



УДК 616.71:617-089.844

ББК 54.548

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В.В. Новочадов, Н.М. Гайфуллин, Д.М. Фролов, А.В. Бачурин

В статье рассмотрены морфологические особенности физиологической регенерации и ремоделирования костной ткани, развивающихся при хронической эндогенной интоксикации в эксперименте у крыс. По мере нарастания сроков опыта показано развитие остеопороза, по ряду признаков более выраженного в модели с преимущественным поражением почек.

Ключевые слова: *кость, эндогенные интоксикации, остеокластическая резорбция, остеоцитарное ремоделирование, остеопороз.*

© Новочадов В.В., Гайфуллин Н.М., Фролов Д.М., Бачурин А.В., 2012

Особенностью костной ткани, как всех опорных тканей организма, является то, что ее основные функциональные свойства во многом определяются наличием высокоспецифичного внеклеточного матрикса. Постоянное обновление (ремоделирование) матрикса кости происходит за счет содружественной деятельности остеобластов, остеоцитов и остеокластов. Соотношение активности этих клеток осуществляется сложным комплексом нервных, иммунных и эндокринных механизмов, на уровне ткани реализующихся целым пакетом биологически активных медиаторов, часть из которых поступает также из прилежащего костного мозга [1; 6; 14].

Множество процессов в организме сопровождаются накоплением эндогенных токсических соединений, негативные последствия избытка которых описываются как эндогенная интоксикация, а при наличии морфологи-

ческих проявлений со стороны органов-мишеней (печени, почек, легких) – как эндотоксикоз [5; 8]. При этом, когда речь идет о меньших концентрациях, не отрицается участие этих же самых веществ в регуляции естественных физиологических процессов [3]. В развитии хронической эндогенной интоксикации (далее – ХЭИ), помимо прямого действия токсинов, гораздо большее участие принимают компоненты вегетативной, эндокринной дисрегуляции и цитокины системного воспалительного ответа [2; 9; 10; 12].

В связи с этим естественно предположить, что длительно существующая эндогенная интоксикация способна напрямую или через описанные системные механизмы влиять на ремоделирование костной ткани. Не исключено, что, наряду с известными гормональными нарушениями, возникающие нарушения ремоделирования могут в итоге привести к формированию системной патологии костной ткани. Проверка этого предположения на настоящем этапе знаний возможна только в эксперименте. Известно, что мета-

близм костной ткани находится в тесной взаимосвязи с функцией почек и может существенно нарушаться при недостаточности их функции [15]. Располагая возможностью моделировать ХЭИ с преимущественным поражением печени или почек, мы решили проверить и эту гипотезу.

Цель работы – установить закономерности физиологической регенерации и ремоделирования костной ткани в условиях хронической эндогенной интоксикации с преимущественным поражением печени или почек как возможного предиктора системного остеопороза.

Материал и методы

Работа была выполнена с использованием 36 белых крыс-самцов массой от 180 г до 240 г, полученных из нелинейных стоков Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Протокол экспериментов соответствовал этическим нормам, изложенным в Международном кодексе медицинской этики (1994), Правилах лабораторной практики (GLP), Хельсинской декларации (2000) и Директивах Европейского сообщества 86/609ЕЕС.

Моделирование ХЭИ с преимущественным поражением печени (серия ГТ) производили по следующей схеме. Ежедневно в течение 5 дней вводили 30 %-й масляный раствор тетрахлорметана из расчета 0,5 мл/кг/сут, на 6-й день эту процедуру заменяли внутрибрюшинным введением липополисахарида (ЛПС) *S. typhimurium* из расчета 0,2 мг/кг массы тела, на 7-й день манипуляций не проводили. При моделировании хронического ЭТ с преимущественным поражением почек (серия НТ) вместо тетрахлорметана использовали внутрибрюшинно 4 %-й раствор гентамицина из расчета 20 мг/кг массы тела по той же схеме [8]. Животных выводили из опыта по 5 особей через 30, 60 и 90 суток от начала ХЭИ передозировкой нембутала (100 мг/кг массы). Шесть крыс, находящихся в период эксперимента в обычных условиях вивария без каких-либо манипуляций, составили контрольную группу.

