**Пошелок Денис Михайлович. Ремоделювання кісткової тканини після гіпотермії (експериментальне дослідження).- Дисертація канд. біол. наук: 03.00.19, НАН України, Ін-т проблем кріобіології і кріомедицини. - Харків, 2015.- 189 с.**

Национальная академия медицинских наук Украины

Государственное учреждение «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко Национальной академии медицинских наук Украины»

На правах рукописи

**Пошелок Денис Михайлович**

УДК: 57.043 : 57.084.1–615.832.96 : 616.71

**РемоделИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ гИпотермИИ**

(экспериментальное исследование)

(03.00.19 – криобиология)

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель

д-р биол. наук, проф. Дедух Н. В.

Харьков-2014

**СОДЕРЖАНИЕ**

|  |  |
| --- | --- |
| Список условных обозначений, символов, единиц, сокращений и терминов……………………………………………………………………… | 4 |
| Введение……………………………………………………………………… | 5 |
| **Раздел 1. Моделирование и ремоделирование кости (аналитический обзор литературы)** …………………………………………………………… | 16 |
| 1.1. Ремоделирование костной ткани………………………………………… | 16 |
| 1.2. Структурно-метаболические особенности костной ткани в условиях действия гипотермии………………………………………………………… | 26 |
| **Раздел 2. Материалы и методы исследования**…………………………… | 41 |
| 2.1. Экспериментальная часть……………………………………………….. | 41 |
| 2.2. Методы исследования………………………………………………....... | 45 |
| **Раздел 3. Анализ температуры тела крыс разного возраста в процессе отработки методики моделирования легкой гипотермии** ……………. | 50 |
| 3.1. Анализ показателей температуры тела животных в начале эксперимента (утро) в течение 5 суток……………………………………… | 50 |
| 3.2. Анализ температуры тела животных по суткам (1-5 сутки) и часам (начало, 1, 3, 5 часов) в течение эксперимента……………………………… | 52 |
| 3.3. Анализ показателей температуры тела животных в течение 7 суток после окончания холодового действия …………………………………… | 54 |
| **Раздел 4. Ремоделирование губчатой кости после гипотермии**…...…… | 57 |
| 4.1. Влияние гипотермии на губчатую кость 6-месячных животных…… | 57 |
| 4.1.1. Контрольные животные……………………………………………….. | 56 |
| 4.1.2. Влияние гипотермии на губчатую кость 6-месячных животных…… | 61 |
| 4.2. Изучение структурной организации губчатой кости 24-месячных животных после гипотермии………………………………………………… | 83 |
| 4.2.1. Контрольные животные……………………………………………….. | 83 |

|  |  |
| --- | --- |
| 4.2.2.Состояние губчатой кости 24-месячных животных после гипотермии | 87 |
| **Раздел 5. Структурная организация компактной кости крыс разного возраста после действия гипотермии**………………………………..…… | 106 |
| 5.1. Особенности структурной организации компактной кости 6-месячных животных после действия гипотермии……………………………………… | 106 |
| 5.2. Структурная организация компактной кости у 24-месячных крыс после гипотермии……………………………………………...………...…... | 134 |
| **Раздел 6. Исследование *in vitro* особенностей колониеобразования мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крыс после холодового воздействия**……………………………………….…………… | 148 |
| **Раздел 7. Исследование минеральной плотности костной ткани, макро- и микроэлементов бедренной кости крыс после гипотермии**… | 155 |
| 7.1. Исследование минеральной плотности костной ткани у крыс различного возраста …………………………………………………………. | 155 |
| 7.2. Изучение макро- и микроэлементов бедренной кости 6-месячных крыс после гипотермии……………..…………………………….…………… | 156 |
| 7.3. Изучение макро- и микроэлементов бедренной кости 24-месячных крыс после гипотермии………..……………………..……………………….. | 159 |
| **Выводы** ………..……………………..………………………………..… | 164 |
| **Список используемой литературы**…… ……………………………….... | 169 |

**СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ, СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ**

|  |  |
| --- | --- |
| СККМ | стромальные клетки костного мозга |
| КМ | костный мозг |
| гЭПС | гранулярная эндоплазматическая сеть |
| МСК | мезенхимальные стромальные клетки |
| Apaf-1 | apoptotic protease - activating factor - 1 |
| Bcl-2 | фактор антиапоптического действия |
| BMU | комплекс клеток, включающий остеобласты, остеокласты, активные мезенхимальные клетки, а также капиллярные петли |
| BSU | костная структурная единица суммарной активности результатов ремоделирования |
| Cbfa1 | связующий фактор альфа 1 |
| M-CSF | колониестимулирующий фактор макрофагов |
| OPG | остеопротегерин |
| RANK | рецептор активатора ядерного фактора каппа-Б |
| RANKL | лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа-Б |
| Runx2 | связующий транскрипционный фактор 2 |
| TRPV | transient receptor potential vanilloid |
| рН | водородный показатель |
| цАМФ | циклический аденозинмонофосфат |

**ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность темы**

Распространенность костной патологии во всем мире – одна из основных медико-социальных проблем современности. Костная система активно взаимодействует с другими системами организма и в его составе реагирует на действие экзогенных и эндогенных факторов. На этапах жизнедеятельности костная ткань постоянно перестраивается. Это происходит путем ремоделирования, в основе которого лежат два взаимосвязанных процесса: резорбция (пазушная, остеокластическая и остеоцитарная) и костеобразование (в результате деятельности остеобластов) [10, 104].

Ремоделирование кости протекает по разным типам (физиологическое и патологическое). Для физиологического типа ремоделирования кости характерна потеря кальция до 1 % в год. При патологическом ремоделировании (когда преобладают процессы резорбции над костеобразованием) потеря кальция может составлять от 2 % и более, что приводит к уменьшению костной массы у людей пожилого и старческого возраста до 50 % [45, 51, 84].

На ремоделирование костной ткани влияет ряд факторов, среди которых гендерные особенности, активность метаболических процессов, эндокринный баланс организма, образ жизни человека [7, 19, 109, 119]. Костная ткань очень чувствительна к экзогенным негативным воздействиям (травма, различные вредные экологические факторы) поскольку она тесно связана с нервной, эндокринной, сосудистой и мышечной системами [60, 61, 84, 149]. Изучение особенностей ремоделирования кости в условиях действия различных неблагоприятных факторов является фундаментальной проблемой биологии и медицины.

Механизмы, лежащие в основе процессов ремоделирования костных структур и их взаимосвязь в ответ на действие различных экзогенных факторов, до настоящего времени остаются не выясненными. Нарушение взаимосвязи процесса ремоделирования кости, а именно – преобладание резорбции над костеобразованием приводит к возникновению остеопении и остеопороза – метаболического заболевания, которое по распространенности занимает третье место после сердечно-сосудистых заболеваний и онкологии [54, 62].

Известно, что с возрастом метаболические процессы в организме замедляются [82]. Есть данные и о том, что у пожилых людей и стариков наблюдается снижение температуры тела (гипотермия) [117]. Сочетание этих двух факторов – замедление процессов метаболизма и хроническая гипотермия могут быть причиной различных нарушений в органах и тканях, в том числе и костной ткани [17, 18, 23, 102].

В литературе широко представлены исследования по влиянию гипотермии на особенности вентиляции легких, функцию головного мозга, периферические нервы, сердечную деятельность, кровообращение и кожу [31, 83, 88, 100, 102, 141, 146, 151]. Известны отдельные экспериментальные работы по изучению структурной организации суставного хряща в условиях действия гипотермии, где авторы доказывают, что общая глубокая гипотермия приводит к выраженным структурно-метаболическим изменениям в хондроцитах [21, 42, 120, 125]. Есть сообщения о действии локальной гипотермии на состояние костной ткани [16, 37].

Однако, практически, отсутствуют данные о влиянии общей гипотермии на морфо-функциональные характеристики костной ткани. Представлены единичные работы, где раскрывается негативное воздействие глубокой гипотермии на культивируемые клетки костного мозга и остеобласты [117, 158]. По разным причинам, во время некоторых видов производственной деятельности человек часто подвергается воздействию низких температур [46]. В связи с выше изложенным, изучение действия гипотермии на костную ткань является важным и актуальным.

