



СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОЗВОНОЧНИКА И КОНЕЧНОСТЕЙ У КРЫС ОХУС

О.В. Фаламеева¹, М.А. Садовой¹, Ю.В. Храпова¹, Н.Г. Колосова²

¹Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Цель исследования. Изучение специфических структурно-функциональных изменений костной ткани крыс Охус разного возраста.

Материал и методы. У крыс-самцов линий Охус и Wistar 2–18-месячного возраста проведено исследование минеральной плотности костной ткани на остеоденситометре «LUNAR-Exert-XL» (США). Костные фрагменты тел позвонков и передних и задних конечностей исследованы методом гистоморфометрии с помощью программ «Motic Images Plus 2.0 ML» фирмы «Микромед» (Россия).

Результаты. Методом рентгеновской костной денситометрии выявлено, что у крыс Охус прирост минеральной плотности костной ткани не достигает значений животных контрольной группы соответствующего возраста, а начиная с шестимесячного возраста прогрессивно снижается. Гистоморфометрическое исследование тел позвонков и конечностей крыс Охус показало достоверные изменения качественных и количественных параметров костной ткани, характерных для остеопороза.

Заключение. Изменения костной ткани крыс Охус соответствуют наблюдающимся при остеопорозе у человека, что позволяет рассматривать этих животных в качестве модели для изучения патогенеза этого заболевания, для разработки способов его профилактики и лечения.

Ключевые слова: морфология костной ткани, крысы Охус, остеопороз.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES
IN BONE TISSUE OF THE SPINE
AND EXTREMITIES IN OXYS RATS

O.V. Falomeeva, M.A. Sadovoy,
Yu.V. Khrapova, N.G. Kolosova

Objective. To study specific structural and functional changes in bone tissue in Oxys rats of different age.

Material and Methods. Mineral density of bone tissue in Oxys and Wistar male rats at the age of 2–18 months was examined with x-ray bone densitometer LUNAR-Exert-XL (USA). Bone fragments of vertebral bodies and of forelegs and hind legs were studied by histomorphometric assay with software Motic Images Plus 2.0 ML (Micromed, Russia).

Results. X-ray bone densitometry findings have shown that bone mineral density increase in Oxys rats does not attain the values shown by age-matched control rats, and progressively decreases after the age of 6 months. Data obtained by histomorphometric analysis of vertebral bodies and limbs have reliably demonstrated that there is a change in quantitative and qualitative bone tissue parameters of Oxys rats which is a characteristic of osteoporosis.

Conclusion. Bone tissue changes in Oxys rats correspond to that observed in human osteoporosis, what allows to use rat as a model for the study of osteoporosis pathogenesis and for development of prophylaxis and treatment methods.

Key Words: bone tissue morphology, Oxys rats, osteoporosis.

Hir. Pozvonoс. 2006;(1):88–94.

Экспериментальное моделирование патологических процессов является важным этапом при оценке терапевтических возможностей лекарственных препаратов и хирургических методов лечения. Использование биологических моделей заболеваний человека позволяет изучать молекулярные и генетические основы патогенеза, изменения на клеточном и систем-

ном уровнях, зачастую недоступные при обследовании пациентов. Одним из заболеваний социальной и медицинской значимости в настоящее время является остеопороз [16]. Среди известных способов моделирования остеопороза наиболее используемым является воспроизведение вторичных форм путем иммобилизации животных [15], введения корти-

костероидов [11, 15], с помощью бескальциевой диеты [15]. Также широко применяется модель овариэктомии разных видов животных [8, 10, 15] и линии мышей с нокаутированными генами [8, 10]. Существует только одна модель раннего сенильного остеопороза – сублиния SAM6 линии мышей SAM (senescence accelerated mouse), выведенная японскими учеными [7].