Костные фрагменты фиксировали в 10 % забуференном нейтральном формалине в течение 24 часов, промывали 6 часов в проточной водопроводной воде комнатной тем-

пературы. Декальцинацию проводили в аналоге коммерческого препарата «Cal-Ex®» (Fisher Scientific), который представлял собой водный раствор 1,35 N соляной кислоты и 0,003 M ЭДТА, полная декальцинация наступала через 15–20 часов. Промывкой в проточной воде до нейтральной реакции промывочных вод добивались полной отмытки материала от декальцинирующей жидкости. После быстрой проводки материала по спиртам и полного обезвоживания (последний – через ксилол) заключали его в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином, трехцветным методом по Массону, пикрофуксином по ван Гизону [4; 13, с. 210–211].

Для видеодокументирования, качественного и количественного анализа микропрепаратов использовали аппаратно-компьютерный комплекс «Видеотест-Морфо» 3.0 (Россия). Фотосъемка части препаратов проведена на микроскопе Micros (Германия) с фотокамерой Рихера (Япония). Морфометрический анализ проводили с применением программного обеспечения Image J (США).

С целью верификации развития хронического ЭТ аналогичным образом изготавливали гистологические препараты печени, почек и легких. При этом исключали процедуру декальцинации, а срезы окрашивали только гематоксилином и эозином, а также по ван Гизону. Поскольку основными морфологическими критериями повреждения внутренних органов при ХЭИ являются снижение объема паренхимы и увеличение доли соединительной ткани [8], в качестве количественных показателей в печени определяли объемные доли (далее – ОД, %) гепатоцитов и соединительной ткани, усредненные по трем зонам ацинуса. В почках определяли мочевое пространство как отношение общей площади клубочка к площади капилляров клубочка, канальцевый индекс (отношение толщины стенки канальца к диаметру его просвета) и ОД соединительной ткани. В легких рассчитывали ОД воздуха альвеол и соединительной ткани. Морфометрия костной ткани включала в себя определение толщины кортикального слоя кости (в мкм), средней толщины костных trabecul (в мкм), ОД губчатой кости и их соединительной плотности (1/мм³).

Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение тканевой экспрессии трех маркеров. Для выявления пролиферативной активности использовали поликлональные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA, DakoCytomation, Дания). Процент иммунопозитивных клеток обозначали как пролиферативный индекс. Для выявления остеокластов использовали моноклональные тела к CD-68, для выявления клеток остеогенного ряда – к остеоонектину (наборы Novocastra, Великобритания); подсчитывали численную плотность этих клеток в костной ткани, результаты выражали в $1/\mu\text{м}^3$. Все этапы исследования проводили в соответствии с протоколами производителей, используя вариант микроволновой температурной демаскировки антигенов, использовали позитивные и негативные контроли антигенов, а также негативные контроли антител.

Обработку количественных данных проводили непосредственно из общей матрицы данных Excel 7.0 (Microsoft, USA) с привлечением

возможностей программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) с учетом общепринятых требований для медико-биологических исследований. Для анализа различий между выборками использовали критерий Манна-Уитни [7].

Результаты и их обсуждение

Морфологическим доказательством наличия хронического ЭТ являлись признаки прогрессирующего повреждения печени и почек с развитием в них соответствующих компенсаторных процессов: хронического гепатита и гепатофиброза, дисметаболической нефропатии и нефросклероза, хронического склерозирующего альвеолита и пневмосклероза. Количественные признаки этих поражений свидетельствовали о том, что изменения нарастали с 30-х по 90-е сутки эксперимента. В печени они были более яркими в модели с использованием тетрахлорметана, в почках – при использовании гентамицина, в легких – практически не отличались в этих моделях (см. табл. 1).

Таблица 1

Количественные морфологические показатели повреждения органов-мишеней при хронической эндогенной интоксикации у крыс ($M \pm m$)