**Связь работы с научными программами, планами, темами**

Диссертационная работа, выполненная на базе ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко НАМНУ», является составной частью исследований, выполняемых в рамках НИР. «Изучить механизмы развития остеопенических и остеопоротических нарушений скелета в условиях травматического повреждения длинных костей» (№ госрегистрации 0111U000068) автором исследовано развитие остеопении у животных и выделены морфологические критерии нарушений. В рамках темы: «Изучить ремоделирования костной ткани тел позвонков и структурную организацию межпозвонковых дисков в условиях остеопороза, отягощенного воздействием неблагоприятных экологических факторов» (№ госрегистрации 011U003015) автором было выполнено моделирование гипотермии у животных, а также проведен морфометрический, денситометрический анализ костной ткани бедренной кости опытных животных, проведен анализ минерального состава компактной кости.

**Цель исследования:** раскрыть особенности ремоделирования костной ткани крыс разного возраста после индуцированной гипотермии на основе комплексных исследований.

**Задачи исследования:**

1. Раскрыть тенденции развития науки по проблеме влияния гипотермии на организм и структурно-метаболическую перестройку костной ткани по данным литературы.

2. Разработать экпериментальную методику моделирования легкой гипотермии у крыс 6- и 24-месячного возраста.

3. Изучить процессы ремоделирования губчатой кости у крыс разного возраста после индуцированной гипотермии, используя морфологические, морфометрические, ультраструктурные показатели.

4. Исследовать процессы ремоделирования компактной кости крыс разного возраста после индуцированной гипотермии, используя комплекс морфологических методов.

5. Проанализировать *in vitro* колониеобразующую способность мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крыс разного возраста (6 и 24 месяца) после гипотермии.

6. Определить минеральную плотность костной ткани бедренных костей крыс разного возраста, а также минеральный состав (P, Ca/P, Mg, Zn, Fe, Cu) компактного вещества бедренной кости крыс после индуцированной гипотермии.

*Объект исследования* – ремоделирование компактной и губчатой костей крыс после индуцированной гипотермии.

*Предмет исследования –* температура тела крыс в процессе моделирования гипотермии; морфология и ультраструктурная организация клеток и матрикса бедренной кости крыс разного возраста после гипотермии; структурная организация кровеносных сосудов бедренной кости крыс; морфометрические показатели ремоделирования губчатой и компактной костной ткани; колониеобразующая способность стромальных клеток костного мозга крыс разного возраста после гипотермии, минеральная плотность костной ткани бедренной кости и микроэлементный состав компактного вещества бедренной кости крыс.

*Методы исследования:* морфологический, морфометрический, электронно-микроскопический, цитологический – для характеристики ремоделирования костной ткани; рентгеноспектральный флюоресцентный анализ – для определения макро- и микроэлементного состава компактного вещества бедренной кости крыс; денситометрический метод – для определения минеральной плотности костной ткани крыс; метод культуры клеток – для изучения колониеобразующей способности стромальных клеток костного мозга крыс после гипотермии. Для верификации цифровых показателей использованы статистические методы.

**Научная новизна полученных результатов**

Впервые на большом экспериментальном материале (202 белые лабораторные крысы) проведено комплексное исследование структурной организации костной ткани у крыс разного возраста после холодового воздействия, которое привело к гипотермическому состоянию организма (снижение температуры тела у 6-месячных крыс на 2,29 °С, а у старых животных – на 4,04°С). На основе результатов исследований сделано теоретическое обобщение, а также решена актуальная научная медико-биологическая задача по раскрытию особенностей ремоделирования костной ткани в условиях общей легкой (по классификации J.S. Tuli, 2009) гипотермии.

Комплексность исследования (изучение структурных и ультраструктурных изменений клеток и матрикса компактной и губчатой костной ткани животных разного возраста, определение морфометрических показателей, характеризующих ремоделирование костной ткани, а также определение минеральной плотности и микроэлементного состава кости) влияния гипотермии на костную ткань 6- и 24-месячного возраста и, особенно, на ее ремоделирование существенно отличает данную работу от имеющихся в литературе.

