

На правах рукописи

ГРЫЗЛОВА ЛАРИСА ВЛАДИМИРОВНА

Лрм -

**ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА СВИНЦА
НА ПЛАЦЕНТАРНЫЙ БАРЬЕР И НА РАЗВИТИЕ
КОСТНОЙ ТКАНИ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)**

16.00.02 – патология, онкология и морфология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САРАНСК - 2006

Работа выполнена на кафедре анатомии, физиологии и валеологии
ГОУ ВПО «Мордовский государственный педагогический институт
им. М. Е. Евсевьева»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шубина Ольга Сергеевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Зенкин Александр Сергеевич

доктор биологических наук профессор,
академик, член РАЕН
Сыч Виталий Фёдорович

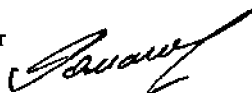
Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Ивановская государственная
сельскохозяйственная академия»

Защита диссертации состоится «11» ноября 2006 г. в 10 часов на засе-
дании диссертационного совета К 212. 117. 05 при Мордовском государствен-
ном университете им. Н. П. Огарева (430000, г. Саранск, ул. Большевикская, 68).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Мордовского
государственного университета им. Н. П. Огарева.

Автореферат разослан « 10 » октября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, доцент



Т. А. Романова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Экзогенное воздействие свинца на репродуктивную систему организма является важным аспектом в прогнозировании и предупреждении патологии беременности и родов (Волощенко О. И., Мудрый И. В., 1991; Савельева Г. М. и соавт., 1991; Полякова А. Н., и соавт., 1995; Saxena D. K. et al., 1994; Gupta G., 1997; Schneider H., 1997; Torgy D. S., Torgy R. J., 1997; Reichrtova E. et al., 1998). Однако многие вопросы остаются неясными, в том числе и морфофункциональные изменения плаценты при свинцовой интоксикации, приводящие к различным нарушениям в развитии плодов и новорождённых (Отеллин В. А., и соавт., 2006).

Известно, что пороки развития и функциональная неполноценность органов и систем часто проявляются после рождения (Падруль М. М., 1996г). В последнее время возрос научный интерес к вопросам функционирования костной системы. Доказано, что именно скелет характеризуется выраженной пластичностью, а также владеет чувствительной реакцией через обменные процессы на влияние экзогенных химических факторов (Никитюк Б. И., и соавт., 1989; Ковешников В. Г., Пикалюк В. С., 1995; Пикалюк В. С., 1998). Проведённые исследования (Мажуга П. М., и соавт., 1991; Родионова Н. В., и соавт., 1996; Григанов М. В., 2006) доказывают возможность влияния на остеогенные процессы свинцовой интоксикации. Однако проблема влияния экологических факторов на строение, рост и формирование костей скелета остаётся недостаточно решённой. Поэтому возникла необходимость изучения действия свинцовой интоксикации матерей при беременности (проведения экспериментального исследования) на постнатальное развитие костной ткани трубчатых костей.

1.2. Цель и задачи исследования. Целью работы явилось изучение влияния ацетата свинца на плацентарный барьер и на развитие костной ткани трубчатых костей в раннем онтогенезе.

Для выяснения поставленной цели определены следующие задачи:

- изучить морфологию системы мать-плацента-плод при физиологической беременности белых крыс (контроль);
- установить морфофункциональные особенности развития плаценты, плода и костей при свинцовой интоксикации крыс при беременности;
- выявить закономерности роста, развития и структурной организации костной ткани трубчатых костей крыс в постнатальном онтогенезе при физиологической беременности (контроль) и при свинцовой интоксикации материнского организма (опыт).

1.3. Научная новизна. Впервые установлено, что степень изменений морфофункционального состояния системы: мать – плацента – плод зависит от времени воздействия ацетата свинца на материнский организм.

Установлены закономерности развития и роста костной ткани трубчатых костей при физиологической беременности и при свинцовой интоксикации материнского организма.

Ацетат свинца в дозе 45 мг/кг/в сут. влияет на уровень ростовых процессов, протекающих в трубчатых костях потомства белых крыс, получавших интоксикацию во время беременности. Доказано, что длительная свинцовая интоксикация материнского организма инициирует замедление темпов остеопла-

стического процесса и внутренней реконструкции трубчатых костей после рождения. Полученные изменения костной ткани трубчатых костей не компенсируются.

1.4. Научно-практическая значимость работы. Полученные данные по морфофункциональным изменениям плацентарного барьера белых крыс при нормально протекающей беременности и в условиях свинцовой интоксикации представляют интерес для сравнительной морфологии и физиологии животных и человека.

Данные по развитию костной ткани белых крыс могут быть использованы для прогнозирования физиологического состояния опорно-двигательного аппарата животных, при решении фундаментальных проблем возрастной физиологии скелета, а также экологической морфологии животных.

Результаты по морфофункциональному состоянию плацентарного барьера в условиях свинцовой интоксикации могут быть рекомендованы к использованию в акушерской практике для глубокого понимания патогенеза заболеваний, связанных с нарушением функций плацентарного барьера в экологически неблагоприятных регионах.

1.5. Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Действие свинцовой интоксикации на беременных белых крыс уксуснокислым свинцом в дозе 45 мг/кг/сут, и развитие эмбриотоксического эффекта в плацентарном барьере.

2. Структурные изменения плацентарного барьера при продолжительной интоксикации уксуснокислым свинцом организма беременной белой крысы.

3. Влияние свинцовой интоксикация материнского организма белых крыс на закономерности роста, развитие структурной организации костной ткани трубчатых костей в раннем онтогенезе.

1.6. Реализация результатов исследования. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 4 работы в центральной печати. Основные результаты работы доложены на: IV общероссийской конференцией с международным участием «Проблемы морфологии. Теоретические и клинические аспекты». Астрахань, 14-17 сентября 2005 г.; VIII международной научно-практической конференции «Экология и жизнь». Пенза, 24-25 ноября 2005 г.; IV Международной конференции, посвящённой 100 - летию со дня рождения академика РАСХН Н. А. Шманинкова «Актуальные проблемы биологии в животноводстве». Боровск, 5-7 сентября 2006 г.; ежегодных научных конференциях Мордовского государственного педагогического института имени М.Е. Евсевьева «Евсевьевские чтения». Саранск, 2003-2006 гг.; на «Огарёвских чтениях» МГУ им. Н. П.Огарёва. Саранск, 2006 г. Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедрах: анатомии, гистологии, физиологии, патологической анатомии, биологии, генетики и экологии Мордовского, Хакасского государственных университетов, Мордовского государственного педагогического института; Ивановской, Брянской, Костромской государственной сельскохозяйственной академии; Казанской, Санкт-Петербургской, Уральской государственной академии ветеринарной медицины; Краснодарского, Оренбургского агроуниверситетов.

