

DOI: 10.26693/jmbs03.05.045

УДК 591.471- 035

Скрябіна О. М.¹, Нужна О. К.², Яковенко Н. О.²

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ КІСТОК СКЕЛЕТУ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ГОРМОНІВ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

¹ДЗ «Луганський державний медичний університет», Рубіжне, Україна²Чорноморський національний університет ім. П. Могили, Миколаїв, Україна

kozij67@gmail.com

Даний експеримент було проведено на 120 білих безпородних статевонезрілих щурах. Тварини були розділені на дві групи. Першу (контрольну) серію склали інтактні щури, яким підшкірно вводили дистильовану воду. Тваринам другої групи вводили інсулін в середньо-експериментальному дозуванні. У дослідженні використовувалися методи остеометрії, гістоморфометрії, ЯМР-релаксації протонів тканинної води, біохімічний і біомеханічний аналіз. Дослідження показали, що у статевонезрілих тварин другої групи після введення інсуліну на 7 добу в довгих трубчастих кістках з'явилася дегідратація кісток, а на 14 добу експерименту спостерігалось збільшення темпів зростання кісток в ширину і зниження темпів зростання в довжину в порівнянні з контрольною групою тварин. До 30 доби експерименту міцність кісток знижується.

Ключові слова: щури, кістки, інсулін.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «Особливості росту, будови, формоутворення та регенерації кісток скелету під впливом деяких фізичних факторів хвильової природи», № державної реєстрації 01950015790.

Вступ. Серед фундаментальних проблем сучасної анатомії однією з найбільш актуальних є проблема визначення закономірностей зміни кісткової системи за умови впливу на організм екзо- та ендогенних факторів. Функціональній анатомії кісткової системи під впливом різних факторів зовнішнього та внутрішнього середовища присвячені роботи багатьох учених [4, 7, 8, 11]. У той же час сучасні статистичні дані ВООЗ підтверджують зростання ендокринологічної захворюваності серед населення більшості країн світу, яка займає третє місце за поширеністю та причинами смертності населення. Цукровий діабет становить 36% усіх ендокринних захворювань і є одним з найбільш важких захворювань за критеріями перебігу та ускладнень, за показниками інвалідності та смерт-

ності. Враховуючи, що хворі на цукровий діабет потребують пожиттєвого медичного нагляду, а рівень ускладнень його в окремих регіонах сягає 70%, ця проблема стає однією з найактуальніших. Саме цим був обумовлений вибір вивчення впливу екзогенного інсуліну на особливості росту та морфологічні зміни кісткової системи щурів.

Мета дослідження. Вивчення особливостей росту та морфологічних перетворень у кістковій системі щурів при введенні в організм екзогенного інсуліну.

Матеріали та методи дослідження. Експеримент проводився на 120 білих безпородних щурах статевонезрілого віку (30–35 діб, вихідною масою 50–60 г) згідно з «Правилами проведення робіт з експериментальними тваринами» (1977), відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013). Тварини розподілялись на групи залежно від виду введених речовин та тривалості експерименту. Першу (контрольну) групу склали 60 інтактних щурів, які отримували підшкірно дистильовану воду в об'ємі, що дорівнює дозі інсуліну. Другу групу склали 60 тварин, яким вводили інсулін у середньоекспериментальній дозі 3 ОД/кг [2].

По закінченню експеримента (7, 14, 30 доба – по 20 тварин першої і 20 другої групи) щурів забивали декапітацією під ефірним наркозом з одночасним взяттям крові. У дослідженні використовували методи: остеометрії, гістоморфометрії, біохімічний та біомеханічний аналіз, ЯМР-релаксація протонів тканинної води. Отримані дані обробляли статистично методом математичної статистики з використанням стандартного пакета програм (Microsoft Excel 2003, Statistica 6.0). Дані вибірок обох груп, що досліджувались, згідно критерію Смирнова-Колмагорова були однорідними, описувались однією функцією розподілення на рівні довірчої

вірогідності 0,95. Для оцінки достовірності розбіжностей між даними використовувались параметричний критерій Стюдента та непараметричний критерій Вілкоксона (для спряжених пар) та Вілкоксона-Манна-Уїтні (для незалежних вибірок). Для оцінки кореляційних зв'язків між даними використовувався параметричний критерій Пірсона та непараметричний критерій Спірмена.