Мы полагаем, что подобной моделью остеопороза может стать и линия преждевременно стареющих крыс Oхус, которая создана в 70-е гг. прошлого века в Институте цитологии и генетики СО РАН селекцией и инбридингом крыс Wistar, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы [4], а свое название получила при регистрации в международной базе данных Rat genome (1996). Исследования, выполненные в последние годы, показали, что крыс Oхус от исходной линии Wistar отличают сниженная продолжительность жизни, ранняя инволюция тимуса [3], повышенное давление на фоне недостаточности оксида азота, отклонения в когнитивной и эмоциональной сферах, характерные для стареющих людей и животных [6]. Ключевой признак, по которому контролируется состояние линии, – спонтанная катаракта, заболеваемость которой к шестимесячному возрасту животного достигает 100 % (у крыс Wistar – 5 %). Катаракта у крыс Oхус по своим характеристикам соответствует этому заболеванию у людей и развивается на фоне прогрессирующих дистрофических изменений сетчатки [2]. Предполагается, что преждевременное старение крыс Oхус связано с повышенной чувствительностью к окислительному стрессу, в основе которого могут лежать нарастающие с возрастом дисфункции митохондрий [5]. Предполагается, что ключевую роль в патогенезе преждевременного старения крыс Oхус играют нарастающие с возрастом нарушения структуры и функций митохондрий: изменение соотношения цитохромов внутренней мембраны, рост содержания цитохрома b5 внешней мембраны, снижение активности F₁F₀-АТФ-синтетазы, дыхательного контроля и скорости фосфорилирования, накопление окислительных повреждений белков и липидов, снижение объемной и поверхностной плотности митохондрий, появление митохондрий с лизисом матрикса и деструкцией крист. Однако все эти параметры

исследованы только на митохондриях клеток печени [5].

Известно, что именно эти механизмы вовлечены в патогенез естественного старения и связанных с этим заболеваний, что позволяет рассматривать крыс Oхус как адекватную модель для изучения фундаментальных механизмов старения и корректных испытаний замедляющих его препаратов.

Ранее нами были выявлены изменения минерального состава костной ткани у крыс линии Oхус [1]. В настоящее время «золотым стандартом» диагностики остеопороза является денситометрическое определение минеральной плотности костной ткани. Морфометрия костной ткани до сих пор является единственным способом оценки механизмов ремоделирования, позволяющих достоверно выявить патофизиологию развития остеопороза. Эти подходы были использованы нами в настоящей работе, целью которой явилось сравнение возрастных структурно-функциональных изменений костной ткани крыс Oхус и Wistar.

Материал и методы

Исследования проведены на крысах-самцах линии Oхус 2-, 6-, 12- и 18-месячного возраста, полученных в лаборатории разведения животных Института цитологии и генетики. Крысы линии Wistar соответствующего возраста и массы составили контрольную группу. Все животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе при свободном доступе к корму и воде. В каждой группе было по 8–12 крыс.

Под эфирным наркозом всем животным измеряли минеральную плотность костной ткани методом дихроматической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) на рентгеновском костном денситометре «LUNAR-Exert-XL» (США). Определяли минеральную плотность всего скелета, позвоночника, костей передних и задних конечностей. Результаты выражали в г/см² и представляли как M ± m.

Для морфологического исследования проводили эвтаназию животных, брали костные фрагменты тела первого поясничного позвонка, передних и задних конечностей на границе верхней и средней трети. Костные фрагменты фиксировали в растворе 12 % формалина, декальцинировали в 0,5 % растворе соляной кислоты, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистоморфометрическое исследование выполнено с помощью пакета программ «Motic Images Plus 2.0 ML» («Микромед», Россия). По требованиям Американского остеологического общества [12] для оценки состояния костной ткани измеряли статические количественные параметры – объем губчатой кости (%), ширину кортикального слоя (мкм); статические показатели, отражающие микроархитектонику губчатой кости – толщину трабекул (мкм); параметры костеобразования – толщину остеоида (мкм) и резорбции – эрозированную поверхность (%), число остеокластов на квадратный миллиметр, а также диаметр гаверсовых каналов. Гистологическое исследование выполнено с использованием микроскопа «Axioskop 40» («Carl Zeiss», Германия). Статистическую обработку результатов проводили с вычислением средних арифметических значений (M), ошибки средней арифметической (m) и t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при p < 0,05.

