



ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ И ПРОГРЕССИРОВАНИЕ ОСТЕОПОРОЗА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

О.В. Фаламеева, М.А. Садовой, Ю.В. Храпова
Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии

Цель исследования. Изучение в эксперименте патогенетических изменений костной ткани при хроническом влиянии техногенных факторов окружающей среды.

Материал и методы. Исследования выполнены на 2-месячных крысах-самцах линий OXYS и Wistar. В качестве остеотропного вещества использовали внутрижелудочное введение водного раствора дибутилдифосфорнокислого натрия (ДБФКН) в течение четырех месяцев. В динамике эксперимента проводились остеоденситометрическое, морфологическое и биохимическое исследования костной ткани крыс обеих линий.

Результаты. При хроническом введении ДБФКН в минимально допустимых дозах в костной ткани крыс линии OXYS происходит изменение ремоделирования костной ткани, которое характеризуется отсутствием сопряженности рассасывания и образования новой кости, в результате чего гистологическая структура костной ткани приобретает неравномерное, мозаичное строение. Данными гистоморфометрии доказано разобщение процессов костного ремоделирования за счет неадекватного созидания костной ткани, причем эти изменения затрагивают преимущественно трабекулярную костную ткань. Имеются и изменения кортикальной кости, которые в некоторых случаях даже более выражены, чем изменения трабекулярной.

Заключение. При длительной экспозиции веществ техногенного характера может происходить нарушение процессов ремоделирования костной ткани, причем при наличии генетической предрасположенности к возникновению остеопороза техногенные факторы среды могут оказывать отрицательное влияние, изменяя нарушенный костный баланс, обусловленный снижением остеопластических функций, вызывая опосредованно активацию костной резорбции.

Ключевые слова: остеопороз, техногенные факторы, экспериментальное моделирование.

IMPACT OF TECHNOGENIC FACTORS
ON OSTEOPOROSIS ONSET AND PROGRESSION:
EXPERIMENTAL MODELING

O.V. Falameeva, M.A. Sadovoy, Yu.V. Khrapova

Objective. To study pathogenetic changes in bone tissue under a chronic impact of technogenic environmental factors in the experiment.

Material and Methods. Study was performed in 2-month-aged OXYS and Wistar male rats. Osteotropic effect was taken by water solution of natrium dibutilditiophosphoratum administered intragastrically during four months. Bone tissue specimens from rats of both lines were studied by means of osteodensitometry, morphology, and biochemistry in the course of experiment.

Results. In chronic administration of natrium dibutilditiophosphoratum in maximum allowable dozes the bone tissue of OXYS rats was characterized by alteration in remodeling process without coupling of bone absorption and new bone formation, resulting in inhomogeneous and mosaic structure observed in histological study. Histomorphometry proved disintegration of bone remodeling processes due to the inadequate bone building. These changes predominantly occur in trabecular bone, though they are also observed in the cortical tissue, and in some cases even more evidently.

Conclusion. Long-term exposure to technogenic substance can cause disturbance in bone tissue remodeling. Genetic disposition to osteoporosis could be enhanced by a negative effect of technogenic environmental factors, which change bone balance disturbed by decline in osteoplastic functions, and cause indirectly an activation of bone resorption.

Key Words: osteoporosis, technogenic factors, experimental modeling.

Hir. Pozvonoc. 2008;(2):73–79.

Формирование полноценного скелета определяется генетическими и социальными факторами, среди которых принципиальную роль играют генетическая предрасположенность и образ жизни [1, 8]. Среди прочих факторов риска возникновения остеопороза многими авторами рассматриваются техногенные факторы окружающей среды [3, 5, 7]. До сих пор нет единого мнения о значимости таких техногенных факторов риска.

В связи с этим цель настоящей работы – изучение в эксперименте патогенетических изменений костной ткани при хроническом влиянии техногенных факторов окружающей среды.

