

УДК 576.536+611.71/72

Н. В. Родионова, Е. В. Скрипченко, Е. В. Катькова  
Институт зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України, г. Київ

## ПРОЛИФЕРАЦИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРА ПЕРИВАСКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В ЗОНАХ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ СНЯТИИ ОПОРНОЙ НАГРУЗКИ

С применением методов гистологии, электронной микроскопии и гистоавтордиографии с 3Н-тимидином установлено, что при длительном снятии опорной нагрузки с задних конечностей в зонах адаптивных перестроек (метафиз, сосудистые каналы в кортикальной кости диафизов) бедренной кости крыс основную ДНК-синтезирующую фракцию составляют малодифференцированные периваскулярные клетки синусоидных капилляров. Высокая пролиферативная активность популяции связана не только с самоподдержанием, но и участием в генезе остеогенных клеток. Установлено, что в условиях снятия опорной нагрузки в зонах деструкции костной ткани имеет место снижение интенсивности пролиферации периваскулярных клеток, особенно в популяции дифференцирующихся, включающих в зонах ремоделирования преостеобласты. Часть клеток дифференцируются в фибробласты, в результате чего в костных структурах появляются зоны фиброза. Таким образом адекватного восстановления костной ткани в локусах деструкции не происходит. В костной ткани формируются остеопоротические полости, снижается механическая плотность костных структур.

**Ключевые слова:** периваскулярные клетки, пролиферация, ультраструктура.

*Работа является фрагментом темы «Цитологические механизмы гравитационно-зависимых изменений в костном скелете и органах гемопоэза у наземных позвоночных», номер госрегистрации 0111U000153, а также в рамках «Целевой комплексной программы НАН Украины по научным космическим исследованиям на 2012-2016 гг.», номер госрегистрации 0114U004412.*

Микрогравитация и длительная гипокинезия вызывают снижение массы и минеральной насыщенности костной ткани, что может приводить к развитию остеопении и остеопороза [3, 4]. Клеточные механизмы, лежащие в основе этих заболеваний, остаются во многом неясными, в частности, реакции остеогенных клеток-предшественников в условиях организма (in vivo) [2]. Процессы физиологического и адаптивного ремоделирования костных структур происходят в топографической связи с кровеносными сосудами [1]. Нами показано, что малодифференцированные периваскулярные клетки, сопровождающие синусоидные капилляры, имеют прямое отношение к генезу остеогенных клеток [5, 6]. Поэтому актуальным является всестороннее изучение ДНК-синтезирующих популяций периваскулярно расположенных стромальных клеток в зонах развития остеопоротических изменений.

**Целью** работы было - исследование интенсивности пролиферации и ультраструктуры периваскулярных клеток в зонах ремоделирования костных структур при снятии опорной нагрузки.

**Материал и методы исследования.** Исследование проведено на 10 белых крысах (5-опыт, 5 –контроль) линии Вистар (самцы, вес 180-200 грамм) в опыте со снятием опорной нагрузки с задних конечностей под углом 35° по методу Morey-Holton E.R. (1998) в течение 28 суток. В конце эксперимента животным однократно внутривенно вводили 3Н -тимидин («Amersham», Австрия) в дозе 0,5 мКи/г массы тела. 3Н - тимидин является специфическим предшественником синтеза ДНК и маркером S-фазы. Бедренные кости были взяты через 1 и 96 часов после инъекции радионуклида. Животным перед отбором костей проводили эфирный наркоз в соответствии с правилами биоэтики. Для гисторадиоавтордиографии бедренные кости фиксировали в 10% формалине, декальцинировали в трилоне Б («Sigma», Германия), заключали в парафин. Срезы покрывали фотоэмульсией типа «М» (Россия), гистоавторграфы окрашивали гематоксилин-тионин-эозином. На препаратах подсчитывали относительный удельный объем костных трабекул в метафизах и полостей в диафизах, индекс (%) меченных 3Н-тимидином клеток (на 300 клеток) и интенсивность мечения (на 100 клеток) в поле зрения микроскопа при увеличениях 750 и 1250. Для электронной микроскопии биообразцы фиксировали в 2,5% глутаральдегиде и 1% растворе OsO<sub>4</sub>, заключали в аралдит. Ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе «Тесла БС500». Морфометрию органелл проводили по методу точечного счета с использованием программы „Biovisard”.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Гистоморфологическими исследованиями установлено, что снятие опорной нагрузки влияет на структуру бедренных костей крыс. У