Результаты

Как показала рентгеновская абсорбциометрия, у животных контрольной группы с двухмесячного возраста происходит постепенное увеличение минеральной плотности костной ткани всего скелета, позвоночника и конечностей (рис. 1). Данные изменения отмечаются в тканях дистальных отделов скелета. Пик формирования костной массы у них приходится на возраст 12 мес. У крыс Oхус прирост минеральной плотности костной ткани происходит медленнее и не достигает уровня значений

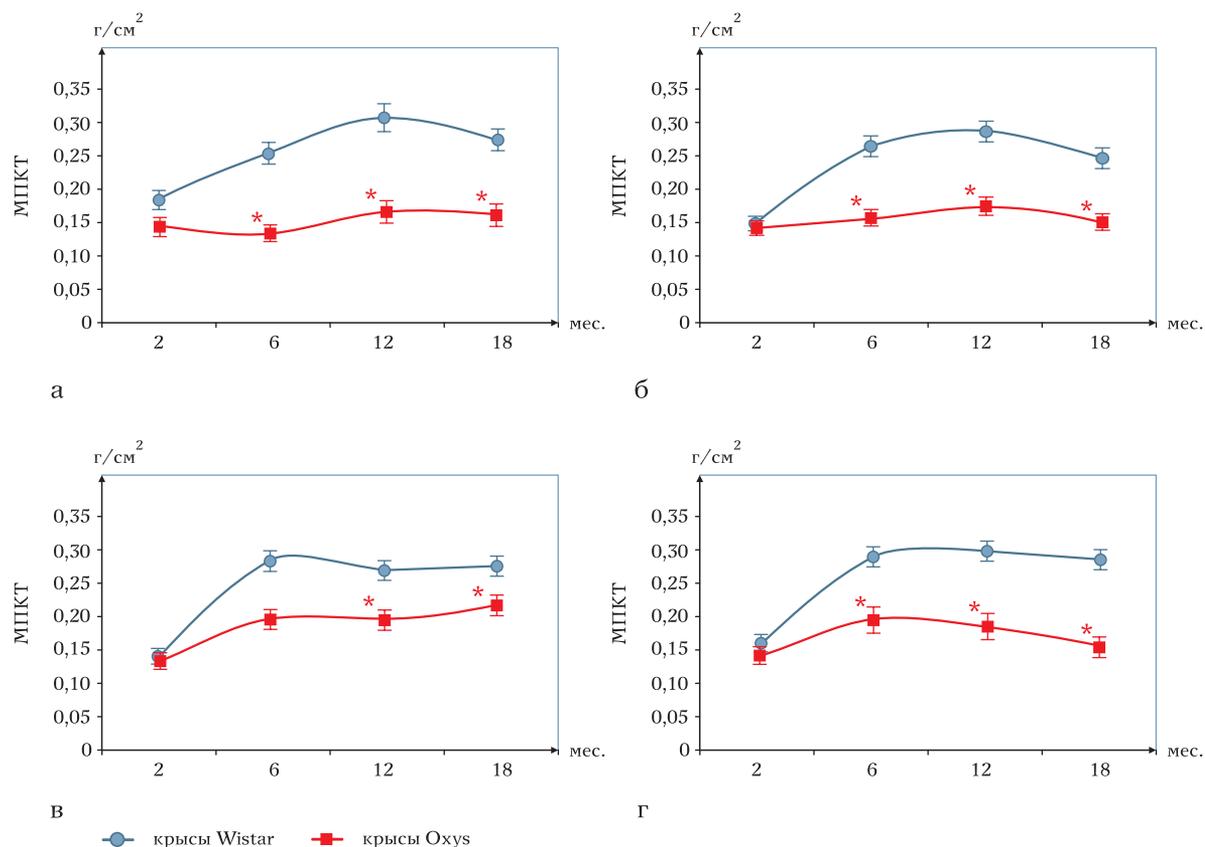


Рис. 1

Минеральная плотность костной ткани (МПКТ) крыс разного возраста (* $p < 0,001$ по сравнению с крысами Wistar соответствующего возраста):