Материал и методы

Исследования выполнены на 2-месячных крысах-самцах линий ОХУС и Wistar, полученных из лаборатории разведения животных Института цитологии и генетики СО РАН. Были сформированы контрольная и экспериментальная группы (8–12 животных) из крыс каждой линии. Эксперименты выполнены в соответствии с «Прави-

лами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755). Все животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе со свободным доступом к корму и воде. В качестве остеотропного вещества использовали водный раствор дибутилдифосфорнокислого натрия (ДБФКН), который вводился внутривенно в дозе, эквивалентной 1 ПДК, в течение четырех месяцев. Остеотропные свойства ДБФКН описаны при моделировании вертебральной патологии на крысах линии WSS/M [2]. Патологическим механизмом нарушений в костной и хрящевой ткани при хроническом введении ДБФКН считали дестабилизацию окислительно-восстановительных процессов и ингибирование ацетилхолинэстеразы, которая вызывает нарушение ионного обмена в клетках. Для крыс доза ДБФКН LD₅₀ при внутривенном введении составляет 1417 мг на 1 кг массы тела. Следует заметить, что ДБФКН является одним из основных флотационных реагентов, применяемых в горно-

добывающей промышленности и цветной металлургии [2].

В динамике эксперимента через 1, 2 и 4 мес. животным под эфирным наркозом измеряли минеральную плотность костной ткани (МПКТ) методом дихроматической рентгеновской абсорбциометрии на остеоденситометре с использованием программы «Small animals». Определяли минеральную плотность всего скелета, позвоночника, передних и задних конечностей. Результаты выражали в г/см² и представляли как $M \pm m$.

Гистоморфометрическое исследование выполнено с помощью пакета программ «Motic Images Plus 2.0 ML». Для оценки состояния костной ткани измеряли статические количественные параметры (объем губчатой кости в процентах, ширину кортикального слоя в мкм), статические показатели, отражающие микроархитектонику губчатой кости (толщину трабекул в мкм), параметры костеобразования (толщину остеоида в мкм) и резорбции (эрозированную поверхность в процентах, число остеокластов на мм²), а также диаметр гаверсовых каналов.

Таблица 1

Показатели минеральной плотности костной ткани (г/см²) у крыс в динамике введения дибутилдифосфорнокислого натрия, $M \pm m$

Регион скелета	Крысы линии ОХУС		Крысы линии Wistar	
	контрольная группа	экспериментальная группа	контрольная группа	экспериментальная группа
Через 1 мес. после введения				
Тело позвонка	0,124 ± 0,110	0,126 ± 0,150	0,185 ± 0,020	0,183 ± 0,010
Задние конечности	0,145 ± 0,050	0,143 ± 0,180	0,232 ± 0,110	0,230 ± 0,070
Передние конечности	0,095 ± 0,070	0,091 ± 0,120	0,170 ± 0,040	0,163 ± 0,090
Весь скелет	0,122 ± 0,080	0,126 ± 0,160	0,184 ± 0,030	0,180 ± 0,080
Через 2 мес. после введения				
Тело позвонка	0,133 ± 0,110	0,136 ± 0,150	0,208 ± 0,020	0,192 ± 0,040
Задние конечности	0,162 ± 0,050	0,184 ± 0,180	0,275 ± 0,110	0,259 ± 0,210
Передние конечности	0,109 ± 0,070	0,106 ± 0,120	0,191 ± 0,040	0,208 ± 0,110
Весь скелет	0,137 ± 0,080	0,131 ± 0,160	0,222 ± 0,030	0,238 ± 0,960
Через 4 мес. после введения				
Тело позвонка	0,170 ± 0,010	0,138 ± 0,010*	0,272 ± 0,010	0,238 ± 0,18 0
Задние конечности	0,275 ± 0,050	0,194 ± 0,070*	0,361 ± 0,650	0,289 ± 0,300
Передние конечности	0,168 ± 0,070	0,108 ± 0,090*	0,239 ± 0,070	0,206 ± 0,090
Весь скелет	0,182 ± 0,080	0,138 ± 0,08*	0,272 ± 0,080	0,258 ± 0,480

* $P < 0,05$; $P < 0,001$, по сравнению с крысами соответствующей контрольной группы.

