

Н. В. Родионова, Е. В. Каткова, О. Н. Нестеренко, Е. В. Скрипченко

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена Национальной академии наук Украины, Киев

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Изучаются клеточные механизмы гравитационно-зависимых изменений в длинных костях скелета животных, побывавших в условиях космического полета на международном биоспутнике «Бион-М1» и в наземных модельных экспериментах. С учетом полученных данных об ультраструктурных реакциях клеток костной ткани предложена концепция о механизмах механотрансдукции и потери костной массы при снижении (снятии) гравитационной нагрузки.

Ключевые слова: клетки костной ткани, невесомость, длинные кости, электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования, проведенные на космических биоспутниках и станциях в России (ГНЦ РФ ИМБП РАН), США (научно-исследовательские центры NASA), странах Европейского Союза, показали, что костный скелет является важной мишенью действия невесомости на организм. Установлено, что в этих условиях уменьшается масса, прочность и минеральная насыщенность скелета, особенно в костях, которые несут опорную нагрузку (длинные кости конечностей, позвонки, кости таза), развиваются остеопения, иногда остеопороз [1–3, 7, 9]. Однако до настоящего времени остаются во многом не выясненными клеточные механизмы, которые обеспечивают структурную и функциональную адаптацию и дезадаптацию костного скелета к изменениям стато-динамических нагрузок.

Практическую значимость проблема приобретает не только в связи с необходимостью нахождения человека в условиях космического полета (невесомость), а также с дефицитом опорно-двигательных нагрузок (гипокинезия) у

жителей развитых стран, что приводит к появлению «болезни цивилизации» — остеопороза. По данным ВОЗ каждый год увеличивается заболеваемость и смертность населения в результате остеопоротических переломов, особенно у пожилых людей.

Цель наших исследований — получение новых данных о клеточных механизмах гравитационно-зависимых изменений в костях скелета в условиях невесомости. В настоящей работе основное внимание уделено изучению и анализу гистоструктурных изменений и ультраструктурных реакций остеогенных клеток (остеобластов, остеоцитов, остеокластов) в зонах адаптивных и деструктивных перестроек в костях конечностей животных, пребывавших в условиях реальной («Бион-М1») и моделированной невесомости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на мышах (линия C 57 black, самцы), пребывавших на биоспутнике «Бион-М1», продолжительность полета 30 сут (с 19 апреля по 19 мая 2013 г.) в рамках международного эксперимента со специалистами России ГНЦ РФ ИМБП РАН.

После полета и прибытия в ИМБП РАН мыши (5 полетных и 8 контрольных из наземного синхронного эксперимента) были подвергнуты наркозу согласно требованиям этических норм. Биообразцы костной ткани из берцовых и плечевых костей фиксировали в 2.5 % растворе глютаральдегида на фосфатном буфере, pH – 7.4 и транспортированы в Киев, где проводилась их дальнейшая обработка для гистологических, гистохимических и электронно-микроскопических исследований (заклучение в парафин и эпоксидные смолы, изготовление гисто- и ультратонких срезов).

МОДЕЛИРОВАННАЯ НЕВЕСОМОСТЬ

Нами был поставлен наземный эксперимент на животных (белые крысы, самцы, 4-мес. возраста) с моделированием микрогравитации (снятие опорной нагрузки с задних конечностей на протяжении 21 сут путем подвешивания за хвост под углом 35° по методу [9]). Животных перед забоем наркотизировали эфиром согласно требованиям этических норм. Биообразцы берцовых костей фиксировали в 6 %-м формальдегиде и 2.5 %-м глютаральдегиде для гистологических и электронно-микроскопических исследований соответственно. Гистопрепараты окрашивали гематоксилином Майера-эозином, гематоксилином Майера-тионин-эозином, исследовали в световом микроскопе «Цейс». Ультратонкие срезы контрастировали ацетатом свинца и изучали в электронном микроскопе «Тесла БС-500».