Показатель	Группа	Контроль	Сроки эксперимента		
			30 суток	60 суток	90 суток
Печень					
Объемная доля гепатоцитов, %	ГТ	78,8±2,3	73,3±2,5	70,1±3,2 *	62,2±2,0 *
	НТ		76,2±3,0	74,3±3,7	68,2±2,2 *#
Объемная доля соединительной ткани, %	ГТ	2,91±0,09	3,91±0,17 *	5,14±0,24 *	6,73±0,25 *
	НТ		3,45±0,15 *#	4,08±0,18 *#	5,37±0,22 *#
Почки					
Мочевое пространство	ГТ	1,53±0,08	1,35±0,11	1,27±0,09 *	1,23±0,08 *
	НТ		1,24±0,10 *	1,18±0,07 *	1,15±0,06 *
Канальцевый индекс	ГТ	0,82±0,06	1,45±0,14 *	1,26±0,10 *	0,75±0,07
	НТ		1,84±0,16 *#	0,62±0,05 *#	0,55±0,05 *#
Объемная доля соединительной ткани, %	ГТ	7,2±0,4	8,3±0,7	12,5±1,1 *	13,8±1,2 *
	НТ		10,1±0,9 *	16,8±1,5 *#	18,0±1,6 *#
Легкие					
Объемная доля воздуха альвеол, %	ГТ	60,1±1,6	48,2±1,9 *	41,9±2,6 *	38,5±2,2 *
	НТ		51,5±2,2 *	47,8±2,5 *#	45,3±2,7 *#
Объемная доля соединительной ткани, %	ГТ	2,8±0,2	12,1±0,6 *	14,5±0,8 *	16,2±1,3 *
	НТ		9,1±0,5 *#	11,0±0,6 *#	12,8±1,1 *#

Примечание. В таблице использованы следующие обозначения: * – достоверные различия с величиной показателя в контрольной группе; # – достоверные различия между показателями в группах ГТ и НТ.

При обнажении бедренной кости интактных крыс и животных на 30–60-е сутки эндогенной интоксикации макроскопически она представляла собой белесоватую однородную структуру с относительно гладкой поверхностью. Каких-либо дефектов на поверхности не обнаруживали. Прочность ткани требовала значительных усилий при выделении кусочка для гистологического исследования. На 90-е сутки ХЭИ обращали внимание на появление сероватой окраски ткани, а при отделении кусочка она выглядела механически менее прочной.

При микроскопическом исследовании костная ткань на 30-е сутки ХЭИ имела обычную надкостницу и плотную костную пластинку, но в губчатой кости выявлялось умеренное уменьшение плотности костных балок без нарушений трехмерной их организации. У части костных балок выявлялись признаки интенсивного remodelирования в виде появления групп остеокластов и признаков остеокластической резорбции матрикса, а также цепочек остеобластов по краям балок.

На 60-е сутки эксперимента отчетливо уменьшалась толщина кортикальной пластинки, параллельно увеличивались размеры лакун губчатой кости. Интенсивное моделирование губчатой кости приобретало диффузный характер с максимальной выраженностью вблизи эпифизов, то есть в наиболее на-

гружаемых участках кости. К 90-м суткам ХЭИ можно было говорить об истинных признаках остеопороза. Истончение кортикальной пластинки и балок в губчатой кости по-прежнему сочеталось с высокой активностью остеокластической резорбции матрикса и признаками остеоцитарного remodelирования. На поздних сроках опыта было отчетливо заметно присутствие относительно большого количества микроциркуляторных элементов в составе лакун (местами – с явлениями ангиоматоза). В отдельных участках кости выявлялись небольшие очаги истинной деминерализации с признаками фиброхрящевого матрикса.

При окраске по ван Гизону среди костных балок начиная с 30-х суток ХЭИ выявляли прирост соединительнотканых элементов, к 90-м суткам – с формированием мелких очагов истинной соединительной ткани. Территориально они располагались ближе к эпифизам и были соединены с надкостницей. При окраске по трихром Масону выявлялся грубоволокнистый характер данной соединительной ткани и ее относительная зрелость. Каких-либо признаков активного воспаления в костной ткани при моделировании ХЭИ не обнаруживалось.

Данные морфометрии костной ткани приведены в таблице 2.

Таблица 2

Количественные морфологические показатели костной ткани крыс при хронической эндогенной интоксикации (M ± m)

Показатель	Группа	Контроль	Сроки эксперимента		
			30 суток	60 суток	90 суток
Толщина кортикального слоя кости, мкм	ГТ	1237±79	1250±81,5	1027±76,8 *	882±69,3 *
	НТ		1223±80,4	982±74,3 *	824±68,6 *
Объемная доля губчатой кости, %	ГТ	46,1±2,7	43,9±3,1	36,2±2,6 *	27,3±1,8 *
	НТ		46,8±3,5	31,4±2,4 *	24,8±1,7 *
Толщина костных трабекул, мкм	ГТ	272±13,0	259±13,6	227±12,5 *	184±10,3 *
	НТ		267±14,1	216±12,3 *	171±9,9 *
Соединительная плотность, 1/мм ³	ГТ	2,41±0,16	2,23±0,15	1,97±0,12 *	1,79±0,10 *
	НТ		2,15±0,13	1,84±0,10 *	1,72±0,08 *
PCNA-позитивные клетки, %	ГТ	3,74±0,26	5,50±0,32 *	3,42±0,23	2,10±0,16 *
	НТ		5,37±0,33 *	3,16±0,21	2,33±0,18 *
Остеоциты и остеобласты, 1/мм ³	ГТ	3740±195	7622±339 *	4224±205	2927±172 *
	НТ		7134±314 *	3021±178 *#	2263±155 *#
Остеокласты, 1/мм ³	ГТ	456±27,3	872±50,4 *	850±53,5 *	843±51,6 *
	НТ		865±52,0 *	862±50,7 *	829±48,5 *

