., Nie, L. H., Sparrow, D., Vokonas, P., Coull, B., ... Hu, H. (2011). Longitudinal Changes in Bone Lead Levels. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *53*(8), 850-855. doi:10.1097/jom.0b013e31822589a9
101. Guimarães, D., Carvalho, M. L., Geraldes, V., Rocha, I., & Santos, J. P. (2012). Study of lead accumulation in bones of Wistar rats by X-ray fluorescence analysis: aging effect. *Metallomics*, *4*(1), 66-71. doi:10.1039/c1mt00149c
102. Augusto Tocchini de Figueiredo, F., Gerlach, R. F., Andreia Mesquita Silva da Veiga, M., Venancio Nakadi, F., Ramos, J., Reiko Kawakita, E., ... Issa, J. P. (2014). Reduced Bone and Body Mass in Young Male Rats Exposed to Lead. *BioMed Research International*, *2014*, 1-5. doi:10.1155/2014/571065

103. Specht A. J., Lin Y., Weisskopf M., Yan C., Hu H., Xu J., Nie L.H. (2016). XRF-measured bone lead (Pb) as a biomarker for Pb exposure and toxicity among children diagnosed with Pb poisoning. *Biomarkers*, 21(4), 347–352. doi: 10.3109/1354750X.2016.1139183.
104. Onalaja, A. O., & Claudio, L. (2000). Genetic Susceptibility to Lead Poisoning. *Environmental Health Perspectives*, 108, 23. doi:10.2307/3454630
105. Schwartz, B. S., Stewart, W. F., Kelsey, K. T., Simon, D., Park, S., Links, J. M., & Todd, A. C. (2000). Associations of Tibial Lead Levels with BsmI Polymorphisms in the Vitamin D Receptor in Former Organolead Manufacturing Workers. *Environmental Health Perspectives*, 108(3), 199-203. doi:10.1289/ehp.00108199
106. Smith, C. M., DeLuca, H. F., Tanaka, Y., & Mahaffey, K. R. (1981). Effects of lead ingestion on functions of vitamin D and its metabolites. *Journal of Nutrition*, 111, P. 1321-1329.
107. Markowitz, M. E., Gundberg, C. M., Rosen, J. F. (1988). Sequential osteocalcin (Oc) sampling as a biochemical marker of the success of treatment in moderately lead (Pb) poisoned children. *Pediatric Research*, 23, 393.
108. Kristal-Boneh, E., Fromm, P., Yerushalmi, N., Harari, G., & Ribak, J. (1998). Calcitropic Hormones and Occupational Lead Exposure. *American Journal of Epidemiology*, 147(5), 458-463. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009471
109. Mendy, A., Gasana, J., & Vieira, E. R. (2013). Low blood lead concentrations and thyroid function of American adults. *International Journal of Environmental Health Research*, 23(6), 461-473. doi:10.1080/09603123.2012.755155
110. Sharifi, A. M., Ghazanfari, R., Tekiyehmaroof, N., & Sharifi, M. A. (2011). Investigating the effect of lead acetate on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells toxicity: Role of apoptosis. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21(3), 225-230. doi:10.3109/15376516.2010.543943
111. Beier, E. E., Inzana, J. A., Sheu, T., Shu, L., Puzas, J. E., & Mooney, R. A. (2015). Effects of Combined Exposure to Lead and High-Fat Diet on Bone