Анализ полученных гистопрепаратов и электронных микрофотографий проводили с использованием компьютерной программы «Biovizard». Подсчитаны следующие показатели: относительный удельный объем костной ткани в метафизах и диафизах (на условную единицу площади среза), удельный объем шелей и полостей, количество остеобластов и остеоцитов, в том числе с признаками апоптоза, пустых остеоцитарных лакун, а также остеокластов (на единицу площади гистосреза) др. Результаты исследований обработаны статистически с использованием программы Microsoft Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что условия невесомости («Бион-М1») влияют на структуру берцовых костей мышей. Имеют место нарушения архитектоники и частичная деструкция костных трабекул в метафизах, участки расслоения и полости в кортикальной кости диафизов (рис. 1). Относительный удельный объем трабекул достоверно снижается, удельный объем полостей возрастает, в условиях моделированной гипокинезии аналогичные изменения в берцовых костях крыс выражены меньше (таблица).

Указанные выше перестройки свидетельствуют об утрате костной массы в исследованных костях.

Известно, что процессы остеогенеза и адаптивного ремоделирования в костях скелета происходят в тесной топографической взаимосвязи с кровеносными капиллярами и сопровождаю-

Морфометрические показатели изменений в костных структурах берцовых костей мышей при невесомости («Бион-М1») и крыс (моделированная гипокинезия) на условную единицу площади гистосреза

Показатели	Полетная группа (м ± χ_m)	Контрольная группа (м ± χ_m)
Относительный удельный объем в метафизах		
Мыши	0.193 ± 0.010	0.231 ± 0.011
Крысы	0.238 ± 0.011	0.263 ± 0.013
Относительный удельный объем полостей в диафизе		
Мыши	0.042 ± 0.002	0.027 ± 0.001
Крысы	0.047 ± 0.002	0.029 ± 0.001
Количество остеокластов	4.13 ± 0.20	2.84 ± 0.14
Количество пустых остеоцитарных лакун	4.21 ± 0.21	2.57 ± 0.12
Количество функционально-активных остеокластов	8.14 ± 0.40	12.72 ± 0.63

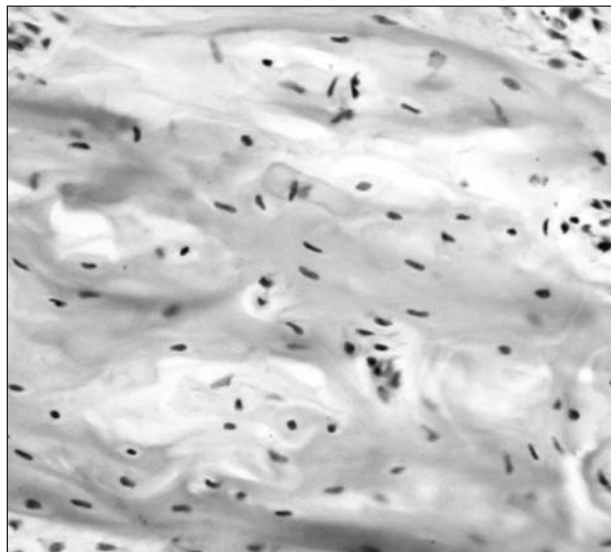


Рис. 1. Расслоение костных пластинок и остеопоротические полости в диафизе берцовой кости мыши («Бион-М1», ширина микрофотографии 205 мкм)

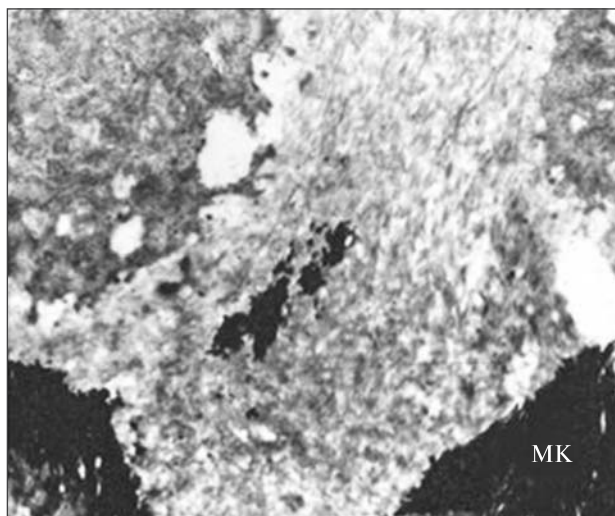


Рис. 2. Деминерализация и зоны фиброза в диафизе берцовой кости мыши («Бион-М1», ширина электронной микрофотографии 1.66 мкм)

