

Гордієнко О. В. Мікроскопічна оцінка будови регенерату губчастої кістки статевозрілих щурів за умов загального зневоднення організму / О. В. Гордієнко // Вісник проблем біології і медицини. - 2016. - Вип. 2(2). - С. 46-52.

МІКРОСКОПІЧНА ОЦІНКА БУДОВИ РЕГЕНЕРАТУ ГУБЧАСТОЇ КІСТКИ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЗАГАЛЬНОГО ЗНЕВОДНЕННЯ ОРГАНІЗМУ

Гордієнко О.В., аспірант

*Сумський Державний Університет, кафедра нормальної анатомії людини
(м. Суми)*

Резюме. В роботі проведено вивчення мікроскопічної будови регенерату губчастої кістки у статевозрілих щурів за умов загального зневоднення організму легкого, середнього та важкого ступенів. Отримані данні свідчать про сповільнення формування кісткового мозоля, що виявляється у затримці формування тканино-специфічних структур регенерату. Виявлені зміни мають пряму залежність від ступеня порушення водно-сольового балансу.

Ключові слова: губчаста кісткова тканина, репаративний остеогенез, дегідратація, морфометрія.

Актуальність. Проблема травматизації кісток скелета є однією з актуальних в експериментальній і клінічній травматології та ортопедії. Незважаючи на те, що при репаративному остеогенезі є передумови до повного відновлення кісткових структур замість втрачених, відсоток ускладнень після травматичних ушкоджень залишається досить високим. Це викликає необхідність розроблення нових експериментально-теоретичних підходів до питань регенерації кістки, які передбачають з'ясування біологічних механізмів, що лежать в основі процесу хемотаксису і диференціювання клітин у ділянці травматичного

ушкодження, вивчення формування складних клітинних і тканинних компонентів регенерату, умов, за яких це відбувається, і факторів, які керують остеорепарацією.

Вживання води є життєвою необхідністю для більшості наземних видів живих істот, але для підтримки сталості внутрішнього середовища необхідні реакції, що реалізують фізіологічні стимули під впливом чинників зовнішнього середовища [Гоженко А.І., 2013]. Еволюція вищих організмів рухалась шляхом забезпечення постійності внутрішнього середовища у зовнішніх умовах, які безперервно змінювались [Кассиль Г.Н., 1983]. Кістка забезпечує підтримання водно-сольового гомеостазу в організмі. Зміна внутрішнього і зовнішнього середовища суттєво відображається на кістках скелету. Зневоднення організму є фактором, який впливає на будову кісток. Вода забезпечує обмін і дисоціацію електролітів, звільняє іони, які переносять електричні заряди, і без неї ці процеси стають неможливі. Крім того кісткова тканина являє собою складний композитний матеріал, що складається з органічної та мінеральної фази, співвідношення яких впливають на структуру та функцію органу. У цій структурі міститься 70% вільної води, 30% знаходиться у зв'язаному стані з органічними і мінеральними складовими. Виконуючи транспортну функцію, вона забезпечує не тільки іонний обмін між кристалами, а й певну кристалічну структуру біоматеріалу, створює його неапатитне оточення – гідратний шар. Кількісні зміни води в організмі можуть впливати на ступінь мінералізації кальцієвмісного матриксу. Особливо від нестачі води страждають губчасті кістки, вологість яких складає до 20% (пластинчасті – 10%).

В динаміці аліментарної дегідратації має місце певна послідовність. Елімінація води починається з міжклітинної рідини, спочатку витрачається резерв найбільш лабільних ланцюгів, які легко можуть поповнюватися.

Потім дегідратація охоплює кровоносні та лімфатичні ланцюги судинного русла. На сублетальних етапах у зневоднених тварин спостерігається масивна втрата клітинної води. В цьому полягає біологічна доцільність такої динаміки. Адже життя і функція клітин залежить від рівня гідrataції плазми.

Порушення водно-електролітного балансу супроводжує багато патологічних станів організму, а також може мати місце внаслідок водної депривації. Сьогодні, коли напруженість дії зовнішніх факторів невпинно зростає, проблема пристосувально-компесаторних та деструктивних процесів у тканинах і органах в умовах порушення водно-сольового обміну є особливо актуальною.

Мета дослідження. Визначення морфофункціональних особливостей формування регенерату губчастої кістки за умов загального зневоднення організму різного ступеня в аспекті порівняльного мікроаналіза репаративного остеогенезу .