а – всего скелета; б – позвоночника; в – передних конечностей; г – задних конечностей

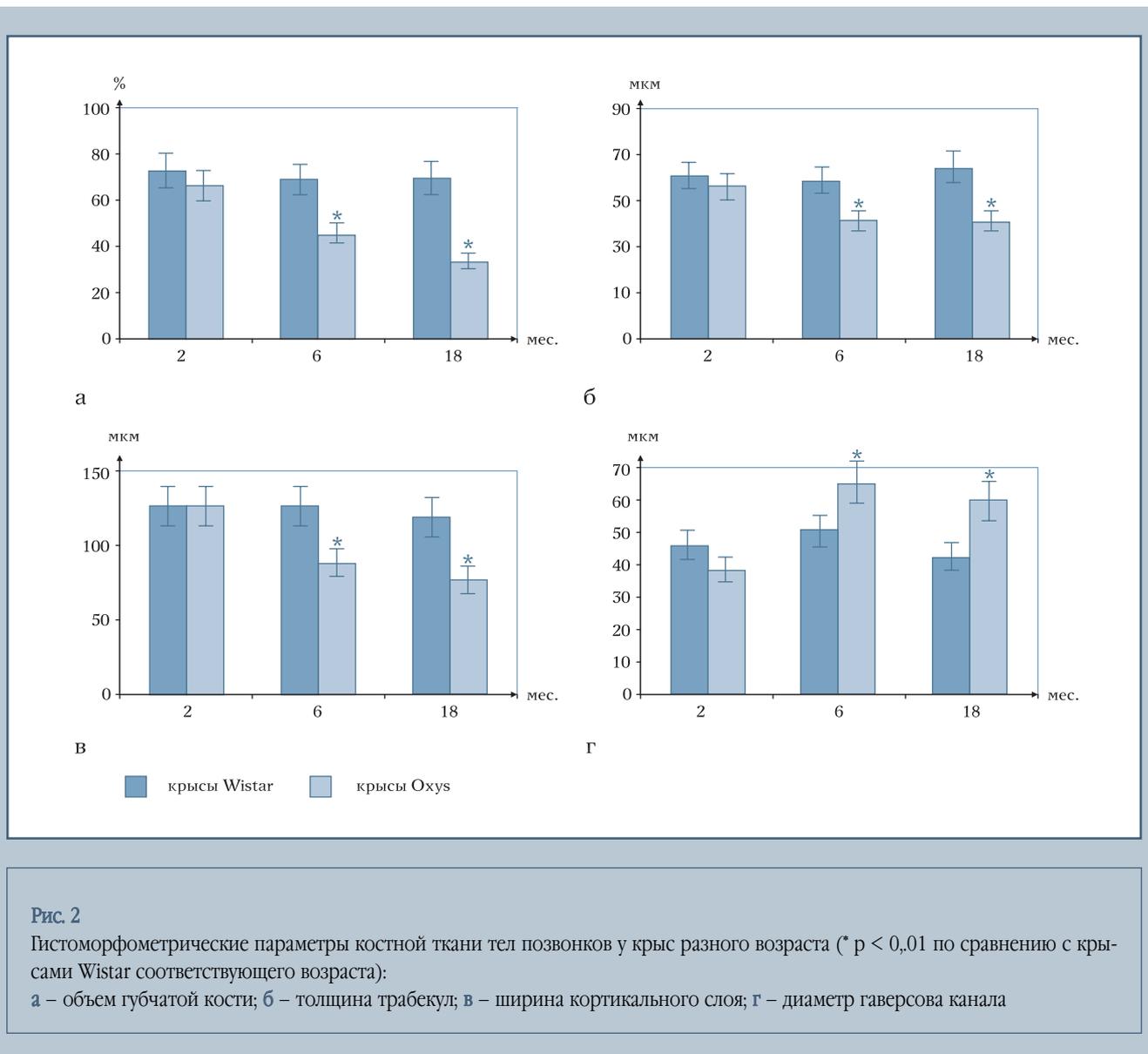
этого показателя у крыс Wistar соответствующего возраста. С шести месяцев у крыс Oxyus минеральная плотность костной ткани постепенно снижается по всем отделам скелета.

