

© А. А. Макеев, А. Д. Салагаева А. Е. Просенко

DOI: [10.15293/2226-3365.1501.09](https://doi.org/10.15293/2226-3365.1501.09)

УДК 636.4.087.8 + 619

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАСТИНКИ РОСТА ТЕЛА ПОЗВОНКА КРЫС ПРИ ГЛЮКОКОРТИКОИД-ИНДУЦИРОВАННОМ ОСТЕОПОРОЗЕ

*А. А. Макеев, А. Д. Салагаева А. Е. Просенко (Новосибирск, Россия)*

*Нарушение метаболизма костной ткани, ведущее к развитию остеопороза и переломов костей скелета, – наиболее частый побочный эффект лечения супрафизиологическими дозами глюкокортикоидов у людей всех возрастов. Однако влияние факторов, вызывающих остеопороз, обычно приводится без учета их воздействия на хрящевую ткань пластинки роста тела позвонка.*

*Цель исследования – изучить морфофункциональное состояние пластинки роста тела позвонка крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе.*

*Методами биохимического анализа установлено, что длительное применение глюкокортикоида преднизолон приводит к развитию окислительного стресса. В плазме крови крыс регистрируется увеличение продуктов свободнорадикального перекисного окисления липидов и депрессия ключевых ферментов антиоксидантной защиты. У крыс в условиях глюкокортикоид-индуцированного остеопороза нарушается структурно-функциональная организация пластинки роста тела позвонка, что выражается в свободнорадикальном повреждении хондроцитов и деструкции компонентов межклеточного вещества. Интенсивная гибель клеток и деструкция матрикса хрящевой ткани пластинки роста является отражением локального проявления окислительного стресса, что в конечном итоге обуславливает нарушение роста осевого скелета крыс.*

**Ключевые слова:** *глюкокортикоид-индуцированный остеопороз, окислительный стресс, пластинка роста, хондроциты.*

Широкий спектр физиологических и фармакологических эффектов глюкокортикоидных препаратов делает их практически незаменимыми при целом ряде заболеваний.

Высокая биологическая активность позволяет использовать их в наиболее тяжелых клинических ситуациях [9]. Нередко они включаются в комплекс экстренных мер

**Макеев Александр Александрович** – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и методики обучения биологии, Новосибирский государственный педагогический университет.

E-mail: [mahkeev-aleksandr@rambler.ru](mailto:mahkeev-aleksandr@rambler.ru)

**Салагаева Анжелика Дмитриевна** – студентка 3 курса, направление «Биология», Институт естественных и социально-экономических наук, Новосибирский государственный педагогический университет.

E-mail: [salagaeva93@mail.ru](mailto:salagaeva93@mail.ru)

**Просенко Александр Евгеньевич** – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой химии, Новосибирский государственный педагогический университет.

помощи при неотложных состояниях. Считается, что глюкокортикоиды (ГК) являются наиболее эффективными препаратами для базисного лечения бронхиальной астмы, сердечно-сосудистой системы, ревматических заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника и др. [13]. Вместе с тем установлено, что при системном применении ГК в клинической практике наблюдается большое количество побочных эффектов. ГК-индуцированный остеопороз рассматривается как одно из наиболее характерных осложнений глюкокортикоидной-терапии [12] и выявляется у значительной части ГК-зависимых больных.

Влияние факторов, вызывающих остеопороз, обычно приводится без учета их воздействия на хрящевую ткань. Однако известно, что только при условии полноценного формирования хрящевой ткани может осуществляться полноценный остеогенез. Экспериментальные данные демонстрируют, что длительное применение глюкокортикоидных препаратов, а также активация механизмов эндогенной выработки ГК, резко повышают уровень продуктов перекисного окисления липидов; это приводит к развитию окислительного стресса [1; 6]. Окислительный стресс рассматривается как универсальный общепатологический процесс, проявляющийся на клеточном, тканевом и организменном уровнях.

Недостаток информации о влиянии окислительного стресса на структуру и функцию хрящевой ткани обуславливает актуальность настоящего исследования.