Методи дослідження. Для постановки експерименту ми користувались моделлю загальної дегідратації за А.Д.Соболевою. За показником водного дефіциту розрізняють три ступеня дегідратації: легкий (дефіцит води досягає 2-5%), середній (5-10%), важкий (більше 10%). В експеримент вводили 24 щура-самця 9-ти місячного віку, 6 щурів слугували контролем. Тварини утримувались на повністю безводній дієті. В якості їжі вони отримували гранульований комбікорм. Решта тварин розбили на 3 групи. У першій групі моделювався легкий ступень зневоднення, який досягався за 3 дні; у другій групі моделювався середній ступень дегідратації, який досягався протягом 6-7 днів експерименту; третя група, де моделювався сублетальний ступень зневоднення, що досягався протягом 10-12 днів експерименту.

Після досягнення відповідного ступеню загальної дегідратації

тваринам під загальною анестезією стоматологічним бором діаметром 1 мм наносився дефект з медіального боку п'яткової кістки. Щурів виводили з експерименту на 3, 15 та 24 добу після травми, що відповідає основним стадіям репаративного остеогенезу за Н.А.Корж, Н.В.Дедух, і переводили на звичайний питний раціон.

По завершенні терміну досліду проводили декапітацію щурів під кетаміновим наркозом та забирали у них п'яткові кістки. Усі маніпуляції на тваринах виконували у відповідності з правилами Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментах та інших наукових цілях. Готували гістологічні зрізи кісткового мозоля за загальноприйнятою методикою та забарвлювали їх гематоксилін-еозіном і за Романовським-Гімзе. Отримані препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа "Olimpus". Через 3 дні після нанесення дефекту вивчався клітинний склад регенерату у вигляді окремих популяцій клітин. Проводився підрахунок фібробластів, макрофагів, лімфоцитів, плазмоцитів, нейтрофілів та малодиференційованих клітин.

У гістологічних препаратах, отриманих у подальші терміни репаративного остеогенезу, проводилось визначення відсоткового вмісту грануляційної, фіброретикулярної, грубоволокнистої, пластинчастої кісткової тканини. Здійснювалось вимірювання товщини кісткових трабекул на периферії та у центральній ділянці дефекту.

Результати та їх обговорення. Мікроскопічна характеристика регенерату п'яткової кістки контрольної групи на першій стадії репаративного остеогенезу характеризується мозаїчною картиною стану клітинних і тканинних елементів. Гематома фрагментується на ділянки, між якими знаходився кістковий мозок. Підсилюється васкуляризація періостальної частини кістки, яка обумовлена активним ростом і новоутворенням судин. У періостальній фіброретикулярній тканині

починається формування кісткових балочок. Клітини, які складають проліферат окістя, мають частково фібробластоподібний, частково остеобластоподібний вигляд. В ендостальній зоні, порівняно з періостальною виявляється, більш тонкий шар проліферуючих елементів, який також дещо потовщений по лінії ушкодження.

У зоні ушкодження п'яткової кістки щурів, яким моделювався легкий ступень зневоднення, у перший термін дослідження спостерігаються залишки гематоми, площа якої аналогічна контрольній групі тварин. Ділянка дефекту заповнена клітинами, серед яких переважають фібробласти, які перебувають у стадії активного синтезу міжклітинної речовини, що формує прошарки фіброретикулярної тканини. Найбільш суттєві зміни відбуваються з нейтрофілами, що свідчить про інтенсивність фагоцитарного процесу після ушкодження, їх кількість зростає в порівнянні з контролем (Рис.1). По периферії дефекту починають формуватися капіляри синусоїдного типу