Примечание. В таблице использованы следующие обозначения: * – достоверные различия с величиной показателя в контрольной группе; # – достоверные различия между показателями в группах ГТ и НТ.

При количественном исследовании было показано, что развитие ХЭИ сопровождается достоверным уменьшением толщины кортикальной пластинки кости, костных трабекул, объемной доли губчатой кости, а также соединительной плотности костных балок начиная с 60-х суток опыта. Эти изменения нарастают к 90-м суткам ХЭИ. В сравнении с величинами показателями у интактных животных толщина кортикальной пластинки уменьшается в 1,40–1,50 раза; толщина костных трабекул – в 1,69–1,86 раза; ОД губчатой кости – 1,48–1,59 раза; соединительная плотность костных балок – в 1,35–1,40 раза (все $P < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о развитии в костной ткани явлений остеопороза. При тенденции к более глубоким изменениям в группе НТ достоверных различий в динамике этих показателей между группами не выявлено. Процент PCNA-позитивных клеток в костной ткани возрастал к 30-м суткам эксперимента в 1,43–1,47 раза ($P < 0,05$), а затем прогрессивно снижался и был к 90-м суткам ХЭИ в 1,61–1,78 раза меньше величин показателя у ин-

тактных животных ($P < 0,01$). Полученные данные свидетельствуют о фазовом изменении пролиферативного потенциала клеток в костной ткани по мере развития хронического ЭТ. Различий между группами ГТ и НТ в динамике пролиферативной активности клеток также не выявлено (см. рис. 1).

Численная плотность остеобластов и остеоцитов увеличивалась к 30-м суткам ХЭИ более чем вдвое, а затем прогрессивно, так что к 90-м суткам эксперимента она была в группе ГТ в 1,28 раза меньше, а в группе НТ – в 1,65 раза меньше величин у интактных животных ($P < 0,05$ между группами). В противовес этому число остеокластов в костной ткани было повышенным в обеих группах на всех сроках эксперимента в 1,82–1,91 раза (все $P < 0,01$). Полученные количественные данные убедительно свидетельствуют о том, что при ХЭИ на фоне общего увеличения активности процессов ремоделирования происходит дисбаланс его составляющих: уменьшение остеосинтетического потенциала ткани и увеличение остеорезорбтивного потенциала.