- Quality in Juvenile Male Mice. *Environmental Health Perspectives*, 123(10). doi:10.1289/ehp.1408581
112. Abdullah, M., Rahman, F. A., Gnanasegaran, N., Govindasamy, V., Abu Kasim, N. H., & Musa, S. (2014). Diverse Effects of Lead Nitrate on the Proliferation, Differentiation, and Gene Expression of Stem Cells Isolated from a Dental Origin. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-12. doi:10.1155/2014/235941
113. Bonucci, E., Barckhaus, R. H., & Silvestrini, G. (1983). Osteoclast changes induced by lead poisoning (saturnism). *Applied Pathology*, 1(5), 241-250.
114. Miyahara, T., Komiyama, H., Miyanishi, A., Takata, M., Nagai, M., Kozuka, H., ... Koizumi, F. (1995). Stimulative effects of lead on bone resorption in organ culture. *Toxicology*, 97(1-3), 191-197. doi:10.1016/0300-483x(94)02948-t
115. Gifre, L., Peris, P., Ruiz-Gaspa, S., Monegal, A., Nomdedeu, B., & Guanabens, N. (2013). Effect of glucocorticoid treatment on Wnt signalling antagonists (sclerostin and Dkk-1) and their relationship to bone turnover and bone mass. *Bone Abstracts*. doi:10.1530/boneabs.1.pp377
116. Wijenayaka, A. R., Kogawa, M., Lim, H. P., Bonewald, L. F., Findlay, D. M., & Atkins, G. J. (2011). Sclerostin Stimulates Osteocyte Support of Osteoclast Activity by a RANKL-Dependent Pathway. *PLoS ONE*, 6(10), e25900. doi:10.1371/journal.pone.0025900
117. Beier, E. E., Sheu, T.-J., & Dang, D. (2015). Lead affects bone mass through sclerostin activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 18216-18226.
118. Brito, J. A., Costa, I. M., E Silva, A. M., Marques, J. M., Zagalo, C. M., Cavaleiro, I. I., ... Gonçalves, L. L. (2014). Changes in bone Pb accumulation: Cause and effect of altered bone turnover. *Bone*, 64, 228-234. doi:10.1016/j.bone.2014.04.021
119. Tsaih, S., Korrick, S., Schwartz, J., Lee, M. T., Amarasiriwardena, C., Aro, A., ... Hu, H. (2001). Influence of Bone Resorption on the Mobilization of Lead from Bone among Middle-aged and Elderly Men: The Normative Aging

- Study. *Environmental Health Perspectives*, 109(10), 995-999. doi:10.1289/ehp.01109995
120. Jackson, L. W., Cromer, B. A., & Panneerselvamm, A. (2010). Association between Bone Turnover, Micronutrient Intake, and Blood Lead Levels in Pre- and Postmenopausal Women, NHANES 1999–2002. *Environmental Health Perspectives*, 118(11), 1590-1596. doi:10.1289/ehp.1002158
121. Lim, H., Lee, H., Kim, T., & Lee, B. (2016). Relationship between Heavy Metal Exposure and Bone Mineral Density in Korean Adult. *Journal of Bone Metabolism*, 23(4), 223. doi:10.11005/jbm.2016.23.4.223
122. Machida, M., Sun, S., Oguma, E., & Kayama, F. (2009). High bone matrix turnover predicts blood levels of lead among perimenopausal women. *Environmental Research*, 109(7), 880-886. doi:10.1016/j.envres.2009.06.005
123. Pollack, A., Mumford, S., Wactawski-Wende, J., Yeung, E., Mendola, P., Mattison, D., & Schisterman, E. (2013). Bone mineral density and blood metals in premenopausal women. *Environmental Research*, 120, 76-81. doi:10.1016/j.envres.2012.06.001
124. Khalil, N., Faulkner, K. A., Greenspan, S. L., & Cauley, J. A. (2014). Associations Between Bone Mineral Density, Grip Strength, and Lead Body Burden in Older Men. *Journal of the American Geriatrics Society*, 62(1), 141-146. doi:10.1111/jgs.12603
125. Wong, A. K., Beattie, K. A., Bhargava, A., Cheung, M., Webber, C. E., Chettle, D. R., ... Adachi, J. D. (2015). Bone lead (Pb) content at the tibia is associated with thinner distal tibia cortices and lower volumetric bone density in postmenopausal women. *Bone*, 79, 58-64. doi:10.1016/j.bone.2015.05.010
126. Sun, Y., Sun, D., Zhou, Z., Zhu, G., Zhang, H., Chang, X., ... Jin, T. (2008). Osteoporosis in a Chinese population due to occupational exposure to lead. *American Journal of Industrial Medicine*, 51(6), 436-442. doi:10.1002/ajim.20567