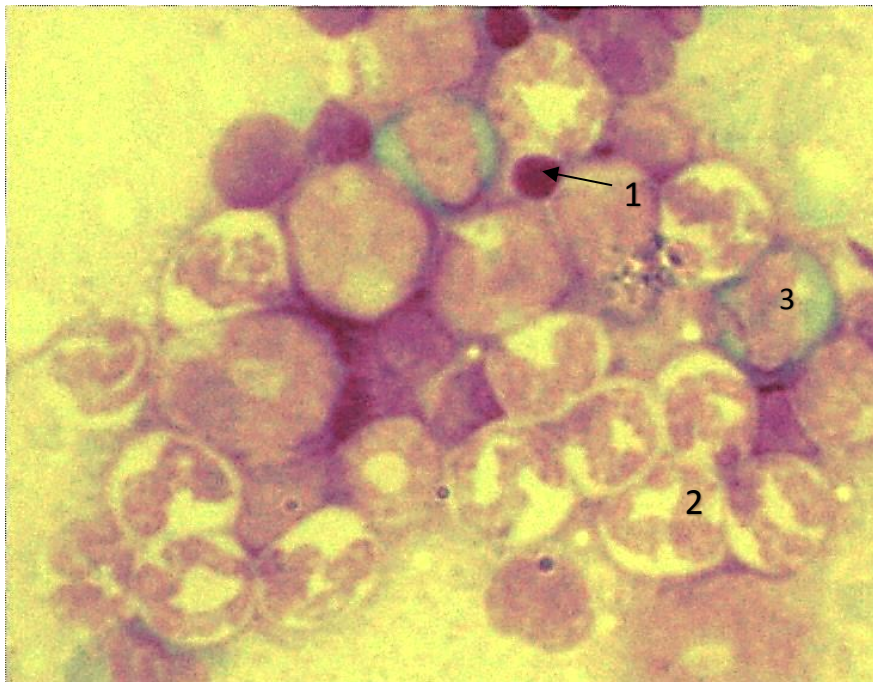


Рис.1. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов легкого

ступеня загального зневоднення на 3 добу після нанесення травми. Забарвлення за Романовським-Гімзе. Zoomx 1000. 1. Еритроцит. 2. Нейтрофил. 3. Лімфоцит.

Кількісний склад регенерату у цей термін становить: фібробластів- $28,64 \pm 0,24\%$, лімфоцитів- $22,30 \pm 0,26\%$, макрофагів- $11,92 \pm 0,23\%$ та нейтрофілів- $12,72 \pm 0,47\%$.

У цей самий час в умовах впливу середнього ступеня зневоднення більша частина дефекту теж виповнена кров'яним згустком. Молода грануляційна тканина, площа якої зменшена в порівнянні з контролем, містить велику кількість тонкостінних капілярів та клітин, які за складом не відрізняється від регенерату контрольної групи (Рис.2).

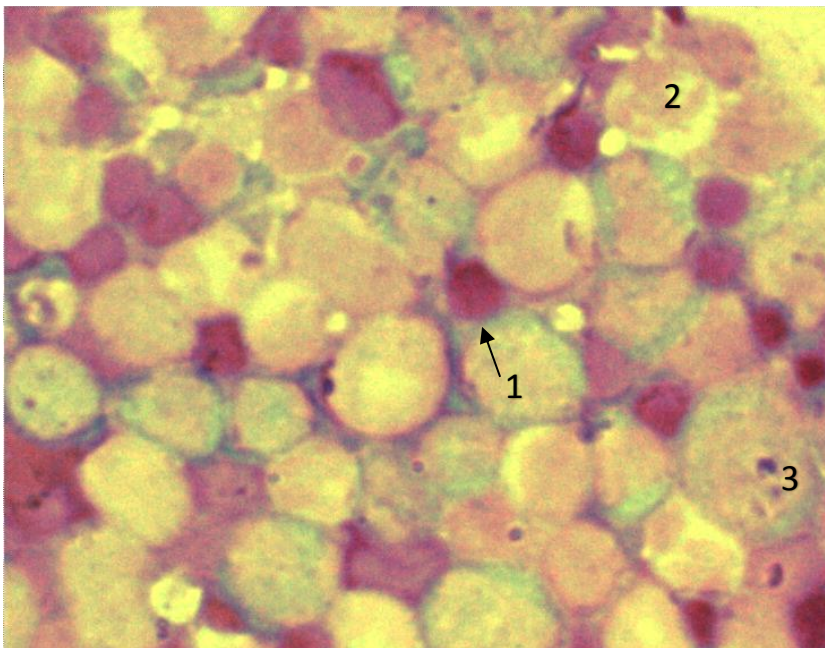


Рис.2. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов середнього ступеня загального зневоднення організму на 3 добу після нанесення травми. Забарвлення за Романовським-Гімзе. Zoomx1000. 1. Еритроцит. 2. Нейтрофіл. 3. Лімфоцит.

Співвідношення клітинного складу гематоми в відсотковому відношенні зменшується в порівнянні з контролем: на 11.65% - фібробластів, на 5.59% - лімфоцитів, на 14.79% - макрофагів. Кількість нейтрофілів навпаки збільшена майже вдвічі.