Для биохимических исследований образцы костной ткани механически очищали от остатков мягких тканей, от каждого образца отсекали костный фрагмент, который предварительно взвешивали и высушивали при 100 °С в течение одних суток для определения процента содержащейся в нем воды. Содержание микроэлементов в костной ткани определяли методом атомно-эмиссионной спектрометрии с высокочастотным индукционным плазменным разрядом. Содержание уоновых кислот в костной ткани определяли карбазоловым методом. Содержание сульфатированных гликозаминогликанов (С-ГАГ) определяли на спектрофотометре при длине волны 520 нм. Качественный состав протеогликанов исследовали методом электрофореза в 1 % геле агарозы в 10 мМ трис-буфере с рН 7,3 [6].

Статистическую обработку результатов проводили с вычислением средних арифметических значений (М), ошибки средней арифметической (m) и *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Ранее в наших работах показано, что изменение костной ткани у крыс

линии OXYS соответствует изменениям, которые наблюдаются в костной ткани у человека при системном остеопорозе, поэтому эти животные могут использоваться для изучения патогенеза заболевания и разработки способов его лечения. Снижение МПКТ, нарушение процессов ремоделирования за счет снижения костеобразующих процессов и нарушение минерализации костной ткани у крыс линии OXYS являются следствием происходящих на клеточном и тканевом уровнях изменений [4].

При денситометрическом исследовании костной ткани крыс линии Wistar в динамике эксперимента статистических различий в контрольной и экспериментальной группах не выявлено (табл. 1). При гистологической оценке костной ткани у крыс линии Wistar после введения ДБФКН отмечены изменения костной ткани, характеризующиеся некоторым истончением отдельных костных балок. Отмечается наличие фестончатых линий склеивания в трабекулах, некоторое их увеличение по сравнению с контрольными животными, что может свидетельствовать о повышении обменных процессов в костной ткани. В некоторых балках остециты расположены нерегулярно, встречаются единичные

бесклеточные лакуны. Кортикальный слой не изменен.

В динамике эксперимента при введении ДБФКН статистически значимые различия МПКТ с группами контрольных животных зарегистрированы у крыс линии OXYS через 4 мес. (табл. 1); достоверные различия МПКТ обнаружены по всем отделам скелета ($P < 0,001$; $P < 0,05$). Кроме того, отмечено, что у крыс линии OXYS имеется снижение темпов прироста МПКТ по сравнению с контрольными животными (рис. 1). Несмотря на отсутствие различий в средних значениях МПКТ у крыс Wistar контрольной и опытной групп, установлено, что у животных из опытной группы имеется достоверное снижение темпов прироста МПКТ по сравнению с контрольной группой. Такие изменения выявлены для всех исследуемых регионов скелета, но в большей степени они выражены по скелету в целом и по костной ткани конечностей.

Гистологическое исследование костной ткани позволило проанализировать патогенетические механизмы развития остеопороза под влиянием хронических техногенных факторов внешней среды. При обзорном просмотре гистологических препаратов костной ткани у крыс линии OXYS

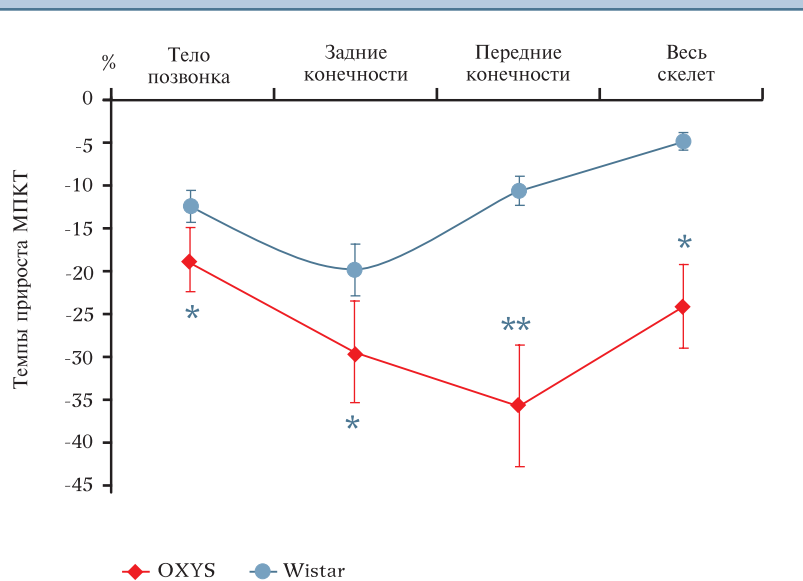


Рис. 1

Темпы прироста минеральной плотности костной ткани (МПКТ) у крыс линий OXYS и Wistar через четыре месяца после введения дибутилдифосфорнокислого натрия:

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$ по сравнению с крысами линии Wistar

через 4 мес. после введения ДБФКН обнаружено системное разряжение костной ткани с расширением костно-мозговых пространств. Наблюдается истончение балок, на некоторых участках – длинные поля прерванной трабекулярной сети (рис. 2а). Базофильные линии в трабекулах неровные, различной ширины, местами неотчетливы, заметны пустые лакуны остеоцитов (рис. 2б). Кортикальный слой очагово истончен с сохранени-

ем компактности, местами – достаточно широкий, но с расширенными гаверсовыми каналами неправильной формы (декомпактизация), что придает компактной кости губчатый вид (рис. 2в). Отчетливо видны процессы периостеоцитарной резорбции костного вещества, происходящие без явного участия остеокластов либо с их участием на более ранних этапах эксперимента. В некоторых препаратах отмечаются очаги остеокластиче-

ского рассасывания костной ткани, до двух-трех остеокластов в поле зрения (рис. 2г). Этот процесс сопровождается как расширением гаверсовых каналов, так и наличием признаков активного остеогенеза.

У крыс экспериментальной группы линии OXYS гистоморфометрические исследования показали достоверное уменьшение объема губчатой кости как в телах позвонков ($P < 0,01$), так и в бедренной кости ($P < 0,03$).

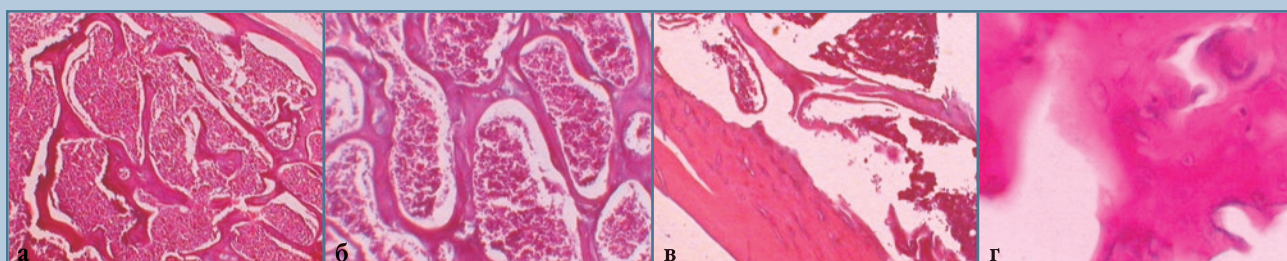


Рис. 2

Морфологические изменения костной ткани крысы линии OXYS после введения дибутилдифосфорнокислого натрия (окраска гематоксилином и эозином):

а – тело позвонка: расширение костно-мозговых пространств, прерывание трабекулярной сети; $\times 100$;

б – тело позвонка: истончение костных балок с признаками периостеоцитарной резорбции; $\times 200$;

в – кортикальный отдел бедренной кости: истончение эндостальной поверхности с увеличением полостей резорбции, очаги периостеоцитарной резорбции, декомпактизация; $\times 100$;

г – кортикальный отдел бедренной кости: очаги остеокластического рассасывания, увеличение полостей резорбции; $\times 400$

Таблица 2

Гистоморфометрические параметры костной ткани у крыс линии OXYS после 4-месячного введения дибутилдифосфорнокислого натрия, $M \pm m$