опытных животных по сравнению с контрольными имеет место нарушение архитектоники и частичная деструкция костных трабекул в метафизах, регистрируются участки расслоения и полости в кортикальной кости диафизов. Относительный удельный объем костных трабекул достоверно снижается (опыт –  $0,216 \pm 0,110$ , контроль –  $0,266 \pm 0,013$ ,  $P < 0,05$ ), удельный объем полостей в диафизах возрастает (опыт –  $0,101 \pm 0,005$ , контроль –  $0,163 \pm 0,003$ ,  $P < 0,05$ ). Отмечено расширение костных сосудистых каналов и усиление васкуляризации кортикальной кости, что связано с процессом ее деструктуризации. Указанные выше перестройки свидетельствуют об утрате костной массы в исследованных костях.

Как в контроле, так и в опыте по ходу врастания синусоидных капилляров в зоны костной деструкции в метафизах и диафизах регистрируются малодифференцированные клетки фибробластического типа. Одни из них прилегают к эндотелию значительной частью цитоплазмы, поверхности их могут быть комплементарными. Клетки имеют отростки различной длины, которые охватывают эндотелиальный пласт капилляра. Другие – поддерживают связь с эндотелием посредством лишь отдельных отростков. Наличие отростков, положительная реакция на щелочную фосфатазу, электронно-светлая цитоплазма, составляют характерное отличие этих форм от присутствующих в очагах, в том числе периваскулярно, клеток моноцитарно-макрофагального ряда [5, 9, 10].

Малодифференцированные периваскулярные клетки имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение ( $1,41 \pm 0,07$ ). В цитоплазме выявлены многочисленные полисомы, единичные узкие каналы эндоплазматической сети (ЭПС), слабо развитый комплекс Гольджи, представленный на срезах клетки отдельными вакуолями и везикулами. По степени насыщенности органоидами (митохондрии, ЭПС, полисомы) такие клетки не обнаруживают достоверных различий ( $P < 0,05$ ) в зависимости от локализации как по исследованным зонам (метафиз, диафиз), так и в опыте, по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ). Так в метафизах удельный объем органелл составляет: ЭПС – в контроле  $0,054 \pm 0,002$ , в опыте  $0,049 \pm 0,003$  ( $P < 0,05$ ), митохондрии в контроле  $0,080 \pm 0,004$ , в опыте  $0,069 \pm 0,004$  ( $P < 0,05$ ), полисомы в опыте  $0,064 \pm 0,003$ , в контроле  $0,087 \pm 0,03$  ( $P < 0,05$ ). (Рис. 1.) В цитоплазме некоторых малодифференцированных клеток в опыте выявлены зоны просветления и деструкции мембранных структур. Исследования, проведенные ранее [6] с использованием электронно-микроскопической автордиографии показали, что в зонах остеогенеза именно малодифференцированные периваскулярные клетки наиболее интенсивно включают  $^3\text{H}$ -тимидин через 1 ч после его введения, что свидетельствует об их высокой пролиферативной активности.

На гистоавтографах индексы мечения ядер (И.М.Я) малодифференцированных периваскулярных клеток в контроле и в опыте достоверно отличаются и составляют соответственно  $3,86 \pm 0,20\%$  и  $2,31 \pm 0,012\%$  ( $P < 0,05$ ). Судя по высокому включению  $^3\text{H}$ -тимидина, такие клетки составляют основную пролиферирующую фракцию среди ДНК-синтезирующих периваскулярных стромальных клеток в зонах появления остеопоротических перестроек. Популяция малодифференцированных периваскулярных клеток является самоподдерживающейся; через 96 ч после введения  $^3\text{H}$ -тимидина на радиоавтографах в ядрах регистрируется метка изотопа, разведенная в 3-5 (в опыте в 3,9; в контроле – в 5,3 раз) по сравнению с первоначальной, что свидетельствует о большем числе делений клеток в контроле, чем в опыте. Полученные данные позволяют полагать, что малодифференцированные периваскулярные клетки в зонах развертывания остеогенеза *in vivo* можно рассматривать как своеобразную «периваскулярную нишу» мультипотентных МСК. Показано, что периваскулярные клетки, полученные из стенок сосудов различных органов и тканей, по ряду параметров соответствует МСК [7, 8].