При важкому ступені зневоднення в першій стадії регенерації спостерігаються більш суттєві зміни. В центрі дефекту спостерігається велика кількість еритроцитів та лімфоцитів. Відбувається уповільнення процесу резорбції посттравматичної гематоми і формування грануляційної тканини. Зменшується кількість секретуючих фібробластів, що веде до уповільнення розвитку фіброретикулярної тканини (Рис.3).

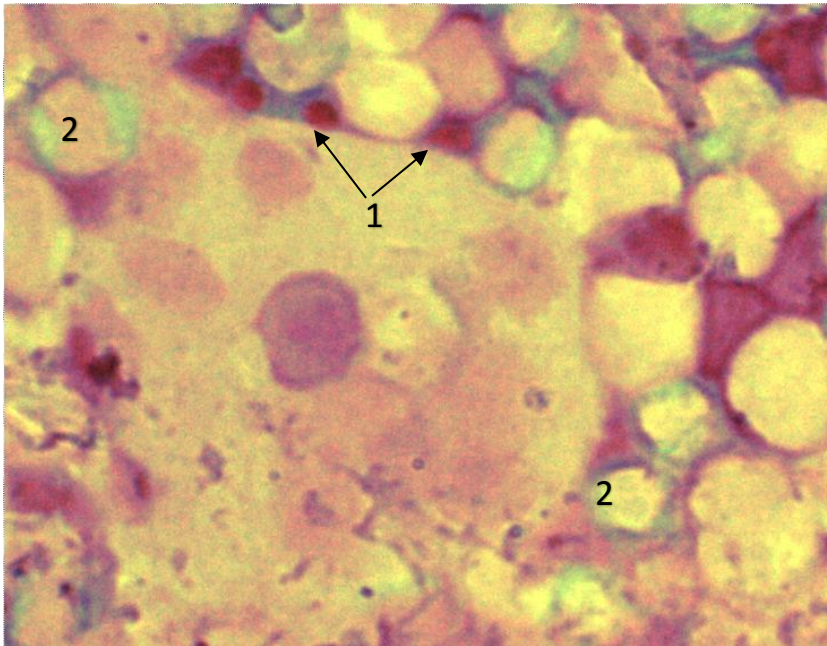


Рис.3. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов важкого ступеню загального зневоднення на 3 добу після нанесення травми. Зabarвлення за Романовським – Гимзе . Zoomx 1000. 1.Еритроцит. 2. Нейтрофіл. 3.Лімфоцит.

Кількісний склад клітин в порівнянні з контролем також суттєво зменшується (Рис.4). Це говорить про вплив ступеня зневоднення.

Зменшуються щільність фібробластів - на 21.35%, лімфоцитів – на 9,84%, макрофагів – на 25,69%. Але зростає кількість нейтрофілів, що можливо пов'язано по- перше з вмістом кісткового мозку в губчастій кістці, а по - друге з запальним процесом, який характерний при цих термінах.