Обзорный просмотр гистологических препаратов костной ткани позвонков, передних и задних конечностей показал, что у двух- и шестимесячных крыс Wistar кортикальный отдел и костные трабекулы представлены ровными краями медуллярной поверхности. В толще костных структур отчетливо контурируются темносиние, слегка волнистые линии склеивания. Кортикальный слой доста-

точной ширины представлен компактной костью. Гаверсова система кортикального отдела состоит из упорядоченно расположенных остеонов. Губчатая кость позвонков и трубчатых костей представлена широкими анастомозирующими костными балками, между которыми расположены сосудистые каналы. В костных балках отчетливо видны зрелые костные клетки – остециты, располагающиеся в лакунах, в межбалочном пространстве – миелоидный костный мозг. Остеоид трабекул представлен тонкой полоской гомогенно розового цвета. На поверхности периоста

кортикального отдела костной ткани наблюдаются единичные лакуны резорбции с содержащимися в них остатками остеокластов. Механизмы резорбции и костеобразования взаимно сопряжены.

Костная ткань тел позвонков и конечностей крыс Wistar в возрасте 18 мес. характеризуется едва заметными изменениями основных структур. Костные трабекулы несколько сужены, количество линий склеивания в них снижено, отмечается очаговое истончение кортикальных слоев кости с увеличением количества полосок резорбции. Однако костный ба-

**Рис. 2**

Гистоморфометрические параметры костной ткани тел позвонков у крыс разного возраста (* $p < 0,01$ по сравнению с крысами Wistar соответствующего возраста):

а – объем губчатой кости; **б** – толщина трабекул; **в** – ширина кортикального слоя; **г** – диаметр гаверсова канала

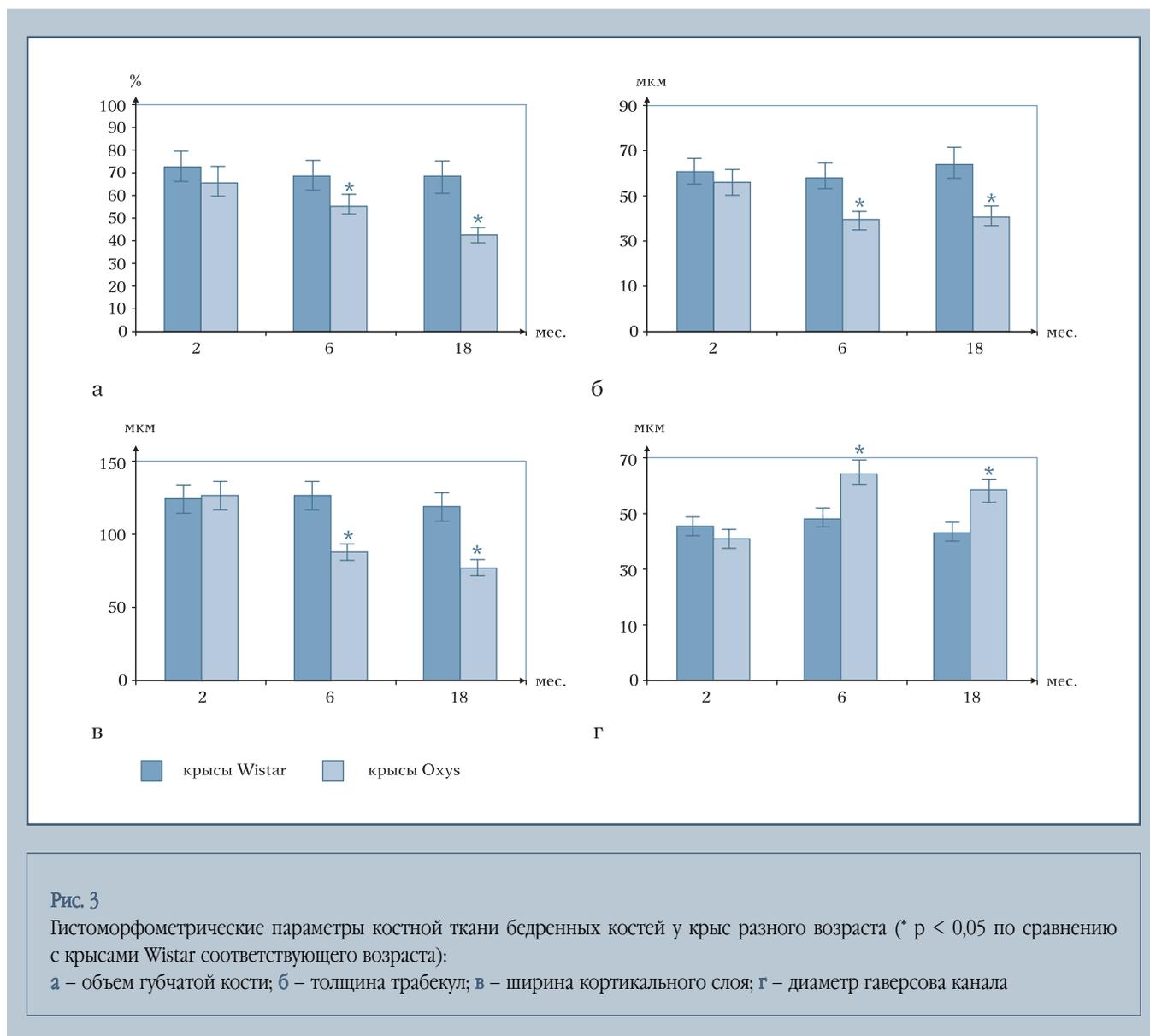
ланс остается положительным и изменения связаны с медленной физиологической потерей костной массы с возрастом.