1.7. Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на – 147 стра-

ницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, методов исследований, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 200 источников, из которых отечественных работ - 136, иностранных - 64. Текст иллюстрирован 14 таблицами, 53 рисунком (фотографии, графики).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования избраны белые беспородные крысы репродуктивного возраста. В соответствии с поставленными задачами животные после спаривания разбивались на две группы: первая группа животных - контрольная, вторая группа - опытная, когда беременные самки, получали перорально уксуснокислый свинец в дозе 45 мг/кг/сутки. Материалом исследования являлись плацента, плоды и длинные трубчатые кости.

Применённый комплексный методический подход включал: морфологические и гистохимические методы исследования, в том числе: наблюдение за животными с последующим установлением беременности, эмбриотоксического действия свинца; электронную микроскопию; световую микроскопию и гистохимию, макроскопическую и микроскопическую морфометрию.

Установление беременности. Определяли момент спаривания самок, находящихся в состоянии течки. Животные считались беременными с утра того дня, когда во влагалищном содержимом обнаруживали сперматозоиды.

Установления эмбриотоксического действия свинца. С 8 суток беременности за животными устанавливали наблюдение. Контролировали состояние и поведение самок, регистрировали динамику изменения массы тела, продолжительность беременности, течение родов. Учет результатов эксперимента проводили как при убое беременных самок с 11-ых суток беременности, так и по состоянию потомства в постнатальный период развития.

После убоя взрослых крыс путем декапитации подсчитывали в матке места имплантации, число живых и погибших зародышей с целью определения постимплантационной гибели. Изучали также общую эмбриональную смертность, размер помета, выход живых плодов.

Электронная микроскопия. Материал фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH=7,2). Дофиксацию проводили в 1% растворе осмиевой кислоты на 0,2 М фосфатном буфере (pH=7,2). Обезвоживание материала проводили по серии спиртов в 50, 70, 96, 100%. Заливка материала проводилась в смеси эпон-аралдит. Полутонкие срезы готовили на LKB-Pyramiton и окрашивали толудиновым синим. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Ultracut OmU-3 (фирмы Reichert). Двойное констатирование срезов проводили уранилацетатом. Препараты исследовали на электронном микроскопе ЭМ-125.

Макроскопическая морфометрия. Забор материала осуществляли на 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 сутки беременности и сразу же после рождения. Скелет изучали под стереомикроскопом МВС-9 при увеличении в 16 раз. Регистрировали сроки появления, топографию, последовательность распространения и размеры первичных точек окостенения длинных трубчатых костей (Пикалюк Б. С., Могилёвская О. И., 1981).

Микроскопическая морфометрия. Остеометрию проводили штангенциркулем с точностью до 0,1 мм. Программа остеометрии: наибольшая ширина дистального эпифиза, наибольшая ширина середины диафиза. Морфометрические измерения диафиза, метафиза и дистального эпифиза длинных трубчатых костей проводили по методике Г. Г. Автандилова (1990) с помощью окулярного винтового микрометра (МОВ-1-15) и окулярной измерительной системы УМ-БИ-3. Калибровку измерительных приборов осуществляли с помощью миллиметровой линейки ГОСТ 7513-55. Морфометрию дистальных эпифизов проводили по следующей программе: измерялись толщина эпифизарного хряща, толщина зоны пролиферирующего хряща, толщина зоны индифферентного хряща, толщина зоны дефинитивного хряща, длина трабекул первичной спонгиозы, количество остеобластов в первичной спонгиозе, количество клеток в столбике зоны пролиферирующего хряща, а также измеряли толщину суставного хряща. Программа морфометрии диафизов и метафизов: ширина внешнего пласта периоста; ширина внутреннего остеогенного пласта периоста; количество остеобластов в эндоосте; количество остеобластов в периосте.

Световая микроскопия. Для гистологического исследования костной ткани кости фиксировали в 10%-ном растворе формалина, заливали в парафиновые блоки. Готовили гистологические срезы толщиной 10-15 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Для гистохимического анализа основных и кислых белков использовалась реакция с сулема-бромфеноловым синим. Жировые вещества выявлялись реакцией с суданом чёрным III. Для выявления углеводов использовалась Шик-реакция по Мак-Манусу. Одновременно проводили дифференцировку α -амилазой слюны для выявления гликогена и глюкозаминогликанов (ГАГ).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Морфологическая характеристика плодов и плаценты белых крыс при физиологической беременности и при свинцовой интоксикации в эмбриогенезе

На электроннооптическом уровне установлено, что, на 21-22-е сутки (третий период) физиологической беременности, на срезах окрашенных толуюндуновым синим плацента белых крыс представлена тремя зонами клеток трофобласта: 1) зоной гигантских клеток трофобласта; 2) промежуточной зоной; 3) лабиринтом, где сосредоточены сосуды. Зона гигантских клеток непосредственно прилежит к соединительнотканным структурам стенки матки и представлена вторичными гигантскими клетками трофобласта. Гигантские клетки располагаются в один или несколько слоев, имеют вытянутую бобовидную форму с овальным или округлым ядром, содержащим одно ядрышко. Для них характерно наличие процесса активного фагоцитоза, о чём свидетельствует значительное количество лейкоцитов и эритроцитов.

Промежуточная зона состоит из спонготрофобластических и «гликогенных» клеток, содержит материнские лакуны, ширина и протяженность которых варьирует. Спонготрофобластические клетки полигональной формы, содержат

одно, реже два ядра, сгруппированы в тяжи. Мелкие глыбки хроматина в ядрах распределены, как правило, равномерно. В промежуточной зоне сосредоточены камбиальные элементы, являющиеся источником для пополнения цитотрофобласта лабиринтных балок и клеточных элементов пограничной зоны. «Гликогенные» клетки, получившие свое название из-за большого содержания гликогена, образуют «гликогенные» островки.