127. Raafat, B. M., Hassan, N. S., & Aziz, S. W. (2012). Bone mineral density (BMD) and osteoporosis risk factor in Egyptian male and female battery manufacturing workers. *Toxicology and Industrial Health*, 28(3), 245-252. doi:10.1177/0748233711410912
128. Gruber, H. E., Gonick, H. C., Khalil-Manesh, F., Sanchez, T. V., Motsinger, S., Meyer, M., & Sharp, C. F. (1997). Osteopenia induced by long-term, low and high-level exposure of the adult rat to lead. *Mineral Electrolyte Metabolism*, 23(2), 65-73.
129. Puzas, J. E., Cory-Sleeta, D. A., & Rosier, R. (1999). Chronic lead intoxication may contribute to osteoporosis. *Toxicologist*, 48(suppl. 1), 328.
130. Cole, G., Weigel, J., Headrick, A., Adams, W., & Biskup, J. (2015). Multiple pathological fractures and delayed union associated with lead exposure in a German Shepherd Dog. *Australian Veterinary Journal*, 93(10), 373-376. doi:10.1111/avj.12361
131. Beier, E. E., Sheu, T., Buckley, T., Yukata, K., O'Keefe, R., Zuscik, M. J., & Puzas, J. E. (2014). Inhibition of beta-catenin signaling by Pb leads to incomplete fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 32(11), 1397-1405. doi:10.1002/jor.22677
132. Западнюк, И. П., Западнюк, В. И., Захаоия, Е. А., Западнюк, Б. В. (1983). *Лабораторные животные*. Киев: Вища школа.
133. Jamieson J. A., Taylor C. G., & Weiler H. A. (2006). Marginal zinc deficiency exacerbates bone lead accumulation and high dietary zinc attenuates lead accumulation at the expense of bone density in growing rats. *Toxicological Sciences*, 92(1), 286–294. doi: 10.1093/toxsci/kfj201
134. Payal B., Kaur H. P., & Rai D. V. (2009). New insight into the effects of lead modulation on antioxidant defense mechanism and trace element concentration in rat bone. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 18–23. doi: 10.2478/v10102-009-0003-5.

135. Lelovas, P. P., Xanthos, T. T., Thoma, S. E., Lyritis, G. P., & Dontas, I. A. (2008). The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparativa medicine*, 58(4), 424–430.
136. Oheim, R., Schinke, T., Amling, M., & Pogoda, P. (2016). Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation? *Injury*, 47, S3-S9. doi:10.1016/s0020-1383(16)30002-x
137. Поворознюк, В. В., Дедух, Н. В., Григорьева, Н. В., Гопкалова, И. В. (2012). *Експериментальний остеопороз*. Київ: Експрес.
138. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. (18 березня 1986 року). Режим доступу: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137.
139. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. Верховна Рада України. Режим доступу: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>
140. Алексеев, В. П. (1966). Остеометрия. *Методика антропологических исследований*. Москва: Наука.
141. Саркисов, Д. С., Перов, Ю. Л. (1996). *Микроскопическая техника*. Москва: Медицина.
142. Уикли, Б. (1975). *Электронная микроскопия для начинающих*. Москва: Мир.
143. Aparicio, S. R., & Marsden, P. (1969). A rapid methylene blue-basic fuchsin stain for semi-thin sections of peripheral nerve and other tissues. *Journal of Microscopy*, 89(1), 139-141. doi:10.1111/j.1365-2818.1969.tb00659.x
144. Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 17(1), 208-212. doi:10.1083/jcb.17.1.208
145. Lattouf, R., Younes, R., Lutomski, D., Naaman, N., Godeau, G., Senni, K., & Changotade, S. (2014). Picrosirius Red Staining. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 751-758. doi:10.1369/0022155414545787