Установлено различное влияние гипотермии на организм 6- и 24-месячных животных при изучении температуры тела в динамике при моделировании состояния гипотермии, а также в восстановительный период. Температура тела 6-месячных животных в течение холодового воздействия снижается на 2,29 °С, а у 24-месячных – на 4,04 °С. Восстановление температуры тела у 6-месячных животных происходит гораздо быстрее, чем у животных 24-месячного возраста: у 6-месячных животных – на третьи сутки после окончания эксперимента, а у животных 24-месячного возраста – на 6 сутки после гипотермии.

Доказано, что даже небольшое снижение (на 2-4 °С) температуры тела животных оказывает негативное воздействие на ремоделирование кости. Выраженные изменения в костной ткани и красном костном мозге, как у 6-и, так и 24-месячных животных были зафиксированы на 3-7 сутки после окончания гипотермии. В результате проведенных экспериментальных исследований дополнены научные знания о негативном влиянии гипотермии на состояние кровеносных сосудов кости и установлена интегративная связь нарушений сосудистого русла и костной ткани.

Получены новые знания о влиянии гипотермии на клетки костного мозга. Установлено, что в клетках красного костного мозга развиваются деструктивные изменения, особенно выраженные в мегакариоцитах, ядра в которых были лизированы, а цитоплазма приобретала гомогенный вид. Впервые исследована колониеобразующая способность стромальных клеток костного мозга крыс после гипотермии. Доказано, что гипотермия угнетает пролиферативную активность культивированных стромальных клеток костного мозга, что приводит к снижению количества клеточных колоний и их площадей. На основании проведенных исследований в культуре клеток и электронно-микроскопического анализа выявлено, что гипотермия снижает количество стромальных клеток в костном мозге и негативно влияет на остеогенные клетки-предшественники, что может быть одной из причин нарушения ремоделирования костной ткани.

Получены новые знания об ультраструктурном состоянии клеток костной ткани крыс обеих возрастных групп после гипотермии. Впервые доказано, что большинство остеоцитов, как на костных трабекулах, так и в кортексе, имели деструктивные изменения в цитоплазме и ядре. В цитоплазме остеоцитов зафиксировано присутствие очагов деструкции в виде гомогенных масс, лизис участков плазматической мембраны, низкая плотность слабо развитых мембранных органелл. В ядре остеоцитов отмечено формирование расширенных перинуклеарных пространств, заполненных тканевой жидкостью. Ядра остеоцитов были представлены преимущественно гетерохроматином, а в части остеоцитов отмечены электронно-плотные фрагментированные ядра, что указывает на их гибель путем апоптоза.

Дополнены знания об изменениях в митохондриях в условиях гипотермии, которые связаны с набуханием и просветлением матрикса, очаговым лизисом мембран и крист, а также формированием гигантских митохондрий. Отмеченные нарушения сказываются на энергетическом обеспечении клеток, что является одним из механизмов их деструкции и гибели..

Выявлено, что гипотермия вызывает гибель остеоцитов, что подтверждается наличием большого количества лакун без клеток. У опытных животных обеих возрастных групп количество пустых лакун на все сроки наблюдения превышали показатели контрольных животных. Наблюдается явления остеоцитарного лизиса, что обусловливает достоверно выраженное расширение лакун остеоцитов. Площадь лакун остеоцитов у опытных животных, как 6-и, так и 24-месячного возраста на 28 сутки после гипотермии была большей, соответственно на 29,3 и 33,3 % по сравнению с показателями в контроле.

Впервые с помощью методов электронно-микроскопического анализа установлено, что гипотермия негативно сказывается на биосинтетической активности остеобластов, на что указывают значительные нарушения ультраструктурной организации гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС), митохондрий и структуры ядра.