щими их периваскулярными клетками. По сравнению с контрольными, у опытных животных отмечено расширение костных сосудистых каналов и усиление васкуляризации кортикальной кости, что отражает процесс ее деструктуризации и может рассматриваться как реакция на невесомость.

В костных каналах регистрируются клетки моноцитарного ряда, формирующие остеокласты — клетки, которые резорбируют минерализованный костный матрикс по ходу вrostания сосудов. Количество остеокластов в таких зонах у опытных животных увеличивается (таблица). Проведенные ранее исследования особенностей ультраструктуры и метаболизма 45Ca^{2+} в остеокластах в условиях снятия опорной нагрузки с задних конечностей и микрогравитации показали активизацию остеокластической резорбции минерализованного костного матрикса [11].

Кровеносные сосуды сопровождаются также малодифференцированными клетками фибробластического типа. Радиоавтографическими исследованиями с 3H -тимидином (предшественником синтеза ДНК) и применением маркеров остеогенной дифференцировки показано, что в зонах остеогенеза и ремоделирования идет последовательная дифференцировка периваскулярно расположенных клеток в остеогенные [4]. В экспериментах на крысах с моделированием и применением 3H -тимидина установлено снижение интенсивности пролиферации остеогенных клеток-предшественников, замедление их дифференцировки в остеобласты и процессов их трансформации в остеоциты [5].

Исследования, проведенные нами в модельных экспериментах со снятием опорной нагрузки с задних конечностей крыс и применением электронной микроскопии и цитохимических маркеров остеогенной дифференцировки, показали, что в зонах ремоделирования и деструктивных перестроек костных структур происходит уменьшение количества дифференцирующихся остеогенных клеток-предшественников и возрастание количества фибробластов, т. е. условия снятия опорной нагрузки замедляют (или частично блокируют) остеогенную дифференцировку части периваскулярных клеток и стимулируют дифференцировку фибробластов, что приводит к появлению зон фиброза, участков, заполненных коллагеновыми фибриллами, которые не минерализуются. На костных поверхностях появляются адипоциты. Такую реакцию можно рассматривать как один из механизмов замедления интенсивности остеогенетических

процессов в костях и снижения их прочности. Это отмечено и в эксперименте на «Бион-М1»: вблизи кровеносных сосудов в кортикальной кости мышей появляются характерные зоны деминерализации и фиброза. Это подтверждают и проведенные нами электронно-микроскопические исследования (рис. 2).

В костной ткани метафизов и диафизов берцовых костей мышей («Бион-М1»), а также в берцовых костях крыс (моделированная невесомость) в популяции остеобластов в зонах остеогенеза уменьшается количество функционально-активных форм (имеют низкое ядерно-цитоплазматическое отношение), продуцирующих органический костный матрикс, то есть остеобластов 2-го и 3-го типа согласно предложенной нами квалификации функционального состояния остеобластов [4]. В популяции остеобластов увеличивается количество апоптотных клеток, особенно это характерно для остеобластов костной ткани берцовых костей мышей («Бион-М1»).