У двухмесячных крыс Oxy губчатая и кортикальная кости тел позвонков и трубчатых костей не отличаются от костной ткани крыс Wistar этого возраста. Патоморфологические изменения костной ткани отчетливо появляются у крыс Oxy в шесть месяцев. Анализ гистологических препаратов тел позвонков выявил истонченные костные балки, в которых имеются уменьшение линий склеивания, рарефикация кортикальной кос-

ти. Диаметр гаверсовых каналов увеличен. Матрикс костной ткани окрашивается оксифильно. Подобные, но менее выраженные изменения, происходят и в трубчатых костях.

Полученные результаты подтверждены гистоморфометрией, которая до сих пор остается единственным методом объективной оценки состояния ремоделирования костной ткани на клеточном и тканевом уровнях. Гистоморфометрия отчетливо продемонстрировала, что у крыс Oxy с 6-месячного возраста регистрируются количественные и качественные изменения параметров костной тка-

ни. Объем губчатой кости у крыс Oxy меньше, чем у крыс Wistar, в телах позвонков в 1,6 раза ($45,1 \pm 1,9\%$ против $72,3 \pm 7,9\%$; $p < 0,05$), в трубчатых костях – в 1,4 раза ($55,1 \pm 4,8\%$ против $78,9 \pm 9,3\%$; $p < 0,05$). Потеря костной плотности губчатой кости сопровождается постепенным снижением толщины трабекул и ширины кортикального слоя, а также увеличением диаметра гаверсовых каналов. Так, в телах позвонков крыс Oxy толщина трабекул составляет $45,3 \pm 2,7$ мкм, крыс Wistar – $61,2 \pm 6,9$ мкм; в бедренной кости – $50,3 \pm 6,0$ и $68,7 \pm 11,2$ мкм соответственно. Ширина кортикаль-

**Рис. 3**

Листоморфометрические параметры костной ткани бедренных костей у крыс разного возраста (* $p < 0,05$ по сравнению с крысами Wistar соответствующего возраста):

а – объем губчатой кости; б – толщина трабекул; в – ширина кортикального слоя; г – диаметр гаверсова канала

ного слоя тел позвонков и трубчатых костей крыс Oxy ($89,3 \pm 12,5$ мкм и $112,5 \pm 18,2$ мкм соответственно) также была меньше ($p < 0,05$), чем у животных контрольной группы ($136,7 \pm 14,0$ мкм и $148,9 \pm 6,5$ мкм соответственно; рис. 2–3).