**Цель исследования** – изучить морфофункциональное состояние пластинки роста тела позвонка крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе.

### Материал и методы исследования

Экспериментальная часть работы выполнена на самцах крыс линии Вистар массой 220–250 г. Животные были разделены на две группы: контрольную и опытную. Контролем служили интактные животные, которые содержались в стандартных условиях вивария. У крыс опытной группы моделировали глюкокортикоид-индуцированный остеопороз путем ежедневного введения (*per os*) преднизолон в дозе 50 мг/кг в течение 14 суток согласно общепринятой методике [2].

На 15 сутки эксперимента всех животных под эфирным наркозом выводили из эксперимента. Объектом исследования служила плазма крови и фрагменты тел позвонков крыс обеих групп.

В плазме крови крыс определяли содержание основных продуктов свободнорадикального окисления – малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК), а также активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Содержание МДА определяли в реакции с 3-хлоруксусной и тиобарбитуровой кислотами в присутствии ионов меди [7]; концентрацию ДК выявляли реакцией с гептан-изопропаноловой смесью [10]. Активность ферментов антиоксидантной защиты – СОД регистрировали по степени ингибирования хемилюминесценции в растворе с ксантинооксидазой [11]; активность КАТ определяли реакцией перекиси водорода с добавлением молибдата аммония [3]. Реакции оценивали спектрофотометрически при соответствующей длине волны.

Материалом для проведения морфологического и гистохимического анализов служили пластинки роста тел позвонков крыс обеих групп. Из грудного отдела позвоночника выделяли тела позвонков и фиксировали

в 10 % растворе нейтрального формалина, а затем декальцинировали в забуференном растворе трилона Б и после обезвоживания в *Iso-prep* заливали гистомиксом (*Histomix*) и изготавливали блоки. Серийные срезы толщиной 5 мкм готовили на ротационном полуавтоматическом микротоме *SLEE CUT* и монтировали на предметные стекла. Для изучения общей морфологической картины срезы окрашивали гематоксилином Бёмера и эозином. Кислые гликозаминогликаны (ГАГ) выявляли альциановым синим по Сиддмену, гликоген и гликопротеины – ШИК-реакцией по Мак Манусу.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты исследований

Результаты биохимического анализа плазмы крови крыс первой опытной группы, свидетельствуют, что содержание интегральных показателей свободнорадикального окисления статистически достоверно превышает аналогичные показатели крыс интактной группы. Исследование антиоксидантного статуса плазмы крови крыс первой опытной группы позволяет отметить снижение активности исследуемого ферментативного звена антиоксидантной защиты. В частности, отмечается статистически достоверное снижение уровня активности СОД на 24,7 %, а КАТ на 48,6 % относительно аналогичного показателя интактных крыс.

Превышение уровня продуктов перекисного окисления липидов и депрессия ферментов антиоксидантной защиты в плазме крови крыс первой опытной группы являются доказательством развития окислительного стресса при экспериментальном ГК-индуцированном остеопорозе.

Влияние токсичных продуктов окислительного стресса на хрящевую ткань пластинки роста тела позвонка крыс изучали методами морфогистохимического анализа.

На срезах позвоночника в сагиттальной плоскости пластинка роста тела позвонка контрольных животных представлена гиалиновым хрящом, хондроциты которой, в зависимости от степени дифференцировки, формируют следующие зоны: резервная, пролиферирующая, зона созревания, гипертрофическая и зона остеогенеза.

У животных первой опытной группы, также как и у контрольной, идентифицируются все зоны пластинки роста. Однако имеются некоторые различия, касающиеся как толщины определенных зон, так и их морфологии. Типичным для животных этой группы является увеличение толщины слоя пролиферирующего хряща за счет количества клеток и их площади. Хондроциты этого слоя крупные, располагаются в широких лакунах округлой формы, которые по морфологической характеристике приближаются к клеткам гипертрофированного хряща. Ядро хондроцитов с признаками пикноза и рексиса, цитоплазма неравномерно окрашивается гематоксилином. Делящиеся клетки располагаются в разных плоскостях. Матрикс слабо выражен. При постановке реакции на кислые ГАГ альцианпозитивный материал имеет вид сливных гранул. Данный признак может свидетельствовать о глубоком нарушении структуры и функции клеток указанной зоны.