146. Erwin, W. M., Hood, K. E. (2014). The cellular and molecular biology of the intervertebral disc: A clinician's primer. *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*, 58(3), 246-257.
147. Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V., & Aigner, T. (2010). Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18, S113-S116. doi:10.1016/j.joca.2010.05.026
148. Rich, L., & Whittaker, P. (2005). Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Brazilian journal of morphological sciences*, 22(2), 97-104.
149. Modis, L. (1991). *Organization of the extracellular matrix*. USA: CRC Press.
150. Walter, B. A., Torre, O. M., Laudier, D., Naidich, T. P., Hecht, A. C., & Iatridis, J. C. (2015). Form and function of the intervertebral disc in health and disease: a morphological and stain comparison study. *Journal of Anatomy*, 227(6), 707-716. doi:10.1111/joa.12258
151. Zhu, H., Wang, Y., & Wang F. (2015). Isolation and identification of rat intervertebral disc nucleus pulposus cells at different segments and comparative study on biological characteristics. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 29(10), 1295-300.
152. Бююль, А., Цефель, П. (2005). SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. Москва: ДиаСофт.
153. Schafer, R. C. (1987). *General spinal biomechanics. Clinical biomechanics: musculoskeletal actions and reactions*. Second Edition. Retrieved from: http://www.chiro.org/ACAPress/General_Spinal_Biomechanics.html
154. Jiang, L., Yuan, F., Yin, X., & Dong, J. (2014). Responses and adaptations of intervertebral disc cells to microenvironmental stress: a possible central role of autophagy in the adaptive mechanism. *Connective Tissue Research*, 55(5-6), 311-321. doi:10.3109/03008207.2014.942419
155. Miyazaki, T., Iwasawa, M., Nakashima, T., Mori, S., Shigemoto, K., Nakamura, H., ... Tanaka, S. (2012). Intracellular and Extracellular ATP

- Coordinately Regulate the Inverse Correlation between Osteoclast Survival and Bone Resorption. *Journal of Biological Chemistry*, 287(45), 37808-37823. doi:10.1074/jbc.m112.385369
156. Meyer, J. N., Leung, M. C., Rooney, J. P., Sendoel, A., Hengartner, M. O., Kisby, G. E., & Bess, A. S. (2013). Mitochondria as a Target of Environmental Toxicants. *Toxicological Sciences*, 134(1), 1-17. doi:10.1093/toxsci/kft102
157. Szczęsny, G., Brodzikowska, A., Galus, R., Włodarski, P., & Włodarski, K. (2015). Regulation of Bone Homeostasis by Osteocytes. *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja*, 17(6), 567-675. doi:10.5604/15093492.1193009
158. Komori, T. (2014). Mouse Models for the Evaluation of Osteocyte Functions. *Journal of Bone Metabolism*, 21(1), 55. doi:10.11005/jbm.2014.21.1.55
159. Nango, N., Kubota, S., Hasegawa, T., Yashiro, W., Momose, A., & Matsuo, K. (2016). Osteocyte-directed bone demineralization along canaliculi. *Bone*, 84, 279-288. doi:10.1016/j.bone.2015.12.006
160. Xiong, J., Piemontese, M., Onal, M., Campbell, J., Goellner, J. J., Dusevich, V., ... O'Brien, C. A. (2015). Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLOS ONE*, 10(9), e0138189. doi:10.1371/journal.pone.0138189
161. Серов, В. В., Пауков, В.С. (1975). Ультраструктурная патология. Москва: Медицина.
162. Цивьян, Я. Л., Бурухин, А. А. (1988). Патология дегенерирующего межпозвонкового диска. Новосибирск: Наука.
163. Hristova, G. I., Jarzem, P., Ouellet, J. A., Roughley, P. J., Epure, L. M., Antoniou, J., & Mwale, F. (2011). Calcification in human intervertebral disc degeneration and scoliosis. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(12), 1888-1895. doi:10.1002/jor.21456
164. Rutges, J., Duit, R., Kummer, J., Oner, F., Van Rijen, M., Verbout, A., ... Creemers, L. (2010). Hypertrophic differentiation and calcification during

- intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(11), 1487-1495. doi:10.1016/j.joca.2010.08.006
165. Pascarelli, N., Collodel, G., Moretti, E., Cheleschi, S., & Fioravanti, A. (2015). Changes in Ultrastructure and Cytoskeletal Aspects of Human Normal and Osteoarthritic Chondrocytes Exposed to Interleukin-1 β and Cyclical Hydrostatic Pressure. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26019-26034. doi:10.3390/ijms161125936
166. Majno, G., Joris, I. (2004). *Cells, tissues, and disease: principles of general pathology*. New York: Oxford University Press.
167. Norcross, J. P., Lester, G. E., Weinhold, P., & Dahners, L. E. (2003). An in vivo model of degenerative disc disease. *Journal of Orthopaedic Research*, 21(1), 183-188. doi:10.1016/s0736-0266(02)00098-0
168. Ching, C. T., Chow, D. H., Yao, F. Y., & Holmes, A. D. (2003). The effect of cyclic compression on the mechanical properties of the inter-vertebral disc: An in vivo study in a rat tail model. *Clinical Biomechanics*, 18(3), 182-189. doi:10.1016/s0268-0033(02)00188-2
169. Gebhard, H., James, A., Bowles, R., Dyke, J., Saleh, T., Doty, S., ... Härtl, R. (2011). Biological intervertebral disc replacement: an in vivo model and comparison of two surgical techniques to approach the rat caudal disc. *Evidence-Based Spine-Care Journal*, 2(01), 29-35. doi:10.1055/s-0030-1267084
170. Risbud, M. V., Schoepflin, Z. R., Mwale, F., Kandel, R. A., Grad, S., Iatridis, J. C., ... Hoyland, J. A. (2015). Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: Recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. *Journal of Orthopaedic Research*, 33(3), 283-293. doi:10.1002/jor.22789
171. Showalter, B. L., Beckstein, J. C., Martin, J. T., Beattie, E. E., Orías, A. A., Schaer, T. P., ... Elliott, D. M. (2012). Comparison of Animal Discs Used in Disc Research to Human Lumbar Disc. *Spine*, 37(15), E900-E907. doi:10.1097/brs.0b013e31824d911c

172. Beckstein, J. C., Sen, S., Schaer, T. P., Vresilovic, E. J., & Elliott, D. M. (2008). Comparison of Animal Discs Used in Disc Research to Human Lumbar Disc. *Spine*, *33*(6), E166-E173. doi:10.1097/brs.0b013e318166e001
173. Majeed, S., Seshadrinath, N. K., Binoy, K., & Raji, L. (2016). Lumbar disc herniation: Is there an association between histological and magnetic resonance imaging findings? *Indian Journal of Orthopaedics*, *50*(3), 234. doi:10.4103/0019-5413.181794
174. Gruber, H. E., Watts, J. A., Riley, F. E., Fulkerson, M., Norton, H. J., & Hanley, E. N. (2013). Mitochondrial bioenergetics, mass, and morphology are altered in cells of the degenerating human annulus. *Journal of Orthopaedic Research*, *31*(8), 1270-1275. doi:10.1002/jor.22361
175. Gruber, H. E., Hoelscher, G. L., Ingram, J. A., Bethea, S., & Hanley, E. N. (2015). Autophagy in the Degenerating Human Intervertebral Disc. *Spine*, *40*(11), 773-782. doi:10.1097/brs.0000000000000865
176. Gong, K., Shao, W., Chen, H., Wang, Z., & Luo, Z. (2011). Rat Model of Lumbar Facet Joint Osteoarthritis Associated With Facet-mediated Mechanical Hyperalgesia Induced by Intra-articular Injection of Monosodium Iodoacetate. *Journal of the Formosan Medical Association*, *110*(3), 145-152. doi:10.1016/s0929-6646(11)60024-7
177. Suri, P., Hunter, D., Rainville, J., Guermazi, A., & Katz, J. (2013). Presence and extent of severe facet joint osteoarthritis are associated with back pain in older adults. *Osteoarthritis and Cartilage*, *21*(9), 1199-1206. doi:10.1016/j.joca.2013.05.013
178. Zhou, X., Liu, Y., Zhou, S., Fu, X., Yu, X., Fu, C., ... Dai, M. (2016). The correlation between radiographic and pathologic grading of lumbar facet joint degeneration. *BMC Medical Imaging*, *16*(1). doi:10.1186/s12880-016-0129-9
179. Gellhorn, A. C., Katz, J. N., & Suri, P. (2012). Osteoarthritis of the spine: the facet joints. *Nature Reviews Rheumatology*, *9*(4), 216-224. doi:10.1038/nrrheum.2012.199