Параметры	Тело позвонка		Бедренная кость	
	контрольная группа (n = 7)	экспериментальная группа (n = 8)	контрольная группа (n = 7)	экспериментальная группа (n = 8)
Ширина кортикального слоя, мкм	89,3 ± 12,5	68,3 ± 9,6*	112,5 ± 18,2	109,6 ± 25,8*
Диаметр гаверсова канала, мкм	58,4 ± 6,2	70,1 ± 12,9	48,6 ± 3,1	39,9 ± 12,3**
Объем губчатой кости, %	45,1 ± 1,9	33,2 ± 4,8*	55,1 ± 4,8	43,8 ± 1,01*
Толщина трабекул, мкм	45,3 ± 2,7	32,6 ± 3,3*	50,3 ± 6,0	38,6 ± 7,2*
Толщина остеоида, мкм	2,7 ± 0,6	1,7 ± 0,3**	1,4 ± 0,9	1,9 ± 0,7
Эрозированная поверхность, %	10,1 ± 2,3	12,2 ± 0,9***	5,0 ± 1,1	4,7 ± 1,1
Количество остеокластов на мм ²	0,9 ± 0,1	2,8 ± 1,3 *	1,1 ± 0,3	3,2 ± 1,2 **
Количество остеобластов на мм ²	5,8 ± 3,2	6,2 ± 2,9	29,5 ± 3,6	30,3 ± 4,8

* $P < 0,01$;

** $P < 0,03$;

*** $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Таблица 3

Содержание гликозаминогликанов (мкг/мг) в костной ткани крыс через 4 мес. введения дибутилдифосфорнокислого натрия, $M \pm m$

Показатели	Крысы линии OXYS		Крысы линии Wistar	
	контрольная группа	экспериментальная группа	контрольная группа	экспериментальная группа
Тело позвонка				
уроновые кислоты	3,34 ± 0,05	2,53 ± 0,18*	2,80 ± 0,19	5,05 ± 0,17
С-ГАГ	2,43 ± 0,06	0,16 ± 0,02*	2,11 ± 0,09	3,81 ± 0,11
белок	0,16 ± 0,05	0,07 ± 0,01*	0,36 ± 0,02	0,07 ± 0,01
Задние конечности				
уроновые кислоты	1,04 ± 0,05	1,33 ± 0,05*	0,83 ± 0,05	1,28 ± 0,10
С-ГАГ	1,07 ± 0,05	0,05 ± 0,01*	1,61 ± 0,20	1,75 ± 0,21
белок	0,14 ± 0,01	0,07 ± 0,06	0,18 ± 0,01	0,01 ± 0,001

* $P < 0,01$ по сравнению с крысами линий OXYS и Wistar соответствующего возраста.

Установлено достоверное увеличение числа остеокластов на мм^2 препарата ткани как в телах позвонков, так и бедренной кости по сравнению с контрольной группой животных ($P < 0,03$; $P < 0,01$). Кроме того, отмечено снижение диаметра гаверсовых каналов по сравнению с контрольной группой ($P < 0,01$; $P < 0,05$). В телах позвонков достоверно увеличивается процент эрозированной поверхности и снижается толщина остеоида ($P < 0,05$; $P < 0,03$). Достоверных различий остеобластов не обнаружено (табл. 2).

При анализе органического матрикса костной ткани выявлено, что у крыс линии OXYS, получавших в течение 4 мес. ДБФКН, в костной ткани позвоночника снижено содержание уроновых кислот и С-ГАГ ($P < 0,01$). Отмечено также снижение общего белка ($P < 0,01$). Изменений уроновых кислот и С-ГАГ у крыс обеих групп линии Wistar, не установлено (табл. 3).

После обработки растворов протеогликанов хондроитиназой АС с последующим электрофорезом образцов в геле агарозы выявлено наличие хондроитинсульфата АС во всех исследуемых образцах костной ткани у крыс обеих линий (рис. 3б). После обработки хондроитиназой АВС в телах позвонков обнаружено присутствие кератансульфата и дерматансульфата. У крыс обеих линий после введения ДБФКН при обработке исходных

растворов хондроитиназой АС и АВС на электрофореграмме обнаруживается кератансульфат, а дерматансульфат исчезает из костной ткани (рис. 3б).