Лабиринтная зона плаценты представляет собой собственно гемато-плацентарный барьер, участвующий в пареплацентарном обмене между материнской и детской кровью. Лабиринтная зона плаценты белой крысы представлена тремя слоями клеток трофобластического эпителия. Первый слой, обращенный к материнской лакуне – цитотрофобласт, второй слой или средний – симпласт, третий слой, обращенный в просвет фетального сосуда, по своей структуре похож на предыдущий, т.е. симпласт. Часто оба слоя синцитиотрофобласта сливаются вместе. Клетки цитотрофобласта, покрывающие трабекулы со стороны материнского кровотока, крупные, вытянутой формы, образуют непрерывный слой. В симпластических слоях обнаруживаются скопления округлых или овальных ядер, клеточные и фибриллярные элементы. В просвете капилляров плода лабиринта видны форменные элементы крови плода, в основном преобладают эритроциты.

При введении ежедневно белым крысам с 8-суточной беременности перорально укуснокислового свинца в дозе 45 мг/кг/су выявлены изменения, как структуры плаценты, так и функционального состояния системы мать-плацента-плод в целом. При этом степень изменений зависела от времени воздействия свинца. В цитоплазме гигантских клеток отмечены многочисленные включения, которые свидетельствуют о повышении фагоцитарной активности клеток. В «гликогенных» клетках снижено количество гранул гликогена. На их месте образуются пустоты.

В материнской части плаценты наблюдается выраженное расширение кровяных лакун в просвете которых помимо форменных элементов крови в изобилии выявляются «гликогенные» клетки, в то же время как в норме эти клетки обнаруживаются в лакунах в виде единичных экземпляров. Выражены явления застоя, и агрегации эритроцитов. В плодной части плаценты также выявляются выраженные гемодинамические расстройства и метаболические сдвиги. Поэтому, плодные сосуды спавшиеся, содержат скудное количество форменных элементов крови, местами они запустевшие, что, вероятно, связано с ухудшением условий материнско-плодового обмена. Обнаружены выраженные изменения цитотрофобласта, синцитиотрофобласта балок лабиринтной зоны. В синцитии на месте скопления гранул гликогена образуются вакуолеподобные полости. Толщина цитотрофобласта и синцитиотрофобласта варьирует, значительно сужаясь в области сосудов плода. В некоторых участках цитотрофобласта наряду с дистрофическими процессами выявлены некротические изменения.

Изучение эмбриотоксического действия свинца, проявляющегося в пре- и постнатальном периодах развития крыс, показало, что самки были активными без признаков каких-либо нарушений. Прирост массы тела белых крыс опытной группы на 1-е сутки беременности отставал от массы животных контрольных крыс на 7,1%, за 1 неделю - на 31,40%, за 2 неделю – на 15,71%, за 3 - неделю

на 18,79%. Среднее количество крысят в опытной группе было на 14,3% меньше, чем в контрольной. Продолжительность беременности и контрольных и опытных группах была практически одинаковой.

Исследование массы плодов и плацент у крыс, показали, что у крыс на 11-15 сутки беременности в опыте по сравнению с физиологической беременностью масса плода снизилась на 20%, масса плаценты - на 29%. При дальнейшем введении крысам свинца (16-20 сутки беременности) отмечен срыв компенсаторных процессов в системе мать-плацента-плод. При этом по сравнению с соответствующим сроком физиологической беременности масса плода снизилась - на 70%, масса плаценты - на 56%. Вскрытие рогов матки крысы, получавшей свинец показало, что 20,97% плодов после имплантации погибли. На 21-22 сутки беременности после имплантации погибло 40,82% плодов. Масса оставшихся живых плодов по сравнению с соответствующим сроком физиологической беременности, снизилась в среднем на 75%.

Исследования постнатального развития показали, что в опытной группе животных в первую неделю погибло несколько больше крысят, что составило 5,97%, в контрольной - 3,03%. В течение второй недели после родов в опыте погибло 8,96% крысят, в контроле - 5,05%. Наблюдения за развитием родившихся крысят по показателям прироста их массы тела показали, что масса тела новорождённых крысят, матери которых получали свинец во время беременности, была достоверно снижена по сравнению с контрольными показателями, отставание в массе составило 36,99% ($p < 0,05$). Через 10 суток внеутробного развития отставание прироста массы составило 12,63%, через 20 суток - 31,29%, через 1 месяц - 35,78%, через 1,5 месяца - 35,91%, через 2 месяца - 38,37%. В возрасте 2,5 месяца масса тела контрольных и опытных животных составляла соответственно $180,88 \pm 5,03$ и $110,70 \pm 3,50$ ($p < 0,05$).

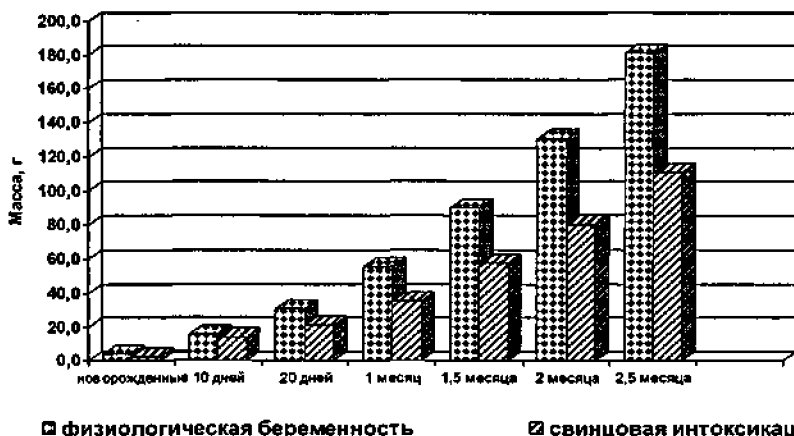


Рис. 1. Прирост массы потомства белых крыс в постнатальном периоде при физиологической беременности (контроль) и при свинцовой интоксикации (опыт).