Результати дослідження та їх обговорення.

При введенні щурам інсуліну зміни росту та формоутворення скелету мали різноспрямований характер та залежали від тривалості введення препарату. При введенні інсуліну в дозі 3 ОД/кг у добу статевонезрілим тваринам протягом однієї доби відзначалося скорочення спін-спінового (T2) часу релаксації протонів тканинної води в губчастих кістках, що вказує на формування кристалічної фракції води. У губчастих кістках спостерігалось скорочення T1 і T2, а також переміщення води в позаклітинний простір, що свідчить про зменшення гідрованого шару води, і вказує на дегідратацію кісток [6, 13]. У змішаних кістках відзначалось збільшення T1 і T2, та як наслідок цього зростав шар гідратної води. Ці дані підтверджують і дослідження О.К. Кістаурі (1982) [3] про те, що інсулін утримує воду тканинами організму.

Відомо, що джерелом поздовжнього росту довгих трубчастих кісток є епіфізарний хрящ. Зміни його структури протягом всього експерименту були неодноточні. Так, до 7 доби дослідження потовщення епіфізарного хряща до $651,06 \pm 17,3$ мкм переважно за рахунок проліферативної та дефінітивної його зон. Збільшення відсоткового вмісту клітин у зоні проліферуючих хондроцитів, а також частки первинної спонгіози в зоні остеогенезу свідчили про підвищення інтенсивності кісткоутворюючих процесів. Такі зміни структури епіфізарного хряща можна пояснити анаболічним ефектом інсуліну [11].

Як показало наше дослідження, у статевонезрілому віці тривале введення інсуліну призводить до сповільнення темпів приросту поздовжніх розмірів кісток. Так, довжина великогомілкової, стегнової, плечової і тазової кісток та III поперекового хребця не досягають контрольних значень на 3,2%, на 3,5%, на 4,2%, на 0,64%, і на 4,3% відповідно. Проте було виявлено підвищення швидкості росту кісток у ширину, досягаючи максимальних значень наприкінці експерименту. Так, приріст поперекових розмірів довгих трубчастих кісток склав: для великогомілкової кістки – 5,45%, для стегнової – 4,35% і для плечової – 4% відповідно до контролю. Поряд з цим затримувались темпи росту тазових кісток і III поперекового хребця.

Сповільнення приросту довжини кісток, зменшення кількості хондроцитів у стовпчиках

проліферуючого хряща, а також зменшення частки первинної спонгіози є свідченням зниження швидкості дозрівання хряща, зменшення проліферативної активності, і як наслідок цього порушується процес утворення органічного матриксу хондроцитами, а зниження активності остеобластів веде до сповільнення мінералізації. Такі зміни також пов'язані з тим, що повторні гіпоглікемії призводять до мобілізації продукції контрінсулінових факторів (адреналін, кортикоїди), що підвищують потребу організму в інсуліні [10].

Упродовж усього дослідження спостерігалось деяке потовщення середини діафізу довгих трубчастих кісток, досягаючи максимальних величин наприкінці другого місяця (достовірно поширення діаметру остеонів спостерігалось на 30 добу експерименту).

Аналіз хімічного складу виявив поступове зниження вологості кісток, що досягає мінімальних значень на 14 добу експерименту і поєднується з підвищенням рівня глікемії й зниженням інсуліну в крові, а також зниженням рівня гідрофільних елементів натрію та калію. Наприкінці експерименту відсотковий вміст води в кістках скелету піддослідної групи щурів не відрізнявся від контрольних значень, що підтверджує ЯМР-релаксометрію.

Зміни органічного компоненту кісток пов'язані із ступенем гідратації тканин. Збільшення спін-спінової (T2) релаксації протонів тканинної води свідчить про підвищений рівень синтезу ліпідів, досягає максимальних величин на 14 добу експерименту й збігається з максимальним підвищенням вмісту органічних речовин у кістках. Це вказує на пряму залежність між поперечним часом релаксації (T2) і внутрішньоклітинним вмістом води в кістковій тканині [5, 6, 13]. Зниження рівня органічних речовин до рівня контрольних значень також пов'язане з адаптаційними можливостями зростаючого організму статевонезрілих тварин [1].