Интенсивная репродукция малодифференцированных периваскулярных клеток в зонах ремоделирования костной ткани связана не только с ростом и самоподдержанием популяции, но и с участием в процессах генеза остеогенных клеток. В зонах ремоделирования происходит дифференцировка части периваскулярных клеток в остеогенные, которые располагаются на поверхности костных структур, но связаны отростками с эндотелием сосудов (Рис.3). Дифференцирующиеся клетки (преостеобласты) имеют более низкое ядерно-цитоплазматическое отношение – ( $0,71 \pm 0,035$ ). Установлено, что в опыте уменьшается удельный объем ЭПС (в контроле  $0,154 \pm 0,07$ , в опыте  $0,129 \pm 0,05$ , ( $P < 0,05$ )) что отражает снижение интенсивности дифференцировки и биосинтеза коллагеновых белков, органического компонента межклеточного вещества. Отмечено снижение пролиферативной активности для дифференцирующихся периваскулярных клеток, представленных на костных поверхностях преимущественно преостеобластами, так И.М.Я составляет  $2,23 \pm 0,11\%$  в контроле,  $1,67 \pm 0,08\%$  в

опыте, ( $P < 0,05$ ), интенсивность мечения клеток 3Н-тимидином в опыте уменьшается в 2,1 раза (в контроле в 3,5), что отражает замедление процессов их пролиферации и дифференцировки в зонах ремоделирования при снятии опорной нагрузки.

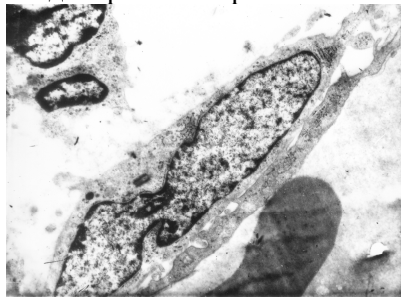


Рис. 1. Малодифференцированная периваскулярная клетка в зоне метафиза бедренной кости крысы. Электронная микрофотография. Опыт. X 9500.

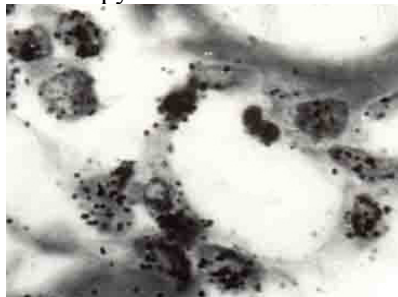


Рис. 2. Меченые периваскулярные клетки и преостеобласты в зоне остеогенеза через 1 час после введения 3Н-тимидина. Метафиз бедренной кости крысы. Опыт. Гисторадиоавтограф. Г.-э. X 1250.

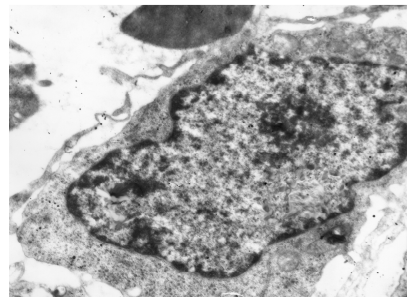


Рис. 3. Дифференцирующаяся периваскулярная клетка в зоне метафиза бедренной кости крысы. Опыт. Электронная микрофотография. X 10700.

Исследования, проведенные нами ранее в модельных экспериментах со снятием опорной нагрузки с задних конечностей крыс, применением электронной микроскопии и цитохимических маркеров остеогенной дифференцировки показали, что в зонах ремоделирования и деструктивных перестроек костных структур уменьшение количества дифференцирующихся остеогенных клеток-предшественников происходит в результате возрастания количества фибробластов, т.е. условия снятия опорной нагрузки замедляют (или частично блокируют) остеогенную дифференцировку части периваскулярных клеток и стимулируют дифференцировку фибробластов, что приводит к появлению зон фиброза, участков, заполненных коллагеновыми фибриллами, которые не минерализуются. Такую реакцию периваскулярных клеток-предшественников можно рассматривать как один из механизмов нарушения интенсивности адаптивных остеогенетических процессов в костях и снижения их прочности. Это отмечено нами и в эксперименте на биоспутнике «Бион-М1»: вблизи кровеносных сосудов в кортикальной кости мышей появляются характерные зоны деминерализации и фиброза. Это подтверждают и проведенные нами электронно-микроскопические исследования [6, 10].