3.2. Особенности внутриутробной оксификации скелета конечностей белых крыс при физиологической беременности (контроль) и при свинцовой интоксикации (опыт)

При анализе результатов выявлено, что ацетат свинца вызывает интоксикацию организма матери, а также оказывает прямое остеотоксическое воздействие на плод. Обладая способностью проникать через плацентарный барьер, ацетат свинца ведёт к нарушению темпов внутриутробной оксификации хрящевых закладок скелета плодов. Установлено, что центры окостенения в хрящевых закладках передних конечностей появляются на сутки раньше, чем в задних, причём процесс окостенения происходит с запозданием. Исследуя морфометрические размеры первичных точек оксификации зачатков конечностей плодов 20-ти суток и новорожденных крысят опытной группы установлено, что максимальная длина точек окостенения зачатков верхних конечностей (плечевая, лучевая, локтевая) снижена: у плодов 20-ти суток на 2,8-18%; у новорожденных I-ых суток на - 5-35%; максимальная ширина точек окостенения зачатков этих же конечностей снижена: у плодов 20-ти суток на 2,8- 18%; у новорожденных - на 15-35%; максимальная длина точек окостенения зачатков длинных трубчатых костей нижних конечностей (бедренная, большеберцовая) снижена: у плодов 20-ти суток на 19%, у новорожденных I-ых суток - на 5-25% (рис. 2, 3) максимальная ширина точек окостенения зачатков этих же костей также снижена: у плодов 20-ти суток - на 2-16%; у новорожденных — на 7-30%. Таким образом, прослеживается тенденция снижения размеров участков окостенения костной ткани.

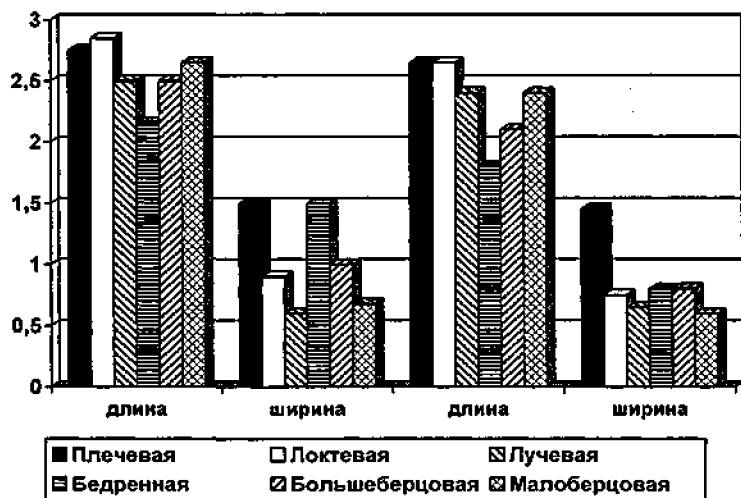


Рис. 2. Средние величины зачатков окостенения в закладках костей конечностей скелета 20 суточных плодов в контроле и при введении ацетата свинца (мм).

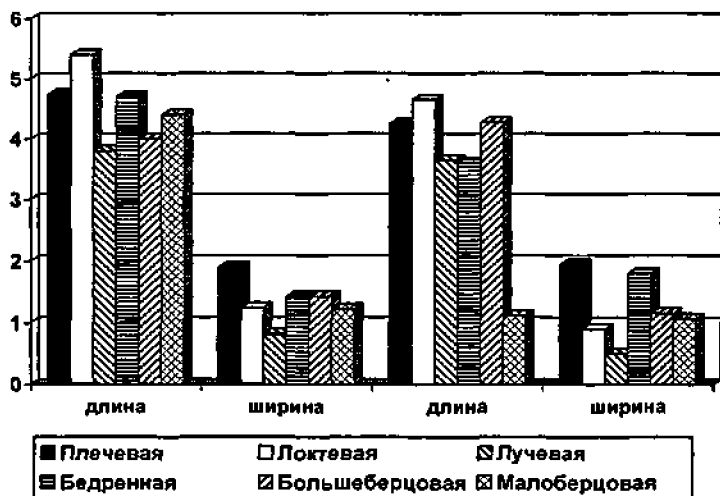


Рис. 3. Средние величины зачатков окостенения в закладках конечностей скелета новорожденных в контроле и при введении ацетата свинца (мм).

3.3 Морфофункциональные особенности развития костной ткани крысят от матерей при физиологической беременности (контроль) и от матерей, которые получали интоксикацию свинцом (опыт)

При гистохимическом изучении костей крысят, матери которых находились в условиях свинцовой интоксикации, выявлены значительные отличия в сравнении с животными контрольной группы. Хондроциты эпифизарной пластинки трубчатых костей животных контрольной группы в 30-ти и 60-ти суточном возрасте накапливают эозиновый краситель. Хондроциты индифферентного хряща накапливают основные и кислые белки от $2,30 \pm 0,22$ услов. ед. до $4,65 \pm 0,46$ услов. ед. В цитоплазме хондроцитов этой зоны у новорожденных крысят выявляется гликоген, количество которого с возрастом животных уменьшается от $3,00 \pm 0,28$ услов. ед. до следов в 60-суточном возрасте. Реакция на глюкозаминогликаны (ГАГ) в межклеточном веществе противоположная реакции на гликоген. Если у новорожденных животных интенсивность реакции на ГАГ межклеточного вещества зоны индифферентного хряща достигает $3,25 \pm 0,21$ услов. ед., то в возрасте 60 суток – $5,0 \pm 0,52$ услов. ед. У крысят опытной группы содержание основных и кислых белков в хондроцитах в среднем меньше почти на балл, гликогена – больше, чем в контроле, около балла, а ГАГ меньше – около 0,5 балла. В опыте наблюдается сужение эпифизарной пластинки дистального эпифиза бедренной кости на 36,6% ($p < 0,05$, табл. 3). Края его неровные и границы между зонами являются сглаженными. Изменяется зональное строение эпифизарного хряща, увеличивается количество промежуточ-

ного вещества в зоне индифферентного хряща и пролиферации. Количество клеток в зоне индифферентного хряща также уменьшено. Ширина этой зоны уменьшилась на 14,8% ($p < 0,05$). Причём уменьшение толщины у животных контроля начинается с 20 – 30 – суточного возраста крысят, а в опыте – с 10 суток (см. табл. 3).