Підвищення вмісту мінеральних речовин, сполучене із збільшенням Са/Р коефіцієнта, відбувається на початку експерименту, й досягає максимальних значень через 14 діб введення інсуліну. Даний процес може бути наслідком гіперінсулінемії.

Подальше введення гормону бета-клітин острівкового апарату підшлункової залози призвело до перебудови вуглеводного та інших видів обміну, що супроводжувалось зниженням рівня мінеральних речовин у досліджуваних кістках. Вивчення макроелементного складу великогомілкових кісток виявило аналогічні зміни кальцію при практично незмінному рівні фосфору.

Характеристики міцності плечової кістки неухильно змінювались, сягаючи максимальних змін на 30-у добу експерименту. Так, модуль пружності до

цього часу був більше контрольних величин на 5,73%, а межа міцності та зруйнування поступово знижувались. До кінця досліджу біомеханічні показники стали нижче контрольних. Такі зміни міцності кісток пов'язані із зниженням кількості мінеральних речовин, а також з порушенням їх гістологічної структури.

Висновки. Початковий етап експерименту (перший тиждень) над нестатевозрілими щурами виявив підвищення проліферативної активності епіфізарного хряща у великоомілкових кістках з проявом тенденції збільшеного приросту їх поперечних та поздовжніх розмірів під впливом екзогенного інсуліну. Подовження спін-решітчастої та скорочення спін-спінової релаксації вказує на сповільнений протонний обмін між вільною та гідрованою фракціями води.

Подальше введення інсуліну протягом 30 діб призводить до поступового звуження епіфізарного

хряща порівняно з контрольними показниками. Поряд з цим сповільнюються темпи поздовжнього росту великоомілкових кісток при збереженні підвищеної активності приросту поперечних розмірів. Збільшення часу релаксації протонів тканинної води призводить до незначної гіпергідратації всіх кісток, що досліджувались.

Незважаючи на початкове зростання характеристик міцності плечової кістки, вони до кінця досліджу стали нижче контрольних значень. Вірогідно, тривале введення інсуліну призвело до інсулінової інтоксикації, яка сприяла порушенню обмінно-регулюючих механізмів фосфорно-кальцієвого гомеостазу.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується вивчення особливостей формування кісток скелету щурів під впливом інших гормонів підшлункової залози у різних вікових групах.

References

1. Drzhevetskaya YA. *Endokrynnaya sistema rastushchego organizma*. M: Vysshaya shkola, 1987. 207 s. [Russian].
2. Zapadnyuk VY, Zapadnyuk YP, Zakharyya EA. *Laboratornye zhyvotnye*. Kyev: Vyshcha shkola, 1983. 383 s. [Russian].
3. Kystaury AK. Kostnaya patologyya u bolnykh sakharnym dyabetom. *Sovremennaya medytsyna*. 1990; 2: 32-5. [Russian].
4. Koveshnykov VG. Zonalnoe stroenye epyfyzarnogo khryashcha. *Antropogenetyka, antropologyya y sport*. 1980; 2: 251-2. [Russian].
5. Komarevtseva YA, Orlova EA. Deystvye byologicheskoy aktyvnykh peptydov y steroydov na yaderno-magnitno-rezonansnyu relaksatsyyu protonov tkanevoy vody pochk in vitro. *Ukraynsky byokhymychesky zhurnal*. 2016; 68 (4): 91-5. [Russian].
6. Korniyenko VN, Rumakov YY, Tsyb YaF. *Yadernomagnitnyy rezonans v medytsyne*. M: VNIIMY, 2005. s. 88-93. [Russian].
7. Luzyn VY. Vliyanye obemno-kombynatsyonnykh ymпульsnykh elektromagnitnykh poley na rostovye potentsyy skeleta nepolovozrelykh belykh kryes. Medyko-biologichni problemy promyslovogo regionu. Lugansk: Vitalina, 2010. s. 37-44. [Russian].
8. Pykalyuk VS, Kondratyuk VA. Yzuchenye byologicheskogo deystviya vody s razlychnym sootnosheniyem yonov kalt-syya y magnyya. *Tezy doklada I Ukraynskogo sezda anatomov, gystologov, embryologov y topografoanatomov*. Vynnytsa, 1980. s. 78-9. [Russian].
9. Starkova NT. *Klynycheskaya endokrynologyya*. M: Medytsyna, 1991. 521 s. [Russian].
10. Shreyber V. *Patofyziologyya zhelez vnutrenney sekretsyy*. Praga: Avytsenum, 2015. 493 s. [Russian].
11. Barret-Cannor E, Kritz-Silverstein P. Does hyperinsulinemia preserve bone. *Diabetes Care*. 2010; 19 (12): 1388-92. PMID: 8941469.
12. Beall PT, Hazlewood CF. Distinction of the normal preneo-plastic and neoplastic states by waterproton NMR relaxation times. In: *Nuclear magnetic resonance imaging*. 1983. p. 312-38.
13. Brooks D, Kuwata K, Schleich T. Determination of proton magnetization transfer constants in heterogeneous biological systems. *Magn Reson Med*. 1994; 31 (3): 331-36. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910310315>.