При введении ДБФКН, кроме изменений органического матрикса костной ткани, происходит изменение минеральных компонентов костной ткани. Содержание кальция и фосфора в костной ткани у крыс обеих линий снижалось, однако достоверные отличия выявлены только у крыс линии OXYS ($P < 0,01$) по сравнению с контрольной группой той же линии. Выявлено, что у крыс линии OXYS увеличивается содержание свинца и стронция

в костной ткани. У крыс обеих линий при введении ДБФКН содержание меди, цинка и марганца снижается ($P < 0,01$; рис. 4).

Таким образом, в костной ткани у крыс линии OXYS при хроническом введении ДБФКН в минимально допустимых дозах (на уровне 1 ПДК) происходит изменение ремоделирования костной ткани. Установлено, что этот процесс характеризуется отсутствием сопряженности рассасывания и образования новой кости, в результате чего гистологическая структура костной ткани приобретает неравномерное, мозаичное строение.

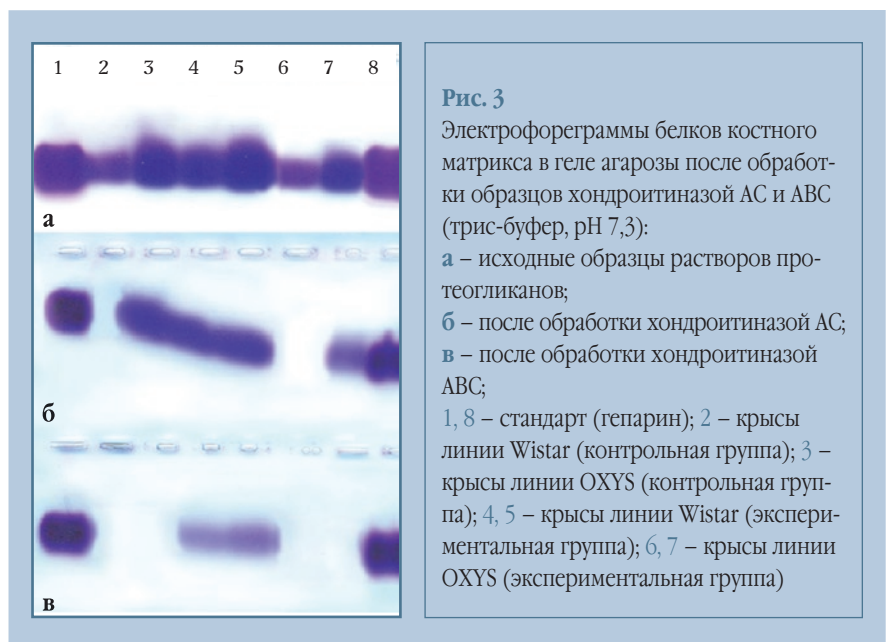


Рис. 3

Электрофореграммы белков костного матрикса в геле агарозы после обработки образцов хондроитиназой АС и АВС (трис-буфер, pH 7,3):

- а – исходные образцы растворов протеогликанов;
- б – после обработки хондроитиназой АС;
- в – после обработки хондроитиназой АВС;
- 1, 8 – стандарт (гепарин); 2 – крысы линии Wistar (контрольная группа); 3 – крысы линии OXYS (контрольная группа); 4, 5 – крысы линии Wistar (экспериментальная группа); 6, 7 – крысы линии OXYS (экспериментальная группа)