По данным электронной микроскопии в ядрах функционально-активных остеобластов усиливается гетерохроматинизация, матрикс митохондрий становится электронно-плотным, цитоплазматическая мембрана теряет четкость контуров, снижается удельный объем гранулярной эндоплазматической сети (ГЭС) и комплекса Гольджи, органелл, которые принимают участие в процессах биосинтеза органических компонентов костного матрикса, коллагеновых белков и гликозаминогликанов. Специфическим для невесомости является состояние ГЭС: узкие короткие каналы ГЭС без расширений распределяются по всей цитоплазме и не имеют типичной для остеобластов в контроле пространственной организации (рис. 3). Следует полагать, что нарушение типичной архитектуры органелл является следствием дезорганизации (или «разборки») аппарата микротрубочек, а также деструктивных процессов в мембранах. В условиях моделированной невесомости эти явления выражены в меньшей степени.

Полученные нами данные свидетельствуют, что снятие гравитационной нагрузки приводит к снижению остеопоетических функций остеоб-

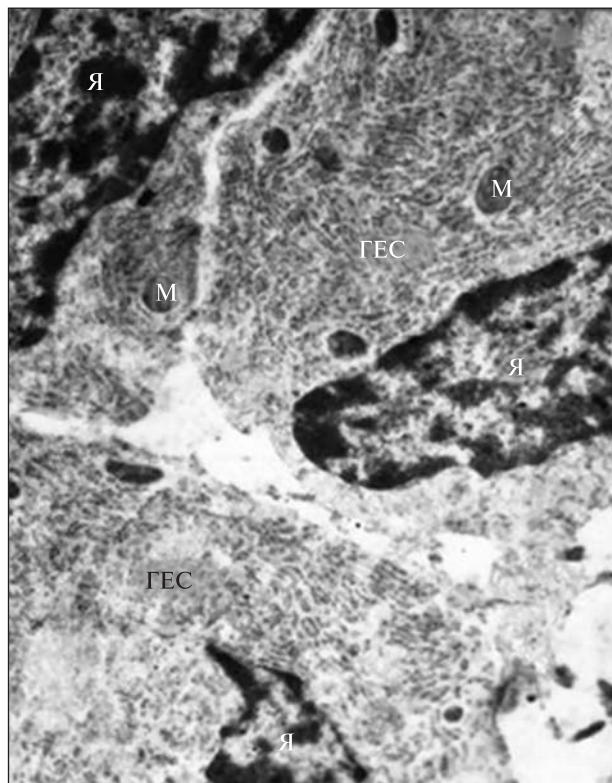


Рис. 3. Остеобласты: Я — ядро, ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть, М — митохондрия, КМ — костный матрикс («Бион-11», 10 дней, ширина электронной микрофотографии 3.6 мкм)

ластов. Это подтверждено и в модельных экспериментах на крысах с использованием 3Н-глицина [6].

В зонах костных перестроек имеет место трансформация остеобластов в выстилающие эндост клетки (bone-line cells). Электронно-микроскопическое исследование популяции остеобластов в костной ткани мышей, пребывавших в условиях невесомости («Бион-М1») позволило выявить такую метаболическую функцию остеобластов (характерную для остеоцитов), как участие в остеолитических процессах при адаптивном remodelирования костной ткани.

При трансформации в выстилающие эндост клетки в остеобластах происходит утилизация части ГЭС путем аутофагоцитоза (в клетках увеличивается удельный объем аутофаголизосом), возрастает также удельный объем структур ком-