Параллельно с этим у крыс Oxy с возрастом в телах позвонков происходит уменьшение толщины остеоида ($2,7 \pm 0,6$ мкм по сравнению с $9,1 \pm 1,3$ мкм у крыс Wistar; $p < 0,01$) и увеличивается площадь эрозированной поверхности как в телах позвонков, так и бедренной кости. Так, в шесть месяцев эрозийные измене-

ния выявлены на $10,6 \pm 1,2$ и $12,2 \pm 0,9$ % площади тел позвонков и трубчатой кости крыс Oxy, а у крыс Wistar – на $5,8 \pm 0,7$ и $4,7 \pm 1,1$ % соответственно ($p < 0,05$; $p < 0,001$).

Обсуждение

Формирование пика костной массы и возраст, при котором начинается снижение минеральной плотности костной ткани, являются важными показателями для начала развития хрупкости костной ткани как для животных, так и для человека. Полученная методом остеоденситометрии

картина формирования пика костной массы у здоровых крыс-самцов Wistar совпадает с данными других авторов, которые также доказали наличие половых и возрастных различий губчатой и кортикальной костной ткани у крыс этой линии [9]. У крыс Oxy не только задерживается формирование пика костной массы, но и не достигается уровень минеральной плотности костной ткани, свойственный животным контрольной группы. В шесть месяцев у крыс линии Oxy формируются достоверные денситометрические признаки остеопороза.

Выявленные нами при морфометрии изменения костной ткани крыс *Oxus* свидетельствует о снижении процессов костного ремоделирования с признаками преимущественно гладкого рассасывания костного вещества со слабовыраженной остеобластической реакцией и общим снижением остеопластических процессов. Уменьшение количества костной ткани в единице ремоделирования является основным механизмом потери костной ткани за счет снижения количества матрикса, синтезируемого остеобластами. Популяция остеобластов теряет способность адекватно восстанавливать резорбированную кость в каждом цикле ремоделирования, о чем свидетельствует достоверное увеличение эрозированной поверхности в телах позвонков и бедренной кости, несмотря на явное отсутствие увеличения количества остеокластов.

Истончение трабекул в костной ткани крыс *Oxus* происходит постепенно, незаметно, однако не является единственной причиной потери объема губчатой кости. Костные трабекулы становятся более разобщенными, снижается их сцепленность. Различий в количестве рассасывающих костную ткань клеток – остеокластов – у крыс *Wistar* и *Oxus* нами не обнаружено. Патогенетическим механизмом, который может лежать в основе выявленных изменений, может быть, как мы полагаем, изменение деятельности остеобразующих клеток,

проявляющееся снижением способности синтезировать костный матрикс, а вероятнее всего, и нарушением процесса его минерализации [13, 14].

Достоверное снижение минеральной плотности костной ткани и разобщение процессов костного ремоделирования за счет снижения костеобразующих процессов в телах позвонков и костях конечностей у 6–18-месячных крыс *Oxus* являются характерными признаками остеопороза у человека.

Разные возрастные изменения структурно-функциональных характеристик костной ткани крыс *Oxus* и *Wistar* согласуются с полученными ранее данными о нарушении минерализации костной ткани у этих животных [1]. Показано, что в шесть месяцев в костной ткани крыс *Oxus* увеличена относительная доля неорганических элементов, что может свидетельствовать о нарушении минерализации. Кроме того, у крыс этой линии изменяется кальций-фосфорный потенциал, в основном за счет увеличения содержания кальция. С возрастом в костной ткани крыс *Oxus* увеличивается содержание магния, железа, лития и снижается содержание марганца [1].