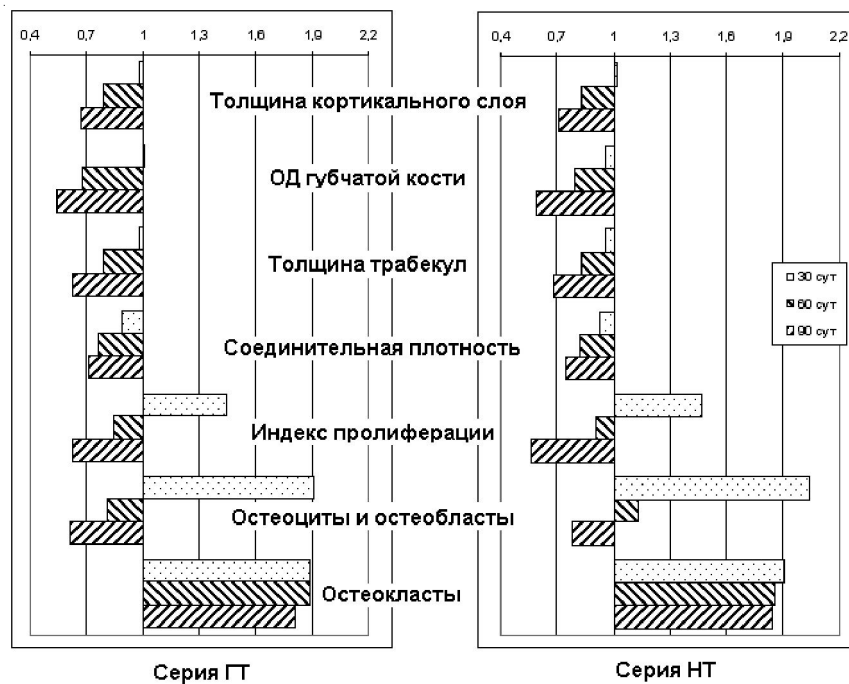


Рис. 1. Относительные изменения количественных показателей морфологии костной ткани крыс при хронической эндогенной интоксикации в моделях с преимущественным поражением печени и почек (за 1 приняты значения в контрольной группе)

Как известно из данных научной литературы, процесс физиологической регенерации (ремоделирования) костной ткани при изменении условий ее функционирования идет с участием нескольких процессов, за каждый из которых отвечает специализированная клеточная популяция [1; 14]. Остеокласты и макрофаги в большей степени обеспечивают остеорезорбцию, остеобласты в большей степени отвечают за новообразование матрикса кости (органического и минерального), остециты и покровные клетки – соответственно, за поддержание гомеостаза в уже сформированных остеонах и кортикальной пластинке. Вне значительного повреждения, как

это было в наших исследованиях, следует говорить о преобладании одного из этих процессов, тогда как в случае репаративной регенерации можно выделить соответствующие фазы: активации (резорбтивную), реверсии и остеогенеза (синтетическую) [1]. На основании совмещения методов классической морфологии и количественных методов имидж-анализа нами было показано, что в условиях ХЭИ наблюдается преобладание остеорезорбции над остеогенезом, в результате чего в течение 90 суток в кости постепенно убывает объем минерального и органического матрикса и развивается остеопороз (см. рис. 2).

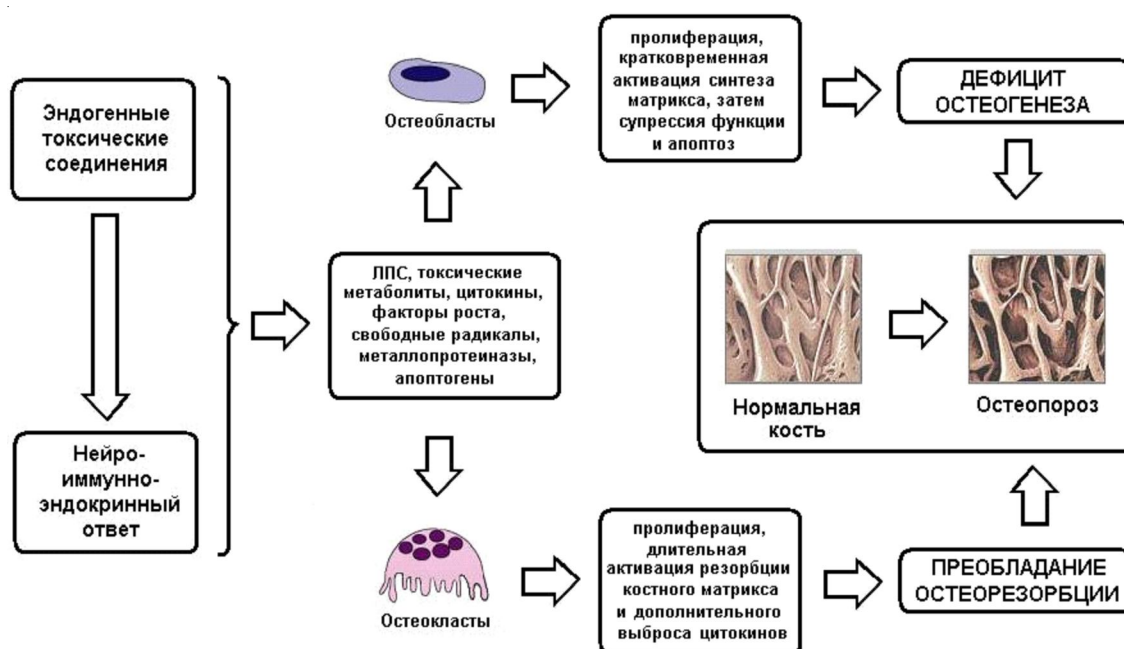


Рис. 2. Гипотетическая схема развития остеопороза при хронической эндогенной интоксикации

Предложенная схема требует проверки в биохимических и молекулярно-генетических исследованиях, которые позволят выявить основных участников межклеточных взаимодействий и метаболических событий в этой высокоспециализированной ткани в условиях хронической эндогенной интоксикации.