Впервые проведен сравнительный анализ и получены новые знания о количественных показателях ремоделирования костной ткани у 6- и 24-месячных животных после легкой гипотермии. Доказано, что гипотермия вызывает изменения большинства морфометрических показателей, характеризующих ремоделирование костной ткани и приводит к дисбалансу процесса ремоделирования кости. Установлено, что площадь костных трабекул у опытных крыс 6-месячного возраста на 28-е сутки после гипотермии была снижена на 16 % по сравнению с контролем, а у 24-месячных животных – на 16,6 %. Количество остеоцитов на костных трабекулах у крыс 6-месячного возраста опытной серии была ниже, чем в контроле на 16,9 %, а численность пустых лакун без остеоцитов, наоборот, больше в 7,5 раза. У 24-месячных опытных животных количество остеоцитов на костных трабекулах было на 21,5 % меньше, а численность лакун без остеоцитов больше на 19,8 %, чем у 6-месячных крыс. После гипотермии у животных обеих возрастных групп были высокими показатели характеризующие резорбтивные процессы.

Впервые показано, что в условиях гипотермии у 24-месячных животных показатели численности полостей резорбции с остеокластами на 28 сутки после гипотермии превышают показатели опытных 6-месячных животных на 33,1 %. Наблюдаются значительные изменения в матриксе костных трабекул – трещины, расслоение межклеточного вещества с визуализацией коллагеновых волокон.

Получены новые данные о том, что у 6-месячных животных, в отличие от крыс 24-месячного возраста, на 28 сутки после гипотермии, отмечается сдвиг процесса ремоделирования кости в сторону костеобразования, что связано с повышением на 46 % количества резорбтивных полостей, заполненных активными остеобластами и макрофагами, т.е. наблюдается преобладание процессов деструкции над костеобразованием. Полученные данные свидетельствуют о том, что у 24-месячных крыс имеет место дисбаланс процесса ремоделирования кости с преобладанием резорбтивных процессов.

Впервые установлено, что влияние гипотермии приводит к снижению показателей минеральной плотности костной ткани, а также доказано изменение минерального состава (P, Ca/P, Mg, Zn, Gu, Fe) кости в результате действия гипотермии, особенно выраженное на 14 сутки у 24-месячных крыс. Отмечено повышение показателей P – на 9,9 %, Мg – на 13,4 %, Fe – на 56,4 % и Cu – в 3,5 раза по сравнению с контролем. Отношение Ca/P наоборот снизилось на 8,4 %. У 6-месячных животных изменения были менее выраженными. На 28 сутки после гипотермии у 6-месячных животных минеральный состав кости, по определяемым микроэлементам, нормализуется – показатели макро- и микроэлементам не отличаются от контрольных. У крыс 24-месячного возраста содержание фосфора и магния превышают контрольные показатели на 11,3 % и на 9,3 %, а соотношение Са/Р – ниже показателей 6-месячных опытных животных на 14,9 %, т.е. у 24-месячных животных на 28 сутки не происходит полного восстановления микроэлементного состава, характерного для контрольных животных.

**Практическая значимость полученных результатов**

Результаты комплексного экспериментального исследования по изучению особенностей ремоделирования костной ткани крыс разного возраста после действия общей легкой гипотермии могут быть использованы в цикле лекций профильных кафедр ВУЗов, а также в практической медицине (криомедицине, травматологии, ортопедии, стоматологии и ветеринарии) для прогнозирования неблагоприятных изменений в скелете и возможности восстановления в период реадаптации.

Результаты исследований внедрены в научную работу кафедры травматологии и ортопедии Харьковской медицинской академии последипломного образования МЩЗ Украины и Харьковского национального медицинского университета МОЗ Украины, кафедры анатомии человека ГУ «Луганский государственный медицинский университет» МОЗ Украины, кафедры общей хирургии, травматологии и ортопедии, оперативной хирургии, судебной медицины медицинского факультета ГВУЗ «Ужгородский национальный университет», отдела клинической физиологии и патологии опорно-двигательной системы ГУ «Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины », в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Результати досліджень впроваджено в науково-освітню роботу кафедри травматології і ортопедії Харківської медичної академії післядипломної освіти (МЩЗ України) та Харківського національного медичного університету (МОЗ України), кафедри анатомії людини ДЗ «Луганський державний медичний університет» (МОЗ України), кафедри загальної хірургії, травматології та ортопедії, оперативної хірургії, судової медицини медичного факультету ДВНЗ «Ужгородський національний університет», відділу клінічної фізіології та патології опорно-рухової системи ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