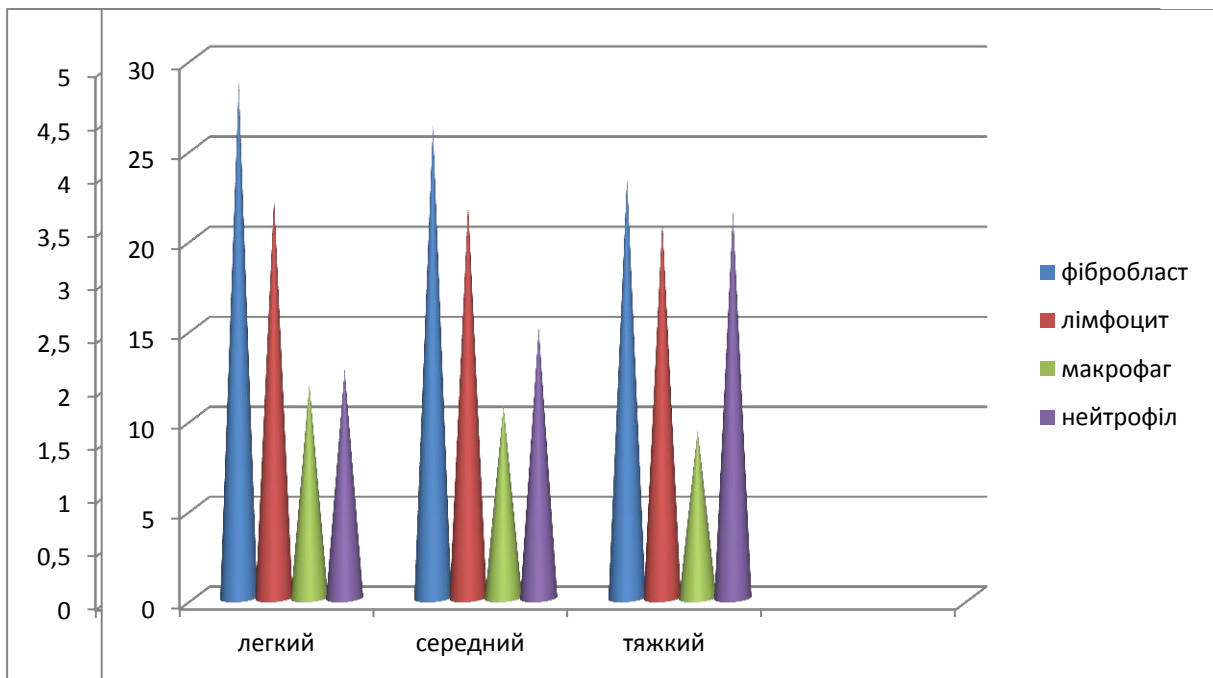


Рис. 4. Відсоткове співвідношення клітинного складу регенерату п'яткової кістки статевозрілих щурів при різних ступенях зневоднення.

Таким чином, залежно від ступеня дегідратації, тією чи іншою мірою, спостерігається затримка запальної реакції за рахунок зменшення протизапальних клітин, а потім резорбції гематоми та формування грануляційної тканини.

На 15-ту добу після травми за умов легкого ступеню дегідратації зона дефекту представлена здебільшого фіброретикулярною та грубоволокнистою кістковими тканинами, на поверхні яких знижена кількість остеобластів. Останні утворюють великопетлясті кісткові

трабекули, які заповнюють зону дефекту (Рис5). Забарвлюються новоутворені трабекули менш інтенсивно, ніж материнська кістка, та нерівномірно, що свідчить про початок осифікації та її гетеротопічність. Товщина і зрілість кісткових балок порівняно з контролем зменшені. Кількість витончених трабекул збільшується з наростанням ступеня зневоднення, це більш виражено у центральних ділянках регенерату, що свідчить про порушення васкуляризації цих відділів та зменшення активності остеогенних клітин. При середньому ступені дегідратації спостерігається (Рис.6) збільшення лакунарного простору, за рахунок звуження остеобластів в балках грубоволокнистої кісткової тканини. При тяжкому ступені зневоднення (Рис. 7) простежується тенденція збільшення лакунарного простору з затримкою термінів репаративного остеогенеза, що проявляється у зменшенні кількості сформованих балок грубоволокнистої тканини.

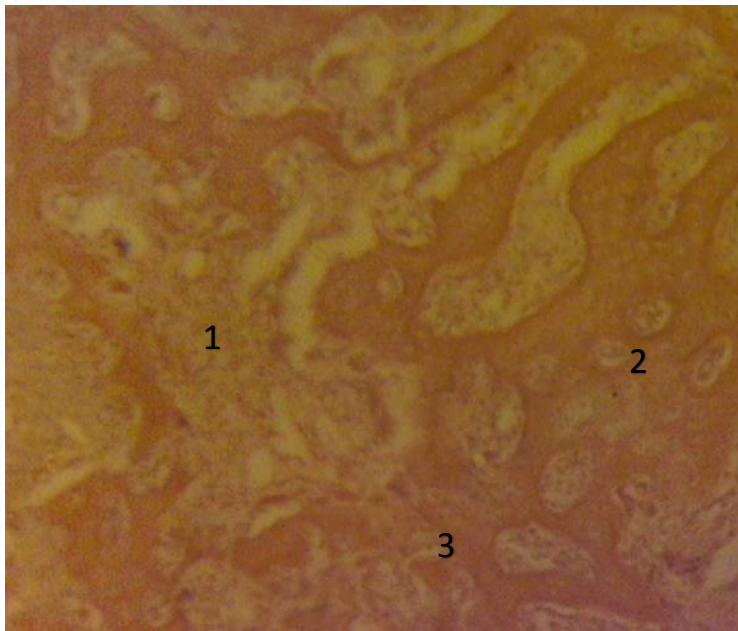


Рис. 5. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов легкого ступеня загального зневоднення на 15 добу після нанесення травми. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoomx100. 1. Фібозна тканина. 2.