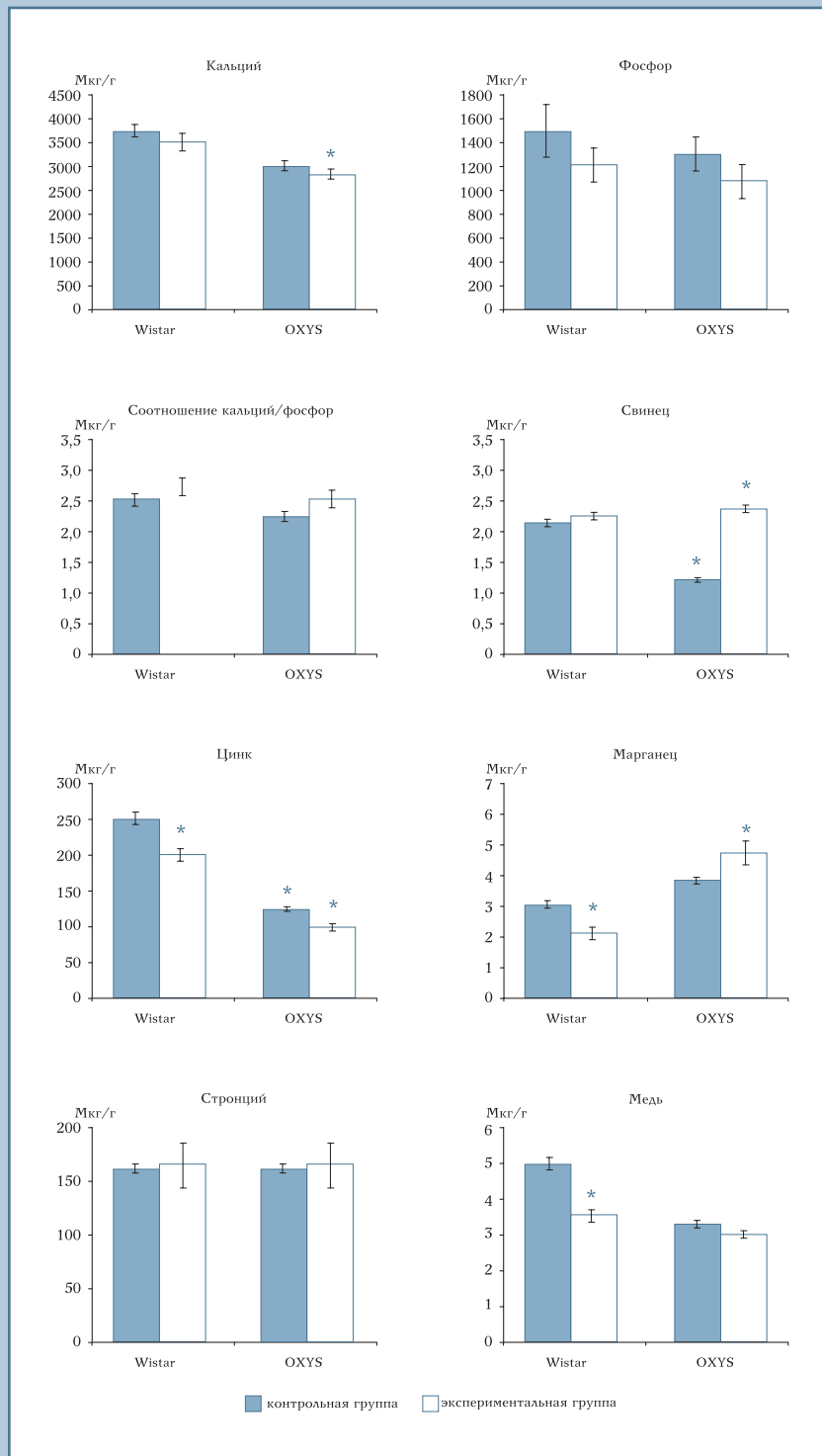


Рис. 4

Влияние дибутилдифосфорнокислого натрия на содержание макро- и микроэлементов в костной ткани крыс линий OXYS и Wistar:

* $P < 0,01$ по сравнению с крысами контрольной группы

При введении ДБФКН крысам линии OXYS на фоне уменьшения МПКТ и объема губчатой кости, сопровождающихся истончением трабекул, в костной ткани формируются трабекулы прерывистого строения. Клеточный механизм, лежащий в основе этого процесса, заключается в следующем. Во-первых, у крыс линии OXYS (контрольная группа) в этот возрастной период происходит формирование костной ткани с признаками нарушения костного ремоделирования за счет увеличения полостей резорбции и истончения трабекул, а дополнительное воздействие на эти механизмы лишь усугубляет процесс потери костной массы. Во-вторых, повышение частоты активации единиц ремоделирования делает более уязвимыми к разрушению лакунами резорбции уже и так достаточно истонченные костные трабекулы. С другой стороны, риск истончения и локальной перфорации отдельных трабекул подтверждают данные морфометрии о количестве остеокластов. Предполагаем, что подобная тенденция наблюдается в отношении не только горизонтально лежащих костных балок, но и вертикальных, вследствие чего риск механической несостоятельности костных структур повышается за счет необратимых изменений трехмерной трабекулярной сети.