#### Заключение

С применением методов гистологии, электронной микроскопии и гистоавторадиографии с 3Н-тимидином установлено, что при длительном снятии опорной нагрузки с задних конечностей в зонах адаптивных перестроек (метафиз, сосудистые каналы в кортикальной кости диафизов) бедренной кости крыс основную ДНК-синтезирующую фракцию составляют малодифференцированные периваскулярные клетки синусоидных капилляров. Высокая пролиферативная активность популяции связана не только с самоподдержанием, но и участием в генезе остеогенных клеток. Установлено, что в условиях снятия опорной нагрузки в зонах деструкции костной ткани имеет место снижение интенсивности пролиферации периваскулярных клеток, особенно в популяции дифференцирующихся, включающих в зонах ремоделирования преостеобласты. Часть клеток дифференцируются в фибробласты, в результате чего в костных структурах появляются зоны фиброза. Таким образом адекватного восстановления костной ткани в локусах деструкции не происходит. В костной ткани формируются остеопоротические полости, снижается механическая плотность костных структур.

*Перспективы дальнейших разработок в данном направлении. Исследование ультраструктуры и пролиферативных потенций периваскулярных клеток и клеток костномозговой стромы в норме и при изменении опорной нагрузки необходимо для понимания механизмов гистогенетических процессов в костном мозге и костном скелете, в т. ч. выяснения локализации *in vivo* и потенций мезенхимных стволовых клеток, разработки методов лечения и профилактики различных патологий, например, остеопороза, заболеваний кроветворных органов.*

#### Список литературы

1. Brusko A.T. Funkcional'naja perestrojka kostej i ee klinicheskoe znachenie: Monogr. / A.T. Brusko, G.V. Gajko // – L.: LGMU, -2005. – 212 с.
2. Buravkova L. B. Chuvstvitel'nost' stromal'nyh kletok-pedshestvennikov razlichnoj kommitirovannosti k modelirovannoj mikrogravitacii // Doklady Akademii Nauk. – 2010. – №2. – S. 267–271.
3. Oganov V. S. O mehanizmah osteopenii i osobennostjah metabolizma kostnoj tkani cheloveka v uslovijah nevesomosti / V.S. Oganov, A.I. Grig'ev // Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova. – 2012. – № 3. – S. 395-409.

4. Oganov. V. S. Kostnaja sistema, nevesomost' i osteoporoz. Izd. 2-e, pererab. i dop. / V.S. Oganov // – V.: Nauchnaja kniga, - 2014. - 291 s.
5. Rodionova N.V. Funkcional'naja morfologija kletok v osteogneze / N.V. Rodionova.-Kiev: Nauk.dumka,-1989,186 s.
6. Rodionova N. V. Citologichni mehanizmi perebudov u kistkah pri gipokinezii ta mikrogravitacii / N.V. Rodionova // – Kiiv, Naukova dumka, - 2006. – 238 s.
7. Da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / L. Da Silva Meirelles, P.C. Chagastelles, N. B. Nardi // Journal of Cell Science. – 2006. – Vol. 119 (11). - P. 2204-2213.
8. Crisan M. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs / M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla [et all.] // Cell stem cell. – 2008. – Vol.3. – P. 301-313
9. Rodionova N. V. Differentiation potentials of perivascular cells in the bone tissue remodeling zones under microgravity (40th COSPAR Scientific Assembly, 2014) / N.V. Rodionova, O.V. Katkova // Moscow. – 2014. – F 5.2-2014-14 c.
10. Rodionova N.V. Ultrastructure and differentiation of perivascular cells in the bone tissue remodeling zones under microgravity / N.V. Rodionova, O.V. Katkova // 14-а Українська конференція з космічних досліджень, 8-12 вер. 2014. – Ужгород, - 2014. – 40 с.

### Реферати

#### ПРОЛІФЕРАЦІЯ І УЛЬТРАСТРУКТУРА ПЕРИВАСКУЛЯРНИХ КЛІТИН В ЗОНАХ РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ ЗНЯТТІ ОПОРНОГО НАВАНТАЖЕННЯ

Родіонько Н. В., Скрипченко О. В., Каткова О. В.