Зона пролиферации эпифизарного хряща у животных опыта сужена на 21,9% ($p < 0,05$, см. табл. 3). Здесь наблюдается сосредоточение клеток, которые формируют колонки, а хондроциты приобретают клинообразную форму. Местами эти колонки хондроцитов теряют свою непрерывность и продольное расположение. Они искривлены и прерываются часто участками промежуточного вещества. Между столбиками (колонками) хондроцитов в виде тяжей проникают коллагеновые фибриллы, окружённые промежуточным веществом. Наблюдается угнетение митотической активности клеток и отмечены лишь одиночные фигуры митозов; количество пролиферирующих клеток уменьшается в среднем на 45,48% ($p < 0,05$, см. табл. 3). В этой зоне появляются клетки типа фибробластов, которые лежат в недостаточно сформированном фибриллярном матриксе. Хондроциты этой зоны богаты основными и кислыми белками. С возрастом животного происходит накопление основных и кислых белков от $3,21 \pm 0,31$ услов. ед. до $5,00 \pm 0,48$ услов. ед. В этой же зоне происходит перераспределение интенсивности реакции на основные белки в хондроцитах. Снижение основных белков в хондроцитах базального слоя и увеличение кислых белков в аналогичных клетках апикального слоя. Содержание гликогена в хондроцитах снижается. Практически у животных 30 суток гликоген в хондроцитах не выявляется. ГАГ в межклеточном веществе пролиферирующей зоны увеличивается у животных от рождения ($2,41 \pm 0,24$ услов. ед.) до 60 суток (до $4,50 \pm 0,41$ услов. ед.). У животных опытной группы содержание белков в хондроцитах этой зоны незначительно меньше, гликогена больше, а ГАГ – меньше, чем у животных контрольной группы (табл. 2).

В зоне дефинитивного хряща отмечается нарушение столбчатого размещения хондроцитов их количество уменьшено. Наблюдается нарушение синтетических процессов и усиление резорбции кости. Протяжённость этой зоны уменьшилась на 29,3% ($p < 0,05$, см. табл. 1). Границы между зонами сглаживаются. Зона дефинитивного хряща постепенно без резких границ переходит в зону деструктивного хряща, где процесс дифференцирования хряща в типичных костных балках ухудшается. В зоне деструкции наблюдается интенсивное разрушение хондроцитов, её толщина отвечает диаметру одной или нескольких клеток, границы её довольно чёткие. Эта зона непосредственно граничит с метафизом, откуда в неё проникают капилляры и остеогенные клетки. Такие глубокие структурные преобразования объясняются высокой метаболической активностью зоны остеогенеза (Родионова Н. В., 1989; Bovin G, Morel G., 1990), вследствие чего этот участок кости наиболее подвергается воздействиям экстремального фактора. В хондроцитах интенсивность реакции на основные и кислые белки слабее, чем в хондроцитах пролиферирующей зоны эпифизарной пластики. У животных, от рождения до 60 суток, содержание их в хондроцитах составляет от $2,51 \pm 0,21$ услов. ед. до $3,91 \pm 0,35$ услов. ед. Гликоген в хондроци-

тах выявляется только у животных до 10 суток после рождения, а количество глюкозаминогликанов в межклеточном веществе дефинитивной зоны увеличивается от рождения до 60 суток от $3,04 \pm 0,31$ усл. ед. до $4,55 \pm 0,44$ усл. ед..

У животных опытной группы реакция на основные и кислые белки в хондроцитах этой зоны значительно слабее, в то время как на гликоген выше (см. табл. 2). Реакция на глюкозаминогликаны межклеточного вещества дефинитивной зоны значительно ниже, чем животных контрольной группы (см. табл. 2).

Зона дефинитивного хряща сливается с зоной деструкции. Хондроциты в ней размещены в 1-2 ряда. В большинстве случаев в хондроцитах отсутствуют ядра, цитоплазма вакуолизирована, а хондроциты начинают гибнуть. В пустотах этой зоны встречаются эритроциты, эндотелиальные клетки и другие элементы крови. Непосредственно эта зона граничит с диафизом, из него проникают кровеносные капилляры. У животных, матери которых испытывали влияние свинцовой интоксикации, сохраняются остатки зоны деструкции лишь в периферических областях. Основные и кислые белки в хондроцитах выявляются в большом количестве, но незначительно меньше, чем у животных контрольной группы (от $2,84 \pm 0,28$ до $4,54 \pm 0,45$ усл. ед.). Гликоген в клетках этой зоны не выявлялся, а ГАГ интенсивно выявляется в межклеточном веществе (от $2,75 \pm 0,25$ до $4,00 \pm 0,41$ усл. ед., см. табл. 2).

Губчатое вещество зоны остеогенеза трубчатой кости от животных опытной группы среднезначенной структуры и представлено первичной и вторичной спонгиозой, граница между которыми довольно условная. В зоне первичного остеогенеза встречаются пустоты резорбции с остеокластами по периферии. Некоторые пустоты сливаются по несколько в одну большую, образовывая неправильной формы «пещеры». Глубина проникновения хрящевых трабекул в костно-мозговое вещество уменьшается, а губчатое вещество своими выростами в виде балок меньше погружаются в эту пустоту. Костно-мозговой канал заполнен желтым костным мозгом. Костные балки тонкие, разрозненные, межбалочные пространства и щели заполнены жировой и нежнотоволокнистой соединительной тканью. Остеоциты более мелкие, изменённой формы с гиперхромными ядрами, нередко размещаются одиночно. Отмечается уменьшение количества остеобластов и длина трабекул первичной спонгиозы, по сравнению с животными из контроля, уменьшилась на 46,1% ($p < 0,05$). Уменьшение длины трабекул спонгиозы у животных контрольной группы начинается с 10 – суточного возраста, а у животных в опыте с 20 суток. в сравнении с длинными трубчатыми костями контрольных животных (см. табл. 1).

Остеобласты размещаются короткими цепочками или разрозненно. Наблюдается отсутствие остеонидного вещества возле них. Губчатое вещество занимает большую площадь за счёт уменьшения толщины компактного пласта. Деструктивные изменения оказываются и в компактном веществе, которое содержит пласт остеонда с одним, или двумя рядами остеобластов, число которых в первичной спонгиозе уменьшено на 20,4 % ($p < 0,05$).