**Личный вклад соискателя**

Диссертант самостоятельно выполнил анализ литературных источников и написал литературный обзор, провел эксперименты по моделированию гипотермии у крыс, осуществлял температурный контроль организма крыс в период эксперимента. Участвовал в подготовке и выполнении эксперимента по изучению влияния гипотермии на состояние культивируемых стромальных клеток костного мозга. Диссертант принимал непосредственное участие в выполнении гистологического, ультраструктурного и цитологического анализов гистологических срезов костей и культивируемых клеток. Он самостоятельно выполнил морфометрические измерения определяемых показателей костной ткани и статистическую обработку полученных цифровых данных и их интерпретацию. Автором самостоятельно обобщены результаты исследований, сформулированы основные положения и обоснованы выводы.

**Апробация результатов диссертации**

Материалы исследования и результаты анализа фактического материала, основные положения и выводы диссертационной работы доложены на: научно-практической конференции «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології» (Харьков, 2011), научной конференции «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины» (Харьков, 2012), на 3-ем съезде Украинского общества клеточной биологии с международным представительством (Ялта, 2012), IY симпозиуме «Морфогенез органів і тканин під впливом екзогенних факторів», Симферополь (Алушта, 2013), научно-практической конференции с международным участием (для молодых ученых) «Актуальні проблемі сучасної ортопедії та травматології» (Харьков – Снов’янка, 2013), научно-практической конференции с международным участием «Вікові аспекти захворювань кістково-мязової системи» (Харьков, 2014), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології» (Харьков, 2014), XXXIII международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы» (Новосибирск, 2014), на 4-му з’їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародною участю (Ужгород, 2014).

**Публикации результатов исследований**

Результаты диссертации отражены в 15 опубликованных научных работах, из них 6 – в научных специализированных журналах, которые входят в перечень ВАК Украины, а также 2 – в Российских изданиях, включенных в наукометрическую базу РИНЦ, 1 патент Украины, 7 тезисов в материалах конференций и съездов.

**ВЫВОДЫ**

На 202 белых крысах 6- и 24-месячного возраста проведено комплексное морфологическое исследование структурной организации костной ткани после гипотермии, которое привело к снижению температуры тела у 6-месячных животных на 2,29 оС, а у 24- месячного возраста на 4,04 °С, что соответствует легкой гипотермии (по классификации J.S. Tuli, 2009). На основе результатов изучения структурных и ультраструктурных изменений клеток и матрикса компактной и губчатой кости животных разного возраста, определения морфометрических показателей, характеризующих состояние костной ткани, а также исследования минеральной плотности и микроэлементного состава кости у крыс после гипотермии решена актуальная научная медико-биологическая задача по раскрытию особенностей ремоделирования костной ткани в условиях общей легкой гипотермии. В связи с многообразными функциями костной ткани особенности ее ремоделирования находились в фокусе работы.

При проведении сравнительного анализа влияния легкой гипотермии на организм крыс 6- и 24-месячного возраста доказано, что температура тела снижалась интенсивнее у животных 24-месячного возраста, кроме того, у последних имело место удлинение восстановительного периода.

Установлено, что даже небольшое снижение (на 2-4 °С) температуры тела животных приводит к развитию деструктивных изменений в клетках кости – остеоцитах, остеобластах и остеокластах. В цитоплазме остеоцитов зафиксировано присутствие очагов деструкции в виде гомогенных масс, лизиса участков плазматической мембраны, преобладание слабо развитых мембранных органелл. В ядре остеоцитов формируются расширенные перинуклеарные пространства, заполненные тканевой жидкостью. Ядра остеоцитов представлены преимущественно гетерохроматином, в части остеоцитов отмечены электронноплотные фрагментированные ядра. Гипотермия вызывает гибель остеоцитов, что подтверждается достоверным превышением над контрольными показателями количества лакун без остеоцитов у опытных 6- и 24-месячных животных на все сроки исследования. Наблюдается явления остеоцитарного лизиса, что обусловливает достоверно выраженное расширение лакун остеоцитов. Площадь лакун остеоцитов у опытных животных 6- и 24-месячного возраста на 28-е сутки после гипотермии была большей, соответственно на 29,3 % и на 31,3 % по сравнению с контролем.