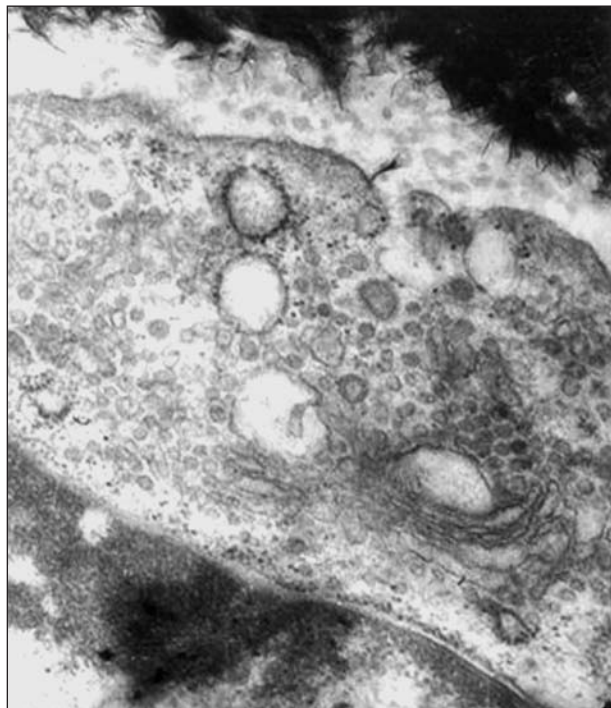


Рис. 4. Выстилающая остеогенная клетка (фрагмент), усиление остеолитических процессов, направленных на деминерализацию костной ткани («Бион-М1», ширина электронной микрофотографии 7.6 мкм)

плекса Гольджи, особенно везикулярного компонента — лизосом (0.156 ± 0.006 , опыт; 0.124 ± 0.005 , контроль, $P < 0.005$). Содержащие остеолитические ферменты лизосомы поступают на прилежащую костную поверхность, где осуществляют остеолитический процесс минерализованного костного матрикса (рис. 4).

В популяции зрелых остеоцитов в диафизах берцовой кости мышей увеличивается количество апоптотных клеток и пустых остеоцитарных лакун (таблица), на основе которых формируются костные полости и развивается «порозность». Возрастает площадь остеоцитарных лакун, в которых находятся функционирующие остеоциты, что свидетельствует об усилении их остеолитической функции — ферментативном растворении окружающего остеоциты минерализованного матрикса. Такая реакция остеоцитов подтверждена при анализе их ультраструктуры — в клетках достоверно возрастает удельный объем структур комплекса Гольджи и лизосом-

ных структур (0.140 ± 0.007 , опыт; 0.119 ± 0.005 , $P < 0.05$). Усиление процессов остеолитического процесса в остеоцитах подвздошной кости было отмечено нами в эксперименте на обезьянах на «Бион-11» [13]. Остеолитические процессы направлены на деминерализацию и деструкцию костной ткани и приводят к развитию «порозности» в костях.

Полученные результаты вносят новое в разработанную нами концепцию о механизмах механотрансдукции и потери костной массы при снижении (снятии) гравитационной нагрузки [6, 12]. В зонах перестроек костных структур имеет место следующая последовательность клеточных взаимодействий:

- первичной является реакция остеоцитов (рассматриваются как механосенсорные клетки [8, 10], что выражается, как показано нами [6, 13], в усилении процессов остеоцитарного остеолитического;
- передача механических сигналов через систему костных каналов и контактирующих отростков остеобластам и выстилающим эндост клеткам, а также клеткам костномозговой стромы;
- замедление в системе стромальные клетки — остеогенные клетки-предшественники — остеобласты процессов пролиферации и дифференцировки, снижение остеопозитивных функций остеобластов;
- трансформация остеобластов в выстилающие эндост клетки, в которых усиливаются процессы остеолитического костного матрикса.

При длительном отсутствии гравитационной нагрузки на костный скелет физиологически адекватного восстановления процессов остеогенеза в костной ткани не происходит (или масштабы его снижаются), в локусах ремоделирования может развиваться фиброзная ткань, которая не минерализуется, а также появляются адипоциты.

Эта последовательность клеточных реакций может рассматриваться как один из механизмов потери костной массы, что лежит в основе развития остеопении и остеопороза при дефиците гравитационной нагрузки.

Авторы благодарны коллегам из ГНЦ РФ ИМБП РАН Б. С. Шенкману, Л. Б. Буравковой, В. С. Ога-

нову, О. Е. Кабицкой за возможность научного сотрудничества в эксперименте на «Бион-М1».

Робота виконана в рамках Целевої комплексної програми НАН України по научним космічним дослідженням на 2012—2016 гг., проект «Клеточные механизмы гравитационно зависимых процессов в костях скелета в условиях микрогравитации».