При морфометрическом изучении на продольных срезах середины зоны диафиза длинных трубчатых костей обращает на себя внимание активная структурная перестройка, которая ведет к постепенному замещению первич-

ной грубоволокнистой ткани компактной пластинчатой и линии склеивания перерываются. Костная ткань насыщается минеральными веществами. Происходит замедленная перестройка первичных остеонных генераций на вторичные. Гаверсовы системы приобрели структуры, которые характерны для молодой кости. Регрессивные изменения в компактной ткани подтверждаются также расширением маломинерализованного костного вещества, внешних и внутренних окружающих пластинок при одновременном сужении остеонного пласта. Отмечается торможение апозиционного роста. Глубокая перестройка структуры кости регрессивного характера при свинцовой интоксикации матерей объясняется дисбалансом в интенсивности биосинтеза основных компонентов костного матрикса и снижением минеральной насыщенности скелета. В основном веществе много ниш резорбции с большими темными клетками по периферии и накоплением некротичных масс.

Таблица 1 Морфометрические изменения эпифизарной хрящевой пластинки и суставного хряща длинных трубчатых костей белых крыс при физиологической беременности (контроль) и при интоксикации свинцом (опыт)

Исследованные животные сутки	Толщина эпифизарной пластинки, мкм	Толщина зоны индифферентного хряща, мкм	Толщина зоны пролиферирующего хряща, мкм	Толщина зоны дефинитивного хряща, мкм	Длина трабекул первичной спонгиозы, мкм	Количество остеобластов в первичной спонгиозе, шт	Количество пролиферирующих клеток в зоне пролиферации, шт	Толщина суставного хряща, мкм
1.КОНТРОЛЬ Новорожденные	235,09±16,00	21,65±2,95	126,48±10,13	86,96±6,64	345,08±28,83	38,17±3,48	10,13±1,68	187,34±13,96
10 суток	224,68±19,0	18,56±1,40	122,16±2,74	83,96±7,60	234,01±20,94	43,23±4,37	13,98±1,19	189,11±14,47
20 суток	166,77±13,46	16,14±1,29	96,29±4,57	54,34±5,31	97,09±8,95	57,87±5,42	25,97±2,64	206,19±20,40
30 суток	119,09±8,18	15,18±1,44	65,48±2,43	38,43±3,57	68,96±5,95	89,18±7,48	38,19±3,65	217,68±20,91
60 суток	106,09±7,47	14,90±0,54	64,76±5,48	29,86±1,50	45,78±4,11	108,58±9,67	45,19±4,00	238,91±21,41
2.ОПЫТ Новорожденные	200,54±18,51	18,94±1,69	109,22±12,68	72,38±6,12	186,83±15,05*	27,13±1,68*	8,17±0,78	165,18±12,20
10 суток	168,91±14,81*	17,22±1,41	85,16±8,73*	66,53±5,93*	169,79±12,06*	31,19±2,78*	9,48±0,99*	169,71±13,68
20 суток	135,28±10,81	15,68±1,89	73,37±6,80*	46,23±4,76	89,04±7,08	39,69±3,64	18,26±1,46*	178,69±14,93
30 суток	101,46±8,52	14,32±1,36	54,02±5,28	33,12±3,11	54,98±5,16	59,68±4,84*	23,18±1,58*	196,15±15,29
60 суток	75,02±6,14*	13,68±1,20	39,67±3,65*	21,67±2,56*	29,68±2,19*	84,13±7,69	30,50±3,15*	218,46±20,86

* Достоверные различия $p < 0,05$

Таблица 2. Гистохимические показатели активности хондроцитов и межклеточного вещества энфизарной пластинки трубчатых костей крысят от рождения до 60 суток (услов. ед.)

Исследуемые животные	Хондроциты индифферентной зоны			Хондроциты пролиферирующей зоны			Хондроциты дефинитивной зоны		
	Основные и кислые белки	Гликоген	Глюкозаминогликаны межклеточного вещества	Основные и кислые белки	Гликоген	Глюкозаминогликаны межклеточного вещества	Основные и кислые белки	Гликоген	Глюкозаминогликаны межклеточного вещества
Контроль									
Новорожденные	2,30±0,22	3,56±0,34	3,25±0,21	3,21±0,31	3,00±0,36	2,41±0,24	2,51±0,21	2,54±0,21	3,04±0,31
Животные 10 сут	2,64±0,16	3,00±0,28	3,66±0,31	3,64±0,38	2,81±0,28	3,00±0,32	2,94±0,29	1,86±0,18	3,35±0,37
Животные 20 сут	3,00±0,32	1,74±0,14	4,25±0,41	3,86±0,54	0,45±0,15	3,51±0,27	3,21±0,30	Следы	4,00±0,41
Животные 30 сут	3,90±0,31	0,56±0,01	4,64±0,42	4,48±0,42	Следы	4,00±0,40	3,54±0,34	Следы	4,35±0,43
Животные 60 сут	4,65±0,46	Следы	5,00±0,52	5,00±0,48	Следы	4,50±0,41	3,91±0,35	Следы	4,55±0,44
Опыт									
Новорожденные	1,15±0,01	4,44±0,41	2,81±0,26	3,54±0,35	3,91±0,32	2,00±0,21	1,25±0,11	3,98±0,37	2,75±0,25
Животные 10 сут	1,34±0,01	4,11±0,46	3,00±0,32	3,86±0,38	3,54±0,31	2,50±0,25	1,54±0,15	3,51±0,35	2,96±0,29
Животные 20 сут	2,10±0,12	2,81±0,28	3,75±0,31	3,94±0,36	2,00±0,24	3,12±0,30	2,34±0,21	2,81±0,17	3,26±0,31
Животные 30 сут	2,86±0,20	1,16±0,11	4,00±0,42	4,28±0,40	0,54±0,01	3,75±0,32	2,50±0,25	0,91±0,07	3,52±0,35
Животные 60 сут	3,77±0,32	0,51±0,01	4,52±0,42	4,76±0,47	0,37±0,01	4,00±0,40	2,84±0,34	Следы	4,00±0,41

Препараты продольных срезов середины диафиза содержат участки с разной интенсивностью окраски, которая имеет вид мозаики. Эти мозаичные участки сменяют друг друга и костная ткань выглядит "пятнистой". В компактном веществе проявляются признаки остеопороза, который сопровождается лакунарной резеткостью костных балок, уменьшением площади компактного вещества. По ходу численных мозаичных полос отмеченные участки атрофии костной ткани. Все это свидетельствует о глубокой морфофункциональной перестройке. В компактной ткани диафиза наблюдается незначительная депрессия основных клеточных структур кости. Резорбтивная деятельность остеокластов приводит к увеличению костно-мозгового канала. Костная ткань содержит меньше промежуточного вещества.