По сравнению с контрольными образцами колонковые структуры искривлены, местами сужены, а в отдельных случаях не определяются. По морфологическим характеристикам клетки этой зоны неоднородны. Встречаются кластеры из 5–6 клеток в лакуне с базофильной цитоплазмой и центрально расположенным ядром. Эти хондроциты представляют собой типичные клетки изогенной группы, которые не формируют колонковые структуры.

Результаты гистохимического исследования показали, что у животных первой опытной группы в межклеточном веществе этой зоны отмечается снижение интенсивности реакции с альциановым синим по сравнению с контролем.

Толщина зоны гипертрофических клеток значительно сужена и представлена 2–3 слоями клеток против 5–6 в норме.

В зоне энхондрального остеогенеза пластинки роста происходит глубокая инвазия кровеносными сосудами хрящевого матрикса. Дистрофия матрикса и кальцификация осу-

ществляется вплоть до клеток зоны пролиферации, в отличие от крыс контрольной группы. Это приводит к практически полному исчезновению гипертрофических клеток и интенсивному замещению хряща в зоне созревания и гипертрофии первичной грубоволокнистой ткани костной тканью.

Интенсивная гибель клеток и деструкция матрикса хрящевой ткани пластинки роста является отражением локального проявления окислительного стресса, что в конечном итоге обуславливает нарушение роста осевого скелета крыс [4–5; 8].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Биохимические** основы патологических процессов / Под ред. Е. С. Северина. – М.: Медицина, 2000. – С. 34–37.
2. **Зиганшина Л. Е., Бурнашева З. А., Валеева И. Х.** Сравнительное изучение эффективности димефосфона и ксидофона при стероидном остеопорозе у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – № 6. – С. 55–56.
3. **Королюк М. А.** Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
4. **Макеев А. А.** Влияние антиоксиданта «Тиофан» на морфогенез осевого скелета крыс в условиях окислительного стресса матерей // Вестник КрасГАУ. – 2012. – С. 38–41.
5. **Макеев А. А., Сахаров А. В., Просенко А. Е.** Влияние антиоксиданта тиофана на показатели окислительного стресса у крыс в период полового созревания // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2010. – № 4. – С. 72–75.
6. **Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К., Ланкин В. З., Бондарь И. А., Труфакин В. А.** Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
7. **Определение** резистентности к окислению липопротеинов низкой плотности сыворотки крови: метод. рекомендации / сост. Ю. И. Рагина, М. И. Душкин. – Новосибирск, 1998. – 11 с.
8. **Павлова В. Н.** Хрящ. – М.: Медицина, 1988. – 320 с.
9. **Руководство** по остеопорозу / Под. Ред. Л. И. Беневоленская. – М.: Бином; Лаборатория знаний, 2003. – С. 430–433.
10. **Стальная И. Д.** Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – 391 с.
11. **Laihia J. K., Jansen C. T., Ahotupa M.** Lucigenin and linoleate enhanced chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity // Free Radic. Biol. Med. 1993. Vol. 14. P. 457–461.
12. **Lukert B. P., Raicz L. G.** Glukokortikoid-induced osteoporosis: patnogenesis and management // Ann. Intern Med. 1990. 112(5). P. 352–364.
13. **Van Staa T. P., Leufkens H. G. M., Abenhaim L., Zhang B., Cooper C.** Use of Oral Corticosteroids and Risk of Fractures // J. Bone Miner. Res. – 2000. Vol. 15. P. 993–1000.

DOI: [10.15293/2226-3365.1501.09](https://doi.org/10.15293/2226-3365.1501.09)

Makeev Alexander Alexandrovich, Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer of Zoology and Teaching Methods in Biology Department, Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation.

E-mail: [mahkeev-aleksandr@rambler.ru](mailto:mahkeev-aleksandr@rambler.ru)

Salagaeva Angelica Dmitrievna, Student, Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation.