Хондробласти. 3. Грубоволокниста кісткова тканина.

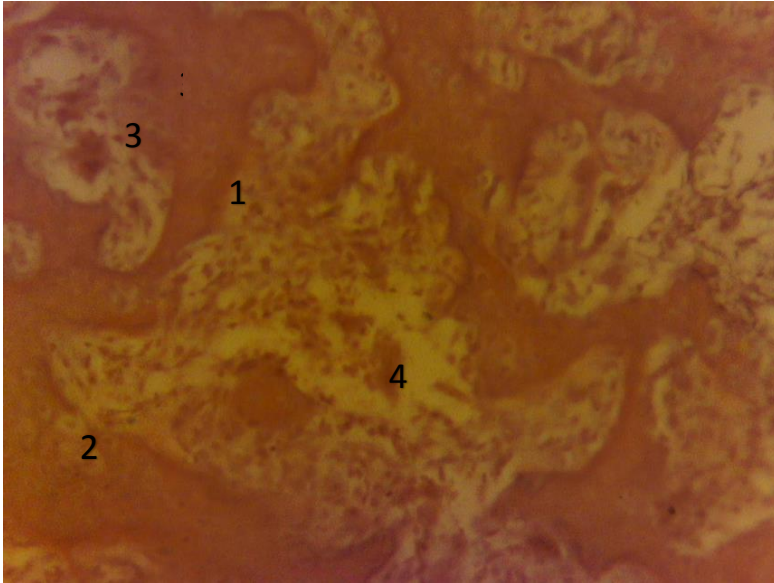


Рис. 6. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов середнього ступеня загального зневоднення на 15 добу після нанесення травми. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoomx100. 1. Фібозна тканина. 2. Хондробласти. 3. Грубоволокниста кісткова тканина. 4. Залишки грануляційної тканини.

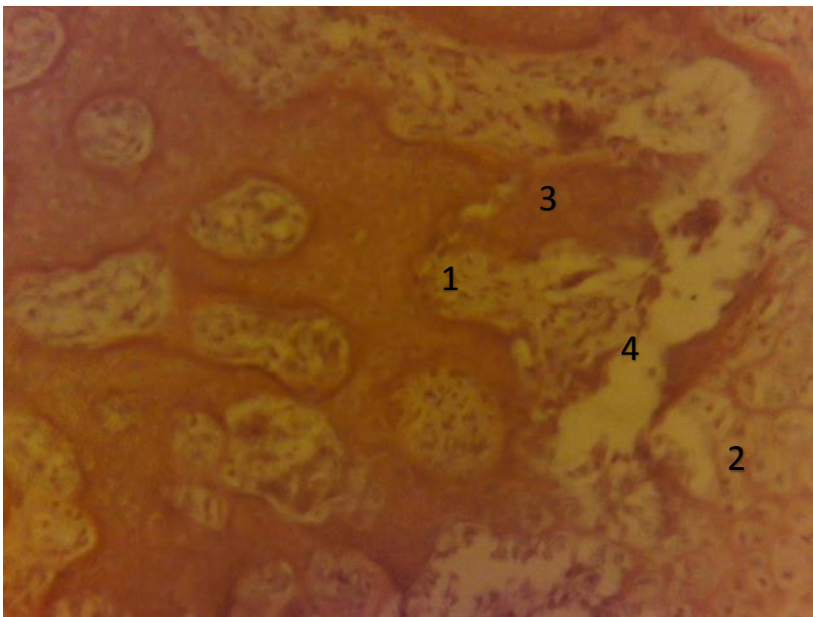


Рис. 7. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов важкого ступеня загального зневоднення на 15 добу після нанесення травми. Забарвлення гематоксилін-еозин. $\times 100$. 1. Фібозна тканина. 2. Хондробласти. 3. Грубоволокниста кісткова тканина. 4. Залишки грануляційної тканини.

Таким чином, на 15 добу спостереження при середньому і важкому ступенях зневоднення виявлені залишки грануляційної тканини, чого не спостерігалось у тварин з легким ступеням зневоднення. Це свідчить про затримку репаративного остеогенезу, що в подальшому негативно впливатиме на формування повноцінного кісткового мозоля.