180. Burr, D. B., & Gallant, M. A. (2012). Bone remodelling in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(11), 665-673. doi:10.1038/nrrheum.2012.130
181. Findlay, D. M., & Atkins, G. J. (2014). Osteoblast-Chondrocyte Interactions in Osteoarthritis. *Current Osteoporosis Reports*, 12(1), 127-134. doi:10.1007/s11914-014-0192-5
182. Bellido, M., Lugo, L., Roman-Blas, J. A., Castañeda, S., Caeiro, J. R., Dapia, S., ... Herrero-Beaumont, G. (2010). Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Research & Therapy*, 12(4), R152. doi:10.1186/ar3103
183. Li, G., Yin, J., Gao, J., Cheng, T. S., Pavlos, N. J., Zhang, C., & Zheng, M. H. (2013). Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Research & Therapy*, 15(6), 223. doi:10.1186/ar4405
184. Bleil, J., Sieper, J., Maier, R., Schlichting, U., Hempfing, A., Syrbe, U., & Appel, H. (2015). Cartilage in facet joints of patients with ankylosing spondylitis (AS) shows signs of cartilage degeneration rather than chondrocyte hypertrophy: implications for joint remodeling in AS. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1). doi:10.1186/s13075-015-0675-5
185. Yeh, T., Wen, Z., Lee, H., Lee, C., Yang, Z., Jean, Y., ... Han, B. (2008). Intra-articular injection of collagenase induced experimental osteoarthritis of the lumbar facet joint in rats. *European Spine Journal*, 17(5), 734-742. doi:10.1007/s00586-008-0594-0
186. Thomas, C. M., Fuller, C. J., Whittles, C. E., & Sharif, M. (2011). Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 14(2), 191-198. doi:10.1111/j.1756-185x.2010.01578.x
187. Hwang, H., & Kim, H. (2015). Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26035-26054. doi:10.3390/ijms161125943

188. Intema, F., Hazewinkel, H., Gouwens, D., Bijlsma, J., Weinans, H., Lafeber, F., & Mastbergen, S. (2010). In early OA, thinning of the subchondral plate is directly related to cartilage damage: results from a canine ACLT-meniscectomy model. *Osteoarthritis and Cartilage*, *18*(5), 691-698. doi:10.1016/j.joca.2010.01.004
189. Florea, C., Malo, M., Rautiainen, J., Mäkelä, J., Fick, J., Nieminen, M., ... Korhonen, R. (2015). Alterations in subchondral bone plate, trabecular bone and articular cartilage properties of rabbit femoral condyles at 4 weeks after anterior cruciate ligament transection. *Osteoarthritis and Cartilage*, *23*(3), 414-422. doi:10.1016/j.joca.2014.11.023
190. Hayami, T., Pickarski, M., Zhuo, Y., Wesolowski, G. A., Rodan, G. A., & Duong, L. T. (2006). Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*, *38*(2), 234-243. doi:10.1016/j.bone.2005.08.007
191. Volk, S. W., Shah, S. R., Cohen, A. J., Wang, Y., Brisson, B. K., Vogel, L. K., ... Adams, S. L. (2014). Type III Collagen Regulates Osteoblastogenesis and the Quantity of Trabecular Bone. *Calcified Tissue International*, *94*(6), 621-631. doi:10.1007/s00223-014-9843-x
192. Postacchini, F. (1999). Lumbar disc herniation. Wiena, NewYork: Springer.
193. Jin, L., Liu, Q., Scott, P., Zhang, D., Shen, F., Balian, G., & Li, X. (2014). Annulus Fibrosus Cell Characteristics Are a Potential Source of Intervertebral Disc Pathogenesis. *PLoS ONE*, *9*(5), e96519. doi:10.1371/journal.pone.0096519
194. Gulson, B., Taylor, A., & Eisman, J. (2016). Bone remodeling during pregnancy and post-partum assessed by metal lead levels and isotopic concentrations. *Bone*, *89*, 40-51. doi:10.1016/j.bone.2016.05.005
195. Taylor, C. M., Tilling, K., Golding, J., & Emond, A. M. (2016). Low level lead exposure and pregnancy outcomes in an observational birth cohort study: dose-response relationships. *BMC Research Notes*, *9*(1). doi:10.1186/s13104-016-2092-5