Заключение

К экспериментальным моделям предъявляются следующие требования: надежность, возможность стандартизации генетических, морфологических и других характеристик, наличие известных патофизиологических особенностей, быстрая репродукция и низкая себестоимость [11, 15]. Линия крыс *Oxus* соответствует всем этим требованиям. Снижение минеральной плотности костной ткани, нарушение процессов ремоделирования за счет снижения костеобразующих процессов и нарушение минерализации костной ткани у крыс *Oxus* являются следствием происходящих на клеточном и тканевом уровнях изменений. Объективные признаки формирования раннего остеопороза позволяют рассматривать этих животных как адекватную модель для исследования патогенеза этого заболевания, разработки способов его профилактики и лечения. На вопрос о том, какие механизмы лежат в основе этого, ответа на сегодня нет. До выяснения основных патогенетических механизмов и этиологических факторов, определяющих развитие изменений костной ткани у крыс *Oxus*, мы не можем дать окончательного ответа на вопрос об их соответствии именно сенильному остеопорозу. В настоящее время нами проводятся исследования органического матрикса костной ткани крыс *Oxus*, изменения которого существенно влияют на ее прочность.

Литература

1. Колосова Н.Г., Куторгин Г.Д., Сафина А.Ф. Особенности минерализации костной ткани преждевременно стареющих крыс *Oxus* // Бюл. экспер. биологии. 2002. Т. 133. № 2. С. 203–206.
2. Колосова Н.Г., Лебедев П.А., Айдагулова С.В. и др. Крысы *Oxus* как модель сенильной катаракты // Бюл. экспер. биологии. 2003. Т. 134. № 10. С. 235–240.
3. Маркова Е.В., Обухова Л.А., Колосова Н.Г. Показатели активности клеточного звена иммунного ответа крыс линий Вистар и *Oxus* и особенности их поведения в тесте «открытого поля» // Бюл. экспер. биологии. 2003. Т. 136. № 10. С. 427–429.
4. Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей // Генетика. 1975. № 5. С. 63–71.
5. Шабалина И.Г., Колосова Н.Г., Гришанова А.Ю. и др. Активность окислительного фосфорилирования, F0F1-АТФ-азы и содержание цитохромов митохондрий печени крыс с врожденным повышением способности радикалообразования // Биохимия. 1995. Т. 60. № 12. С. 2045–2052.
6. Bobko A.A., Sergeeva S.V., Bagryanskaya E.G., et al. 19F NMR measurements of NO production in hypertensive ISIAH and *Oxus* rats // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. Vol. 330. P. 367–370.
7. Chen H., Emura S., Isono H., et al. Effects of traditional Chinese medicine on bone loss in SAMP6: a murine model for senile osteoporosis // Biol. Pharm. Bull. 2005. Vol. 28. P. 865–869.
8. Frost H.M., Jee W.S. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses // Bone Miner. 1992. Vol. 18. P. 227–236.
9. Fukuda S., Iida H. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and the strength of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebra in female *Wistar* rats // J. Vet. Med. Sci. 2002. Vol. 66. P. 755–760.

10. **Jiang G., Matsumoto H., Yamane J., et al.** Prevention of trabecular bone loss in the mandible of ovariectomized rats // *J. Oral. Sci.* 2004. Vol. 46. P. 75–85.
11. **Lo D.** Animal models of disease and basic science // *Horm. Metab. Res.* 1996. Vol. 28. P. 296–298.
12. **Parfitt A.M., Drezner M.K., Glorieux F.H., et al.** Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee // *J. Bone Miner. Res.* 1987. Vol. 2. P. 595–610.
13. **Raisz L.G.** Physiology and pathophysiology of bone remodeling // *Clin. Chem.* 1999. Vol. 45. P. 1353–1358.
14. **Seeman E.** Invited review: Pathogenesis of osteoporosis // *J. Appl. Physiol.* 2003. Vol. 95. P. 2142–2151.
15. **Turner A.S.** Animal models of osteoporosis - necessity and limitations // *Eur. Cells Mater.* 2001. Vol. 1. P. 66–81.
16. **Woolf A.D., Pfeleger B.** Burden of osteoporosis and fractures in developing countries // *Curr. Osteoporoses Rep.* 2005. Vol. 3. P. 84–91.

Адрес для переписки:

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