Отмечается сужение внешнего пласта периоста трубчатой кости крысы на 17,1 % ($p < 0,05$, табл. 3) и границы между внешним и внутренним (остеонным) пластом отличаются неровностью. Встречаются одиночные фибробласты и эластичные волокна. Остеогенные клетки малоактивные и слабо пролиферируют. Среди них довольно редко встречаются фигуры митозов. Участки, которые интенсивно окрашены, чередуются с бледными в тех местах, где проходят деструктивные изменения. Это свидетельствует о нарушении обмена кальция. Новообразовавшаяся костная ткань прозрачная и рыхлая. Средняя толщина периоста у животных контрольной группы в 1,5 раза больше, чем в зоне диафиза и составляет у 60 – сут. крысят $46,25 \pm 2,96$ мкм. (см. табл. 3). В опыте этот показатель достоверно снижается до $37,73 \pm 3,07$ мкм ($p < 0,001$). Общая ширина внутреннего (остеоного) пласта зоны диафиза уменьшилась на 7,2 % ($p < 0,05$); в метафизе ширина этого пласта – на 14,2 % ($p < 0,05$, см. табл.3).

На внешней поверхности эндооста часто встречаются поля резорбции или остеонидные или костные наросты. Количество остеобластов как в эндоосте, так и в периосте диафиза, на условную единицу площади гистосреза, уменьшилась на 29,3 % и 24,4 % ($p < 0,05$, см. табл.3). Это свидетельствует о том, что в зоне эндооста диафиза происходит замедление ростовых процессов. Наиболее выраженные перестройки в метафизах, где преимущественно накапливается свинец. Сравнительно с контролем отмечены разрежения и уменьшение количества костных трабекул с расширением костно-мозговых пространств. Об этом можно судить по снижению удельного объема костных трабекул в метафизах у опытной группы животных. Также, у животных в условиях поступления ацетата свинца в зонах метафиза отмечается увеличение количества остеокластов.

При поступлении в организм животных ацетата свинца наблюдается усиленная, сравнительно с контролем, резорбция кортикальной кости. Резорбция этой кости сопровождается разрастанием фиброзной ткани и происходит при участии остеокластов. На начальных стадиях развертывания процессов резорбции остеокласты концентрируются близ сосудов возле самой поверхности кости, давая начало костным лакунам, куда потом погружаются сосуды с фибробластическими клетками, которые их сопровождают, замещая кость.

В суставном хряще, также отмечены существенные отличия в строении между животными контрольной и опытной группами. В основном он

представлен дезорганизованными хрящевыми столбиками. Границы между зонами суставного хряща являются нечеткими и сглаженными. Преобладают функционально активные клетки с большим базофильным ядром. Отмечена гиперплазия хондроцитов на участках суставного хряща. Более всего деструктивных изменений испытывает средний пласт, который представлен хрящевыми клетками (хондроцитами). В них наблюдается угнетение биосинтетической и репродуктивной активности. Значительно изменяются поверхностные зоны суставного хряща, которые являются более молодыми. В зоне кальцинации следует отметить разрывы и фрагментацию базофильной линии. Это указывает на то, что в условиях свинцовой интоксикации увеличивается дисбаланс во взаимодействии хряща и кости; хрящевая ткань в этих условиях повреждается, некротизируется и кальцинируется. Средняя ширина суставного хряща у животных в опыте, по сравнению с контролем уменьшилась на 22,5 % ($p < 0,05$). Данные остеометрии свидетельствуют о задержке роста и формообразование длинных трубчатых костей скелета в условиях свинцовой интоксикации. Так, ширина дистального эпифиза бедренной кости уменьшилась на 14,3 % ($p < 0,05$) и ширина середины диафиза - на 19,8 % ($p < 0,05$). Проведенные гистологические исследования указывают на то, что строение эпифизарного и суставного хрящей метафизов и диафизов подопытной группы животных значительно отличается от контрольных.

Следует отметить и то, что в пределах одной изогенной группы хондроциты отличаются характером преобразований: одни из них уменьшаются в объеме, имеют плотную цитоплазму, в которой выделяют зоны просветления и вакуоли; другие отекающие, оптически-прозрачные, содержат липидные включения и бесструктурные образования, одиночные разрушенные органеллы. Таким образом, по данным морфометрии, гистохимии и электронной микроскопии, пребывание животных в условиях свинцовой интоксикации заметно влияет на процессы роста и формообразования длинных трубчатых костей скелета.

Таблица 3. Морфометрические изменения диафиза и метафиза длинных трубчатых костей крысят при физиологической беременности (контроль) и при интоксикации свинцом матерей (опыт)

Исследуемые животные	Толщина внешнего пласта периоста в диафизе, мкм	Толщина остеогенного пласта в диафизе, мкм	Толщина внешнего пласта периоста в метафизе, мкм	Толщина остеогенного пласта в метафизе, мкм	Количество остеобластов в эндоосте диафиза на единицу площади гистосреза, шт	Количество остеобластов в периосте диафиза на единицу площади гистосреза, шт
Контроль						
Новорожденные животные	12,61 ± 1,04	20,14 ± 1,92	18,91 ± 1,63	16,16 ± 1,71	24,95 ± 2,10	26,31 ± 1,64
Животные 10 суток	18,45 ± 1,53	27,88 ± 2,08	26,44 ± 2,14	23,46 ± 2,04	18,16 ± 1,75	21,04 ± 1,31
Животные 20 суток	26,53 ± 1,94	36,54 ± 2,94	29,85 ± 2,80	28,05 ± 3,00	14,48 ± 1,24	16,49 ± 1,03
Животные 30 суток	30,86 ± 2,64	45,13 ± 3,86	38,42 ± 3,00	36,94 ± 3,41	10,89 ± 1,00	14,89 ± 1,00
Животные 60 суток	36,88 ± 2,50	58,14 ± 4,64	46,25 ± 2,96	42,15 ± 5,76	8,23 ± 0,59	12,61 ± 1,90
Опыт						
Новорожденные животные	10,55 ± 0,91	18,41 ± 1,64	12,29 ± 1,14	12,38 ± 1,02*	20,05 ± 2,00	21,96 ± 2,00
Животные 10 суток	13,43 ± 1,03*	26,59 ± 2,05	18,44 ± 1,81*	17,92 ± 1,53*	16,47 ± 1,52	18,47 ± 1,48
Животные 20 суток	18,06 ± 1,54*	31,48 ± 3,00	25,68 ± 2,16	24,40 ± 2,04	12,89 ± 1,03	11,09 ± 1,03*
Животные 30 суток	24,14 ± 1,93*	41,51 ± 4,15	30,45 ± 3,00	30,37 ± 3,00	8,42 ± 0,93	10,05 ± 1,00*
Животные 60 суток	28,86 ± 2,38*	53,96 ± 5,01	37,73 ± 3,07*	35,25 ± 3,67	5,82 ± 0,75*	9,53 ± 0,86