Изменение ультраструктурной организации клеток и матрикса костной ткани, вследствие действия гипотермии, обуславливает нарушение процесса ремоделирования костной ткани. Об этом свидетельствуют морфометрические показатели, характеризующие этот процесс: наблюдается снижение ширины костных трабекул, увеличение количества пустых лакун остеоцитов, появление очагов остеолизиса, уменьшение площади костных трабекул и расширение межтрабекулярных пространств. Выявлена активация резорбционных процессов, о чем свидетельствуют результаты исследования ультраструктурной организации остеокластов и численности резорбционных полостей на костных трабекулах, заполненных активными остеокластами. У животных 24-месячного возраста перечисленные явления были выражены в большей степени.

Зафиксированы структурные изменения клеток костного мозга межтрабекулярных пространств и мозгового канала, а также нарушение колониеобразующей способности стромальных клеток костного мозга крыс после действия гипотермии. Установлена интегративная связь нарушений сосудистого русла и костной ткани.

Под действием гипотермии снижаются показатели минеральной плотности костной ткани, а также имеет место дисбаланс минерального состава (P, Ca/P, Mg, Zn, Сu, Fe) кости в результате действия гипотермии.

Выявленные нарушения костной ткани характерны для остеопении и остеопороза. Чаще такие изменения прослеживаются у людей пожилого и старческого возраста. Из анализа литературы известно, что проблема гипотермии особенно актуальна для пожилых людей, так как доказано, что внутренняя температура тела снижается с возрастом (в физиологических пределах). Это происходит в связи с уменьшением способности организма вырабатывать тепло (по разным причинам), снижением активности термогенеза в бурой жировой ткани, сужением периферических сосудов. Есть данные о том, что у пожилых людей температура тела может быть 35,5 °С и даже ниже. В проведенном M. Mallet (2002) исследовании пациентов с гипотермией (легкая гипотермия – температура тела до 35 °С) указывается, что у 85 % из них был возраст старше 60 лет [127]. Эти данные указывают на важность исследования влияния гипотермии на костную ткань, как фактора риска развития остеопении и остеопороза.

В диссертационной работе на основе комплексного исследования решена актуальная научная задача – раскрыты основные особенности нарушения ремоделирования костной ткани в условиях общей легкой гипотермии у крыс разного возраста.

Анализ литературных источников свидетельствует, что гипотермия оказывает отрицательное влияние на структурно-метаболические показатели костной ткани. Выраженность действия гипотермии на костную ткань зависит от ее продолжительности и тяжести (границы снижение температуры тела). Однако в литературе имеются лишь единичные исследования относительно структурных изменений компактной и губчатой кости, ультраструктурной организации клеток кости. Практически отсутствуют данные об особенностях ремоделирования костной ткани крыс разного возраста в условиях гипотермии.

Отработана экспериментальная модель легкой гипотермии у крыс разного возраста и доказано, что пребывание крыс в холодовой камере (−20 °С) в течение 5 суток по 5 часов ежедневно приводит к снижению температуры тела у 6-месячных крыс на 5-е сутки на 2,29 °С, а у 24- месячных животных – на 4,04 °С. Восстановление температуры тела у 6-месячных животных наблюдается на 3 сутки после окончания эксперимента, а у 24-месячных крыс – через 6 суток после окончания холодового воздействия.

Гипотермия приводит к развитию структурных и ультраструктурных изменений в клетках и матриксе губчатой и компактной кости как у 6-и, так и у 24-месячных крыс, и оказывает отрицательное влияние на ремоделирование костной ткани, про что свидетельствуют качественные и количественные показатели, которые характеризуют этот процесс. Площадь костных трабекул в опытных 6- и 24-месячных крыс на 28-е сутки после гипотермии была на 16,0 и 16,6 % ниже по сравнению с контролем. Количество остеоцитов на костных трабекулах у опытных 6-месячных животных также было ниже, чем в контроле на 16,9 %, а число пустых лакун без остеоцитов, повышено в 7,5 раза. У 24-месячных животных эти показатели достоверно превышали показатели опытных 6-месячных животных.