E-mail: [salagaeva93@mail.ru](mailto:salagaeva93@mail.ru)

Procenko Alexander Evgenievich, Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of Chemistry Department, Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russian Federation.

## MORPHOFUNCTIONAL GROWTH PLATE OF THE VERTEBRAL BODY RATS AT GLUCOCORTICOID-INDUCED OSTEOPOROSIS

### Abstract

*Violation of bone metabolism leading to the development of osteoporosis and fractures of bones is the most frequent side effect of treatment with supraphysiological doses of glucocorticoids in people of all ages. However, the influence of factors that cause osteoporosis is usually given without regard to their impact on the cartilage growth plate of the vertebral body.*

*The purpose of research is to study morphofunctional state of the growth plate of the vertebral body of rats with experimental glucocorticoid-induced osteoporosis.*

*It was found that the methods of biochemical analysis prolonging use of a glucocorticoid prednisolone lead to oxidative stress. The rat plasma products record an increase of lipid peroxidation and depression of key antioxidant enzymes. In rats with glucocorticoid-induced osteoporosis structural and functional organization of the growth plate of the vertebral body, resulting in free radical damage and destruction hodrotsitov components of the intercellular substance, is broken. Intensive cell death and destruction of the matrix of cartilage growth plate is a reflection of the local manifestations of oxidative stress, which then eventually leads to dysplasia of the axial skeleton of rats.*

### Keywords

*Glucocorticoid-induced osteoporosis, oxidative stress, growth plate chondrocytes.*

## REFERENCES

1. *Biochemical basis of pathological processes*. Ed. E. S. Severin. Moscow, Medicine Publ., 2000, pp. 34–37. (In Russian)
2. Ziganshin L. E., Burnasheva Z. A., Valeyeva I. Kh. A comparative study of the effectiveness and dimefosfona ksidofofona in steroid osteoporosis in rats. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2002, no. 6, pp. 55–56. (In Russian)
3. Koroljuk M. A. Metod determination of catalase activity. *Laboratory work*. 1988, no. 1, pp. 16–19. (In Russian)
4. Makeev A. A. Effect of antioxidant “Thiophane” on the morphogenesis of the axial skeleton of rats under conditions of oxidative stress mothers. *Bulletin of KrasGAU*. 2012, pp. 38–41. (In Russian)

5. Makeev A. A., Sakharov A. V., Prosenko A. E. Effect of antioxidant thiophane on indicators of oxidative stress in rats at puberty. *Siberian herald of agricultural science*. 2010, no. 4, pp. 72–75. (In Russian)
6. Menshchikova E. B., Zenkov N. K., Lankin V. Z., Bondar I. A., Trufakin V. A. *Oxidative stress: Pathological conditions and diseases*. Novosibirsk, ARTA Publ., 2008, 284 p. (In Russian)
7. *Determination of the resistance to oxidation of low density lipoprotein blood serum*. Methodic Recommendations. Comp. Y. I. Ragin, M. I. Dushkin. Novosibirsk, 1998, 11 p. (In Russian)
8. Pavlova V. N. *Cartilage*. Moscow, Medicine Publ., 1988, 320 p. (In Russian)
9. *Guidelines for osteoporosis*. Ed. L. I. Benevolenskaya. Moscow, Binom Publ.; Knowledge Laboratory Publ., 2003, pp. 430–433. (In Russian)
10. Steel I. D. *Modern methods in biochemistry*. Moscow, Medicine Publ., 1977, 391 p. (In Russian)
11. Laihia J. K., Jansen C. T., Ahotupa M. Lucigenin and linoleate enhanced chemiluminescent assay for superoxide dismutase activity. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, vol. 14, pp. 457–461.
12. Lukert B. P., Raicz L. G. Glukokortikoid-induced osteoporosis: patnogenesis and management. *Ann. Intern Med.* 1990, 112 (5), pp. 352–364.
13. Van Staa T. P., Leufkens H. G. M., Abenhaim L., Zhang B., Cooper C. Use of Oral Corticosteroids and Risk of Fractures. *J. Bone Miner. Res.* 2000, 15, pp. 993–1000.