* Достоверные различия $p < 0,05$

ВЫВОДЫ

1. Действие солей свинца на организм беременных белых крыс зависит от времени воздействия и приводит к развитию плацентарной недостаточности наиболее интенсивно проявляющейся в лабиринтной зоне плаценты и сопровождается следующими дегенеративными изменениями:

- приближением кровеносных сосудов лабиринта к краю трофобластической балки и истончением цито- и синцитиотрофобласта;

- вакуолизацией и просветлением цитоплазматического матрикса;

- образованием полостей в цитоплазме компонентов трофобласта;

2. Возникающие в условиях свинцовой интоксикации морфофункциональные изменения гемато-плацентарного барьера приводят к уменьшению массы плода, плаценты, отставанию по темпам роста и развития молодых животных, к нарушению компенсаторно-приспособительной реакции системы мать-плацента-плод.

3. Наиболее чувствительные и максимально ранимые структуры костей скелета при свинцовой интоксикации матерей являются трубчатые кости (локтевая, бедренная, большеберцовая), а в них эпифизарный хрящ и периостальная зона диафиза.

4. Интоксикация организма беременных самок крыс ацетатом свинца в дозе 45 мл/кг/сут вызывает деструктивные изменения в метаэпифизарной пластинке роста, в зоне диафиза и суставном хряще длинных трубчатых костей, которые проявляются:

- в нарушении зональной структуры;

- в нарушении строения тканевого матрикса;

- в нарушении структуры хрящевых и остеогенных клеток;

- в нарушении процессов пролиферации, дифференцировки и синтетической активности хондробластов, хондроцитов остеогенных клеток;

- задержкой процессов роста и формообразования костной ткани.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты дополняют данные по особенностям строения, роста и формообразования длинных трубчатых костей скелета при физиологической беременности крыс и могут быть использованы в научных исследованиях опорно-двигательного аппарата и в учебном процессе при изложении вопросов влияния экологических факторов на костный скелет.

2. Проведённые исследования поясняют структурно-функциональные изменения, которые происходят в длинных трубчатых костях скелета при интоксикации организма матерей солями свинца.

3. Описанные морфофункциональные изменения могут быть использованы клиницистами для обоснования лечебно-профилактических мероприятий с целью предотвращения развития патологических процессов в костях скелета при свинцовой интоксикации, или же её фармакологической коррекции

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Шубина, О. С. Особенности гемато-плацентарного барьера при интоксикации организма / О. С. Шубина, Л. В. Грызлова, Ю. В. Макеева // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии: Сб. научн. трудов. Сибирский государственный мед. ин-т – Томск, 2004. – С. 360-361.
2. Шубина, О. С. Морфологические проявления адаптации гемато-плацентарного барьера при интоксикации свинцом / О. С. Шубина, Л. В. Грызлова // Фундаментальные исследования. – 2004. – №1. – С.131.
3. Грызлова, Л. В. Влияние свинца на плод и новорожденного /Л. В. Грызлова, О. С. Шубина // Актуальные вопросы морфологии, физиологии и биохимии: Сб. научн. трудов. Мордов. гос. пед. ин-т. – Саранск, 2005. – С. 46 – 50
4. Грызлова, Л. В. Влияние свинца на систему плацента – плод. /Л. В. Грызлова, Ю. В. Макеева, О. С. Шубина // Экология и жизнь: материалы VIII международной научно-практической конференции. – Пенза, 2005. – С. 64 – 66.
5. Шубина, О. С. Особенности энхондральной оксификации скелета белых крыс. / О. С. Шубина, Л. В. Грызлова // Современные наукоёмкие технологии. – 2006. – № 2 – С. 103.
6. Грызлова, Л. В. Морфофункциональные изменения в системе мать-плацента-плод при экзогенном воздействии свинца / Л. В. Грызлова, О. С. Шубина // Приоритетные направления науки, техники и технологий: материалы II научной конференции с международным участием. – Астрахань, 2006. – С. 103.
7. Шубина, О. С. Характеристика гемато-плацентарного барьера плаценты белых крыс при беременности / О. С. Шубина, Л. В. Грызлова // Морфологические ведомости. – Москва - Берлин, 2006. – № 1-2. – С. 78 – 80.
8. Грызлова, Л. В. Влияние свинцовой интоксикации на морфофункциональное развитие плаценты / Л. В. Грызлова // Актуальные проблемы биологии в животноводстве: материалы IV Международной конференции, посвященной 100- летию со дня рождения академика РАСХН Н. А. Шманенкова. – Боровск, 2006. – С. 233 – 234.
9. Грызлова, Л. В. Влияние свинца на потомство белых крыс / Л. В. Грызлова, Ю. В. Киреева, О. С. Шубина // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 5. – С. 68.

Лицензия ЛР №040312 от 24.03.97, ПД № 18-0088 от 09.04.01.
Подписано в печать 06.10.06 Формат 60х84 1/16.
Печать ризография. Гарнитура «». Усл. печ. л. 1.18. Уч.-изд. л.0.99.
Тираж 100 экз. Заказ № 80

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Мордовского государственного педагогический институт им. М. Е. Евсевьева»
Лаборатория множительной техники
430007, Саранск, ул. Студенческая, 11а