Гипотермия негативно влияет на ремоделирование кости, активизируя деятельность остеокластов, что приводит к достоверному увеличению (по сравнению с контролем) численности пустых полостей резорбции на костных трабекулах у животных обеих возрастных групп. На 28-е сутки после гипотермии у 24-месячных животных количество полостей резорбции с остеокластами превышает показатели 6-месячных животных на 33,1 %, а число резорбционных полостей, заполненных остеобластами и макрофагами, было снижено на 46 %, что указывает на дисбаланс ремоделирования кости за счет повышения процесса резорбции. У 6-месячных животных, в отличие от 24-месячных, отмечается сдвиг процесса ремоделирования кости в сторону костеобразования, о чем свидетельствует увеличение количества резорбционных полостей, заполненных активными остеобластами и макрофагами.

Нарушение процесса ремоделирования кости связано и с негативным влиянием гипотермии на структурную организацию клеток кости – остеоцитов и остеобластов. В цитоплазме остеоцитов зафиксировано присутствие очагов деструкции в виде гомогенных масс, лизиса участков плазматической мембраны. В ядрах остеоцитов и остеобластов повышается содержание гетерохроматина, нарушается структура кариолеммы за счет формирования обширных перинуклеарных полостей, заполненных жидкостью. Снижается биосинтетическая активность остеобластов, на что указывает преобладание в цитоплазме слабо развитой эндоплазматической сети, деструктивные изменения в ядре, а также в митохондриях – набухание и лизис мембран и крист.

Нарушение процесса ремоделирования под влиянием гипотермии наблюдается и в компактной кости. Во всех слоях кортекса опытных крыс как 6-и, так, и 24-месячного возраста отмечена низкая плотность остеоцитов, а количество лизированных остеоцитов и остеоцитов с пикнозом ядра, а также лакун без остеоцитов было увеличено. Количество остеоцитов в кортексе опытных 24-месячных крыс на 7, 14 и 28 сутки было ниже, соответственно на 18,6; 17,9 и на 23,5 %, чем в аналогичные сроки у 6-месячных животных, а процент пустых лакун, соответственно, выше на 21,6; 23,5; 21,9%.

Гипотермия негативно влияет на состояние МСК КМ, подавляя их пролиферативную активность и способность образовывать клеточные колонии. Количество клеточных колоний в культурах КМ опытных 6-месячных животных, а также их площадь на 7-е сутки после гипотермии было ниже по сравнению с контролем на 34,5 и 40,1 %, соответственно. В культуре клеток КМ 24-месячных опытных животных выявляли лишь небольшие клеточные колонии. На 28-е сутки в клеточных колониях как 6-и, так и 24-месячных животных наблюдаются восстановительные процессы, что подтверждается повышением количества клеточных колоний и увеличением их размеров.

Гипотермии приводит к снижению показателей минеральной плотности костной ткани и нарушение ее минерального состава (P, Ca/P, Mg, Zn, Gu, Fe) как у 6-и, так и в 24-месячных крыс. На 14-е сутки у 6-месячных крыс наблюдается повышение, относительно контроля, содержание P и Mg, соответственно на 6,9 и 8,9 %, а также снижение на 9,2 % показателей соотношения Са/Р. У 24-месячных крыс отмечено увеличение показателей P – на 9,8 %, Мg – на 13,4 %, Fe – на 56,6 % по сравнению с контролем. Отношение Ca/P снизилось на 8,4 %. На 28-е сутки содержание макро-и микроэлементов у 6-месячных крыс нормализовалось, а у 24-месячных – показатель соотношения Са/Р снизился на 5,0 %. Содержание Р – превышало контрольные показатели на 11,3 %, а Мg – на 9,3 %. Показатели остальных микроэлементов не отличаются от контроля.