1. Григорьев А. И., Воложин А. И., Ступаков Г. П. Минеральный обмен у человека в условиях измененной гравитации. — М.: Наука, 1994. — Т. 74. — 216 с.
2. Оганов В. С. Костная система, невесомость и остеопороз. Изд. 2-е, перераб. и доп. — Воронеж: Науч. книга, 2014. — 291 с.
3. Оганов В. С., Григорьев А. И. О механизмах остеопении и особенностях метаболизма костной ткани человека в условиях невесомости // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2012. — **98**, № 3. — С. 395—409.
4. Родионова Н. В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе. — Киев: Наук. думка, 1989. — 186 с.
5. Родионова Н. В. Динамика пролиферации и дифференцировки остеогенных клеток при снятии опорной нагрузки // Цитология и генетика. — 2011. — **45**, № 2. — С. 22—27.
6. Родионова Н. В. Цитологічні механізми перебудов у кістках при гіпокінезії та мікрогравітації. — Київ: Наук. думка, 2006. — 238 с.
7. Doty S. B. Space flight and bone formation // Materwiss Werksttech. — 2004. — **35**, N 12. — S. 951—961.
8. Klein-Nulend J. Bacabac R. G. Veldhuyzen J. P., et al. Microgravity and bone cell mechanosensitivity // Adv. Space Res. — 2003. — **32**, N 8. — P. 1551—1559.
9. Morey-Holton E. R., Globus R. K. Hindlimb unloading of growing rats: A model for predicting skeletal changes during space flight // Bone. — 1998. — **22**, N 5. — P. 79—82.
10. Noble B. S., Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone structure resistance // Mol. and Cell. Endocrinol. — 2000. — **159**, N 1-2. — P. 7—13.
11. Rodionova N. V., Oganov V. S. Peculiarity of ultrastructure and ⁴⁵Ca methabolism of osteoclasts in conditions of hind limb unloading and microgravity // Vestnik zoology. — 2009. — **43**, N 4. — P. 305—313.
12. Rodionova N. V., Oganov V. S., Kabitskaya O. Conception on the cell mechanisms of bone tissue loss under space

flight conditions // 40th COSPAR Scientific Assembly. — 2014. — F5.2-7-14 (electron publ.).

13. Rodionova N. V., Oganov V. S., Zolotova N. V. Ultrastructural changes in osteocytes in microgravity conditions // Adv. Space Res. — 2002. — **30**, N 4. — P. 765—770.

Стаття надійшла до редакції 15.12.14

Н. В. Родіонова, О. В. Катькова,
О. М. Несстеренко, О. В. Скрипченко

Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена
Національної академії наук України, Київ

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ У КЛІТИНАХ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ В УМОВАХ КОСМІЧНОГО ПОЛЬОТУ

Вивчаються клітинні механізми гравітаційно-залежних змін у довгих кістках скелета тварин, що перебували в умовах космічного польоту на міжнародному біосупутнику «Біон-М1» і у наземних модельних експериментах. З урахуванням отриманих даних про ультраструктурні реакції клітин кісткової тканини запропоновано концепцію механізмів механотрансдукції та втрати кісткової маси при зменшенні (усуненні) гравітаційного навантаження.

Ключові слова: клітини кісткової тканини, невагомість, довгі кістки, електронна мікроскопія.

N. V. Rodionova, O. V. Katkova,
O. N. Nesterenko, O. V. Skripchenko

I. I. Schmalhausen Institute of Zoology
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE CELLS OF THE BONE TISSUE IN SPACE FLIGHT

The article is devoted to studying of the cellular mechanisms of gravitational-dependent changes in the long bones of the animals' skeleton during the space flight on the international biosatellite «Bion-M1» and in land model experiments. Taking into account the obtained new data about ultrastructural reactions of bone tissue cells, the concept about mechanisms of the mechanotransduction and bone mass loss at lowering (removal) gravitational loading is offered.

Key words: cells of bone tissue, weightlessness, long bones, electron microscopy.