Кроме изменений преимущественно губчатой кости после четырехмесячного введения ДБФКН, у крыс линии OXYS происходит ускоренная потеря объема кортикальной кости. Повышение кортикальной порозности происходит вследствие увеличения единиц ремоделирования и приводит к образованию пустых лакун резорбции. В кортикальной кости происходят изменения, подобные тем, что имеются в губчатой кости. Гаверсовы каналы увеличиваются в диаметре, что сопровождается неадекватной остеобластической реакцией в ответ на усиленную резорбцию костной ткани остеокластами.

Сравнение структуры кости у крыс контрольной группы и животных, получающих ДБФКН, показало,

что принципиальным изменением костной ткани при введении остеотропного вещества является отрицательный костный баланс, связанный с увеличением резорбции на эндостальной поверхности кортикального слоя. Эти изменения не компенсируются достаточным балансом костной ткани на периостальной поверхности, что в итоге и приводит к снижению толщины кортикального слоя как в телах позвонков, так и в бедренной кости. Этот факт имеет очень важное значение, так как, во-первых, толщина кортикального слоя является важной детерминантой устойчивости к ком-прессии всего тела позвонка, во-вторых, из всех гистоморфометрических показателей именно ширина кортикального слоя является прямым прогностическим фактором

при оценке МПКТ и ее устойчивости к переломам [1].

Данные гистоморфометрии убедительно доказали факт, что при хроническом воздействии остеотропного вещества (ДФКН) разобщение процессов костного ремоделирования происходит за счет неадекватного созидания костной ткани. Эти изменения затрагивают преимущественно трабекулярную костную ткань. Изменения кортикальной кости также имеются, причем в некоторых случаях даже более выраженные.

Заключение

Результаты исследований костной ткани при хроническом введении ДБКН дают основание полагать, что при достаточно длительной экспози-

ции веществ техногенного характера может происходить нарушение процессов ремоделирования костной ткани, причем при наличии генетической предрасположенности к возникновению дефицита МПКТ техногенные факторы среды могут оказывать отрицательное влияние, изменяя нарушенный костный баланс, обусловленный снижением остеопластических функций, вызывая опосредованно активацию костной резорбции. В то же время отмечено, что при отсутствии генетической предрасположенности к развитию раннего остеопороза влияние веществ техногенного характера на костную ткань менее выражено.

Литература

1. **Беневоленская Л.И., Лесняк О.М.** Остеопороз. Диагностика, профилактика и лечение. М., 2005.
2. **Садовой М.А., Трофимович Е.М., Садовая Т.Н.** Превентивная детская вертебрология в проблеме гигиенической антропатологии // Хирургия позвоночника. 2004. № 2. С. 79–87.
3. **Фаламеева О.В., Садовой М.А., Храпова Ю.В. и др.** Система профилактики остеопороза в регионах с разным загрязнением окружающей среды // Сибирский консилиум. 2007. № 7 (62). С. 141–142.
4. **Фаламеева О.В., Садовой М.А., Храпова Ю.В. и др.** Структурно-функциональные изменения костной ткани позвоночника и конечностей у крыс OXYS // Хирургия позвоночника. 2006. № 1. С. 88–94.
5. **Boivin G., Meunier P.J.** The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research // Osteoporosis Int. 2003. Vol. 14. Suppl. 3. P. 19–24.
6. **Bjornsson S.** Size-dependent separation of proteoglycans by electrophoresis in gels of pure agarose // Anal. Biochem. 1993. Vol. 210. P. 292–298.
7. **Raisz L.G.** Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects // J. Clin. Invest. 2005. Vol. 115. P. 3318–3325.
8. **Ralston S.H.** Science, medicine, and the future: osteoporosis // BMJ. 1997. Vol. 315. P. 469–472.

Адрес для переписки:

Фаламеева Ольга Викторовна
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
OFalameeva@niito.ru

Статья поступила в редакцию 14.12.2007