Із застосуванням методів гістології, електронної мікроскопії і гістоавторадіографії з 3Н-тимідином встановлено, що при тривалому знятті опорного навантаження з задніх кінцівок в зонах адаптивних перебудов (метафіз, судинні канали кортикальної кістки діафізів) стегнової кістки щурів основну ДНК-синтезуючу фракцію складають малодиференційовані периваскулярні клітини синусоїдних капілярів. Висока проліферативна активність популяції пов'язана не лише з само підтриманням, а і з участю у генезі остеогенних клітин. Встановлено, що в умовах зняття опорного навантаження в зонах деструкції кісткової тканини має місце зниження інтенсивності проліферації периваскулярних клітин, особливо в популяції клітин, що диференціюються, які включають в зонах ремодельовання преостеобласти. Частина клітин диференціюються в фібробласти, в результаті чого в кісткових структурах з'являються зони фіброзу. Таким чином адекватного відновлення кісткової тканини в локусах деструкції не відбувається. У кістковій тканині формуються остеопоротичні порожнини, знижується механічна щільність кісткових структур.

**Ключові слова:** периваскулярні клітини, проліферація, ультраструктура.

Стаття надійшла 14.03.2015 р.

#### PROLIFERATION AND ULTRASTRUCTURE OF PERIVASCULAR CELLS IN BONE TISSUE REMODELING ZONES AT REMOVAL SUPPORT LOADING

Rodionova N. V., Skripchenko O. V., Katkova O. V.

Using histological methods, electron microscopy and histoautography with 3H-thymidine was found that at long term hind limbs unloading the poorly differentiated perivascular cells of sinusoids are the main DNA-synthesizing fraction in the zones of adaptive transformations (metaphysis, cortical bone vascular channels in diaphysis) in rat femur.

High proliferative activity of the population is connected not only to self-maintenance but also takes part in genesis of osteogenic cells. It was found, that under supportive unloading there is reduction of perivascular cells proliferation intensity in destruction zones, particularly in differentiating cells population, which includes preosteoblasts in remodeling zones. Part of the cells differentiates into fibroblasts, resulting in bone fibrosis zones emerge. Thus, there isn't an adequate response of the bone tissues in destruction locus. The osteoporotic cavities are forming in bone tissue; mechanical density of bone structures is reducing.

**Key words:** perivascular cells, proliferation, ultrastructure.

Рецензент Єрошенко Г.А.

УДК 616.37 – 018:611.716.4

А. М. Романюк, А. Б. Коробчанська, С. В. Сауляк, С. А. Романюк  
Сумський державний університет, м. Суми,  
Харківський державний медичний університет, м. Харків

#### МОРФОЛОГІЧНІ ТА МЕТАБОЛІЧНІ ПОРУШЕННЯ У НИЖНІЙ ЩЕЛЕПІ ТА РІЗЦІ ПІД ВПЛИВОМ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ОСЕЇН-ГІДРОКСИПАТИТНИМ КОМПЛЕКСОМ

В експерименті на 68 статевозрілих щурах показані особливості порушення морфологічної будови та хімічного складу кісткової тканини та різця нижньої щелепи щурів за умов дії на організм солей хрому, свинцю, цинку, заліза, міді, марганцю, а також досліджена можливість застосування осеїн-гідроксиapatитного комплексу для корекції виявлених змін. Показано, що реадaptaційний період після вживання солей важких металів на фоні корегуючої терапії перебігає більш сприятливо, хоча повної нормалізації досліджуваних параметрів не відбувається навіть через 60 днів.

**Ключові слова:** морфологія, мінеральний склад, нижня щелепа, різець, кісткова тканина, солі важких металів, осеїн-гідроксиapatитний комплекс.

Робота є фрагментом НДР «Закономірності вікових і конституційних морфологічних перетворень за умов впливу ендо- і екзогенних чинників і шляхи їх корекції», державна реєстрація № 0113U001347.

Забруднення довкілля сполуками важких металів (СВМ) підвищує рівень захворюваності населення [6, 7, 8]. Показано, що під впливом солей важких металів відбувається порушення