Через 24 доби після перелому кістковий мозоль експериментальних тварин при легкому ступені дегідратації майже не відрізняється від контролю (Рис.8). Основним морфологічним субстратом кортикальної пластинки є вже губчаста кісткова тканина, хоча її менше порівняно з контролем. Від материнської кістки вона відрізняється більшою кількістю остеоцетарних лакун. У цей термін при середньому (Рис.9) та важкому ступенях загального зневоднення спостерігається затримка процесів репарації, як морфологічно подібно до останнього терміну остеогенезу контрольної групи тварин. Регенерат виповнений великопетлястими трабекулами грубоволокнистої кістки, між якими знаходяться залишки фіброретикулярної тканини та кісткового мозку. Кількість остеогенних клітин на поверхні трабекул менше за контроль, інтенсивність їх забарвлення нижча та неоднорідна. На межі з материнською кісткою помітні місця розривів, місточки з кісткових трабекул та лінії склеювання неоднорідної товщини, подекуди відмічаються остеокластичні лакуни, особливо при сублетальному ступені дегідрії (Рис.10).



Рис. 8. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов легкого ступеня загального зневоднення на 24 добу після нанесення травми. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoomx200. Грубоволокниста кісткова тканина. 2. Хондробласти.

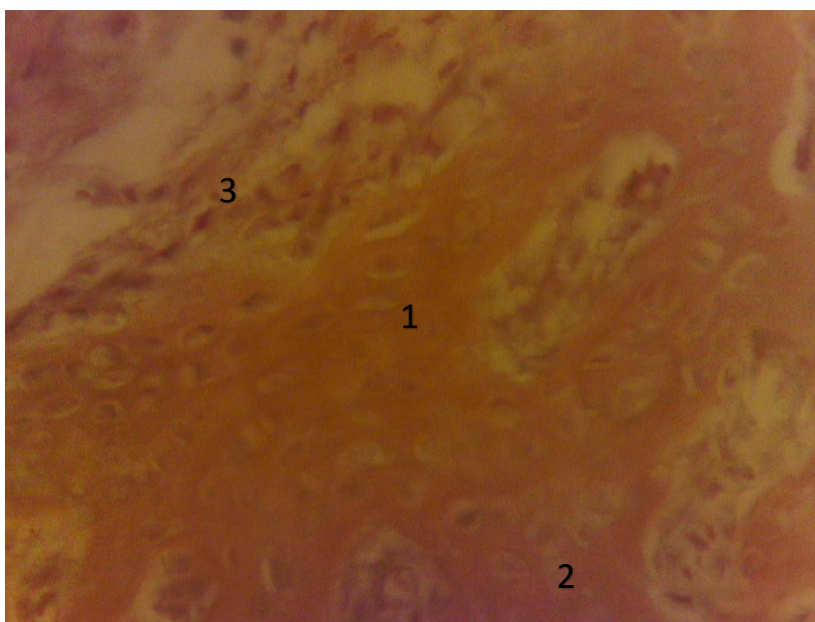


Рис. 9. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов середнього ступеня загального зневоднення організму на 24 добу після нанесення травми. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoomx200. 1. Грубоволокниста кісткова тканина. 2. Хондробласти. 3. Залишки

фіброзної тканини.