196. Silver, M. K., Li, X., Liu, Y., Li, M., Mai, X., Kaciroti, N., ... Lozoff, B. (2016). Low-level prenatal lead exposure and infant sensory function. *Environmental Health*, 15(1). doi:10.1186/s12940-016-0148-6
197. Niedźwiedzki, T., Pawlikowski, M., Brudnicki, J., Palka, E. (1997). Mineral changes in the intervertebral disc and facet joints during aging. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska*, 62(1), 39-45.
198. Urban, J. P., & Roberts, S. (2003). Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Research & Therapy*, 5(3), 120. doi:10.1186/ar629
199. Facts and Statistics | International Osteoporosis Foundation. (n.d.). Retrieved from <https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics>
200. Bagchi, D., & Preuss, H. G. (2005). Effects of acute and chronic oval exposure of lead on blood pressure and bone mineral density in rats. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(5), 1155-1164. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.02.011
201. Puzas, J. E. (2003). US 7386337 B2. University Of Rochester. *Correction of dual energy X-ray absorptiometry measurements based on body lead levels*.
202. Мальцева, В. Є. (2016). Вплив свинцю на структурно-функціональний стан кісткової тканини хребта щурів на фоні остеопорозу. *Фундаментальні проблеми медицини та біології*, 1(127), 4-7.
203. Maltseva, V. (2017). Effect of Pb exposure on the cells and matrix of the intervertebral disc of rats. *Regulatory mechanisms in biosystems*, 8 (2), 217-224.
204. Мальцева, В. Є. (2015). Вікові особливості остеометричних параметрів тіл хребців щурів після впливу свинцю. *Вісник проблем біології і медицини*, 1 (124), 115-119.
205. Мальцева В.Е. (2013). Структурные нарушения в позвоночнике неполовозрелых крыс в условиях свинцовой интоксикации. *Таврический медико-биологический вестник*, 16(1), 152-155.
206. Мальцева, В. Е. (2012). Влияние свинцовой интоксикации на межпозвоночный диск (экспериментальное исследование). *Боль. Суставы. Позвоночник*, 1(6), 37-41.

207. Мальцева, В. Є. (2016). Перебудова дуговідросткових суглобів молодих щурів та з остеопорозом після впливу свинцю : матер. конф. [Прикладні аспекти морфології] (Тернопіль, 20-21 жовтня), 103-105.
208. Мальцева, В. Є. (2016). Вплив свинцю на вміст колагенів у міжхребцевому диску та губчастій кістковій тканині тіл хребців щурів різного віку. *Вісник проблем біології і медицини*, 1(131), 211-215.
209. Мальцева, В. Є. (2016). Вплив свинцю на клітини кісткової тканини тіл хребців щурів на фоні остеопорозу. *Вісник проблем біології і медицини*, 2(3), 265-269.
210. Мальцева, В. Е. (2015). Влияние свинца на дугоотростчатые суставы молодых крыс : збір. тез доповідей наук.-практ. конф. [Морфологічні дослідження – виклики сучасності] (Сумський державний університет) (Суми, 22-23 квітня), 32-35.

Додатки

Додаток А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Ректор Харківської медичної академії
 післядипломної освіти
 д.м.н., професор Хвисьок О.М.
 « 3 » _____ 2017 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ


1. Назва пропозиції для впровадження Нові знання щодо структурно-функціонального стану кісткової тканини хребта щурів на фоні остеопорозу за умов дії свинцю.
2. Установа-розробник, її поштова адреса, прізвище, ініціали авторів ДУ «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка НАМН України», 61024, м. Харків, вул. Пушкінська, 80; Мальцева В.Є.
3. Джерело інформації: стаття.
4. 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.
5. Найменування установи, яка здійснила впровадження: Харківська медична академія післядипломної освіти.
6. Строки впровадження: з січня до квітня 2017 року.
7. Загальна кількість спостережень: результати отримані під час дослідження поперекового відділу хребта щурів після моделювання дії свинцю на фоні остеопорозу.
8. Ефективність впровадження (клінічна, наукова, соціальна, економічна): Результати дослідження мають новизну щодо якісних та кількісних структурних особливостей кісткової тканини тіл хребців щурів після моделювання впливу свинцю на фоні остеопорозу. Отримані дані свідчать, що вплив свинцю у щурів з модельованим остеопорозом призводить до втрати кісткової маси у результаті підвищення активності процесу резорбції та пригнічення формування кістки. Одержані результати є експериментальним підґрунтям для розробки заходів попередження компресійних переломів у людей похилого віку.
10. Зауваження, пропозиції: одержані нові знання використані у педагогічній та науково-дослідній роботі.