Заключение

Хроническая эндогенная интоксикация приводит к нарушениям естественной регенерации костной ткани, в результате кото-

рых вначале увеличивается, а затем значительно снижается регенераторный потенциал клеток, наблюдается преобладание процессов резорбции костного матрикса над его ресинтезом, так что к 90-м суткам в эксперименте у крыс формируется умеренно выраженный остеопороз. Для ХЭИ с преимущественным поражением почек (вероятно, за счет механизма подавления остеогенеза) по ряду показателей характерны более глубокие нарушения ремоделирования кости, чем при ХЭИ с преимущественным поражением печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аврунин, А. С. Остеоцитарное ремоделирование костной ткани: история вопроса, морфологические маркеры / А. С. Аврунин, Р. М. Тихилов // Морфология. – 2011. – № 1. – С. 86–94.

2. Индивидуальные различия органов-мишеней и иммунной системы при экспериментальном эндотоксикозе / О.В. Макарова [и др.] // Архив патологии. – 2009. – № 4. – С. 37–42.

3. Кишечный эндотоксин как универсальный фактор адаптации и патогенеза общего адаптационного синдрома / И. А. Аниховская [и др.] // Физиология человека. – 2006. – Т. 32, № 2. – С. 87–91.

4. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 95 с.

5. Косырева, А. М. Половые различия реакции иммунной системы и легких при экспериментальном остром эндотоксикозе / А. М. Косырева, Е. Ю. Симонова, О. В. Макарова // Бюл. экспер. биол. и медицины. – 2012. – Т. 153, № 3. – С. 318–321.

6. Лычкова, А. Э. Нервная регуляция метаболизма костной ткани / А. Э. Лычкова // Вестник РАМН. – 2011. – № 3. – С. 42–47.

7. Новиков, Д. А. Статистические методы в экспериментальной биологии и медицине / Д. А. Новиков, В. В. Новочадов. – Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2005. – 84 с.

8. Писарев, В. Б. Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога / В. Б. Писарев, Н. В. Богомоло-

ва, В. В. Новочадов. – Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2008. – 320 с.

9. Полякова, Л. В. Морфологическая характеристика эндокринных органов при хронической эндогенной интоксикации / Л. В. Полякова, С. А. Калашникова, А. И. Щеголев // Бюл. экспер. биол. и медицины. – 2011. – Т. 151, № 2. – С. 211–214.

10. Тиреоидная модуляция ФНО-зависимого апоптоза и формирование хронической патологии печени при эндогенной интоксикации у крыс / С. А. Калашникова [и др.] // Бюл. экспер. биол. и медицины. – 2009. – Т. 147, № 2. – С. 201–206.

11. Contribution of mineral to bone structural behavior and tissue mechanical properties / E. Donnelly [et al.] // Calcif. Tissue Int. – 2010. – Vol. 87, № 5. – P. 450–460.

12. Dexamethasone attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by downregulating glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand in Kupffer cells / S. D. Wei [et al.] // Hepatol. Res. – 2011. – Vol. 41, № 10. – P. 989–999.

13. Handbook of histology methods for bone and cartilage / ed. by Y. H. An, K. L. Martin. – N. Y. : Humana Press, 2003. – 587 p.

14. Microstructure and nanomechanical properties in osteons relate to tissue and animal age / J. Burket [et al.] // J. Biomech. – 2011. – Vol. 44, № 2. – P. 277–284.

15. The relationship between adipokines, osteocalcin and bone quality in chronic kidney disease / J. Bacchetta [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2009. – Vol. 24, № 10. – P. 3120–3125.

THE BONE REMODELING IN THE CONDITIONS OF ENDOGENOUS INTOXICATION

V.V. Novochadov, N.M. Gaifullin, D.M. Frolov, A.V. Bachurin

The article describes the morphological peculiarities of physiological regeneration and bone remodeling due to chronic endogenous intoxication been developed in rats. The level of osteoporosis arose as the terms of the experience, for a number of features it was more pronounced in the model with a preferable lesion of the kidneys.

Key words: *bone, endogenous intoxication, osteoclastic resorption, osteocytic remodeling, osteoporosis.*