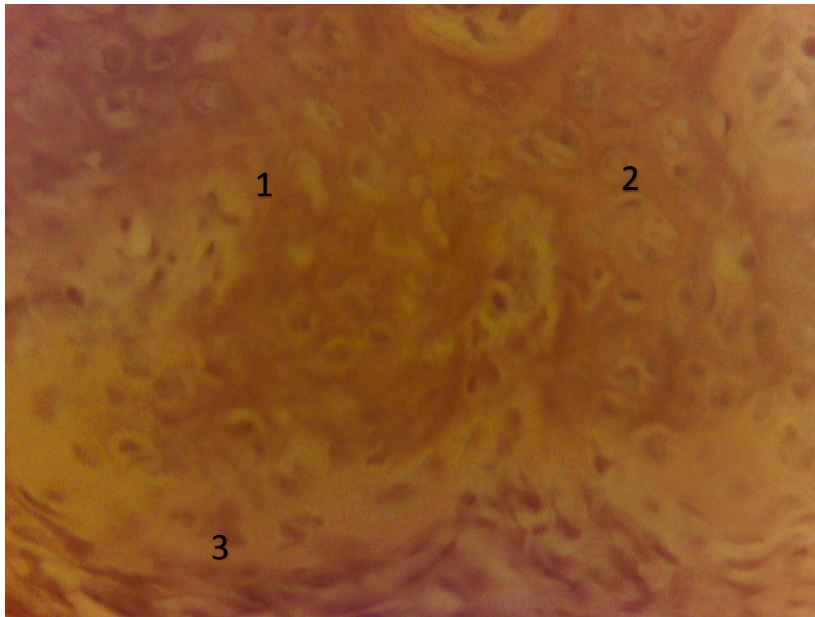


Рис. 10. Регенерат п'яткової кістки зрілого щура за умов важкого ступеня загального зневоднення організму на 24 добу. Забарвлення гематоксилін-еозин. Zoomx200. 1. Грубоволокниста кісткова тканина. 2. Хондробласти. 3. Залишки фіброзної тканини.

Таким чином, порушення репаративної регенерації, почавшись зі змін клітинного складу гематоми та міжклітинних взаємодій, призводить на 24 добу до неповноцінного формування кісткового мозоля.

Висновки. Зневоднення організму призводить до уповільнення формування кісткового регенерату, що виявляється у клітинному дисбалансі на першій стадії репарації. Зрушення клітинних взаємовідношень викликає порушення гістогенезу на наступних стадіях репарації. Osteобласти регенерату зазнають дистрофічних змін, що свідчить про зниження процесів внутрішньоклітинної регенерації. Ці зміни нарастають із збільшенням ступеня дегідратації, що веде до формування

неповноцінного кісткового мозоля.

Перспективою подальших досліджень є вивчення будови регенерату губчастої кістки за умов загального зневоднення організму в віковому аспекті.

Література

1. Батура І.О. Регенерація кісткового дефекту в умовах тривалого введення гідрокортизону білим лабораторним щурам / І.О. Батура // Український морфологічний альманах. - 2006. - Т.4, №2. – С. 14-17.

2. Бумейстер В.І. Структурно-метаболична характеристика кісткового регенерату в умовах впливу загального зневоднення важкого ступеню. / В.І. Бумейстер // Вісник морфології. – 2008. - №14(2). – С. 329-332.

3. Бумейстер В.І. Морфологічні зміни кісткового мозоля під впливом зневоднення організму. / В.І.Бумейстер // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2009. – Випуск 25. – С. 22-27.

4. Дедух Н.В. Морфологические особенности регенерации кости на воспалительно-пролиферативной стадии процесса при алиментарном дефиците кальция. / Н.В. Дедух., О.А. Никольченко., У.Ю. Валенчук // Таврический медико-биологический вестник. – 2004. – Т.7, №4. – С. 153-155.

5. Ковешников В.Г. Алгоритм морфометрического исследования. / В.Г. Ковешников., В.В. Маврич., С.А. Кащенко// Буковинський медичний вісник. – 2003. – Т.7, №3. – С. 180-186.

6. Мостовой С.О. Структурная организация бедренных костей лабораторных белых крыс при применении препаратов аминифосфатной и аминобифосфатной групп. / С.О. Мостовой., О.В. Остапенко., С.А. Кутя., Н.И. Демчук // Морфологія – 2014 – Т.8, №3. – С. 50-56.

7. Соболева А.Д. Реакция клеток и тканей на обезвоживание /

Соболева А.Д. – Новосибирск: Наука, 1975. – С. 64.

8. Vesterby A. Star volume in bone research. A histomorphometric analysis of trabecular bone structure using vertical sections. Anat. Rec. 1993 Feb;235(2):325-34. PMID: 8420401.

**МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ РЕГЕНЕРАТА
ГУБЧАТОЙ КОСТИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ПРИ УСЛОВИИ
ОБЩЕГО ОБЕЗВОЖИВАНИЯ ОРГАНИЗМА**

Гордиенко Е. В.

Резюме. В статье представлены результаты, полученные при изучении микроскопического строения регенерата губчатой кости у половозрелых крыс при условии общего обезвоживания организма легкой, средней и тяжелой степеней. Полученные данные свидетельствуют, что замедление формирования костной мозоли происходит из-за задержки формирования тканево-специфических структур регенерата. Установленные изменения на прямую зависят от степени нарушения водно-солевого баланса.

Ключевые слова. Губчатая костная ткань, репаративный остеогенез, дегидратация, морфометрия.