Відповідальна за впровадження особа(посада, підпис, прізвище, ініціали)

Професор кафедри ортопедії та
 травматології
 д.м.н., проф.

 Посуйшاپка О.К.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Заступник директора з наукової роботи
 Медичного інституту
 Сумського державного університету
 Погорсяв М.В.




_____ 2018р.
С.Г.К.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Пропозиція для впровадження:** нові знання щодо структурно-функціонального стану клітин кісткової тканини хребта щурів на фоні остеопорозу за умов дії свинцю.
- 2. Установа-розробник:** ДУ «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка НАМН України», 61024, м. Харків, вул. Пушкінська, 80.
- 3. Автор:** Мальцева В.Є.
- 4. Джерело інформації:** стаття
 - 4.1. 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. Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра морфології Медичного інституту Сумського державного університету.
- 6. Форми впровадження:** введено у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії та наукову роботу кафедри морфології.
- 7. Термін впровадження:** січень-березень 2018 року.

Завідувач кафедри морфології
 Медичного інституту
 Сумського державного університету,
 доктор біологічних наук, професор



V.I. Бумейстер

Додаток Б

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Мальцева В.Е. Влияние свинцовой интоксикации на межпозвонковый диск (экспериментальное исследование) / В.Е. Мальцева // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2012. – № 1 (6). – С. 37-41.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Мальцева В.Є. Вплив свинцю на клітини кісткової та хрящової тканин (огляд літератури) / В.Є. Мальцева // Молодий вчений. – 2017. – №7(47). – С. 5-10.
8. 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. (Web of Science).
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.

Апробація результатів дисертації

1. Науково-практична конференція «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології», м. Харків, Україна, 6-7 жовтня 2011 р. (усна доповідь, публікація тез).

2. V Міжнародна конференція молодих учених «Захворювання кістково-м'язевої системи та вік», м. Київ, Україна, 16-17 грудня 2011 р. (усна доповідь).

3. V Міжнародна школа-семінар «Кістково-м'язева система та вік», м. Яремче, Україна, 5-9 лютого 2012 р. (усна доповідь).
4. VI Міжнародна конференція молодих учених «Захворювання кістково-м'язевої системи та вік», м. Київ, Україна, 21-22 лютого 2013 р. (усна доповідь).
5. Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 20-річчю Академії медичних наук, м. Київ, Україна, 5 березня 2013 р. (усна доповідь, публікація тез).
6. Міжнародний науковий симпозіум «Морфогенез органів і тканин під впливом екзогенних факторів», м. Алушта, Україна, 22-23 травня 2013 р. (усна доповідь).99999999
7. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Вікові аспекти захворювання кістково-м'язевої системи», м. Харків, Україна, 10-11 квітня 2014 р. (усна доповідь).
8. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології», м. Харків, Україна, 30-31 жовтня 2014 р. (усна доповідь, публікація тез).
9. VIII Міжнародна школа-семінар «Захворювання кістково-м'язевої системи та вік», м. Яремче, Україна, 10-14 березня 2015 р. (усна доповідь).
10. Науково-практична конференція «Морфологічні дослідження – виклики сучасності», м. Суми, Україна, 22-23 квітня 2015 р. (усна доповідь, публікація тез).
11. World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases, Malaga, Spain, 14-17 April 2016 (публікація тез).
12. Науково-практична конференція «Прикладні аспекти морфології», Тернопіль, Україна, 20-21 жовтня, 2016 (публікація тез).
13. III науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми ортопедії та травматології» (для молодих вчених), с. Сновянка, Чернігівська область, Україна, 11-12 травня 2017 р. (усна доповідь).