УДК 591.471- 035

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ КОСТЕЙ СКЕЛЕТА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ГОРМОНОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Скрябина О. М., Нужная Е. К., Яковенко Н. А.

Резюме. Данный эксперимент проводился на 120 белых беспородных неполовозрелых крысах. Животные были разделены на две группы. Первую (контрольную) группу составили интактные крысы, которым подкожно вводили дистиллированную воду. Животным второй группы вводили инсулин в среднеэкспериментальной дозировке. В исследовании использовались методы остеометрии, гистоморфометрии,

ЯМР-релаксация протонов тканевой воды, биохимический и биомеханический анализ. Исследования показали, что у неполовозрелых животных второй группы после введения инсулина на 7 сутки в длинных трубчатых костях произошла дегидратация костей, а на 14 сутки эксперимента наблюдалось увеличение темпов роста костей в ширину и снижение темпов роста в длину в сравнении с контрольной группой животных. К 30 суткам эксперимента прочностные характеристики костей снижаются.

Ключевые слова: крысы, кости, инсулин.

UDC 591.471-035

Features of Rats' Skeleton Formation under the Influence of Insulin

Skryabina O.M., Nuzhna O. K., Yakovenko N. O.

Abstract. One of the fundamental problems of modern anatomy is the problem of determining regular changes in the bone system under the influence of the exo- and endogenous factors of the organism.

The purpose of our study was researching the features of rat's bones growth and morphological transformations after introducing exogenous insulin.

Material and methods. The experiment was carried out on 120 white sexually immature rats (30–35 days old, with the initial weight of 50–60 g). The animals were divided into groups depending on the type of substances introduced and the duration of the experiment. The first (control) group was made up of contact rats, which got distilled water in the volume equal to the dose of insulin. The second group consisted of animals, which were injected with insulin in the average experimental dose – 3 U/kg.

At the end of experiment, the rats were killed by decapitation under ethereal anesthesia with the simultaneous taking blood for study. We used the following methods of investigation: osteometry, histomorphometry, biochemical and biomechanical analysis, NMR relaxation of tissue fluid protons. The obtained data were processed by mathematical statistical methods using the standard program package (Microsoft Office 2003, Microsoft Excel 2003, Statistica 6.0).

Results and discussion. We observed increasing of the proliferative activity of the tibia epiphyseal cartilage with a tendency to increase their transverse and longitudinal dimensions under the influence of exogenous insulin at the initial stage of the experiment (first week). Changes of spin relaxation indicated a delayed proton exchange between free and hydrated fractions of water in bones.

Further introduction of insulin (for 30 days) led to a gradual narrowing of the epiphyseal cartilage in comparison with the control parameters. In addition, the rate of the tibia longitudinal growth was slowing down at the background of increased activity of transverse size growth. An increase of the protons relaxation time in the tissue fluid led to a slight hyperhydration of all investigated bones.

The increase in the mineral substances content, combined with the increase of the Ca/P coefficient, took place at the beginning of the experiment and reached the maximum indexes after 14 days of introduction of insulin. This process can be explained by the hyperinsulinemia.

Further introduction of the beta-cells hormone led to a reorganization of the carbohydrate and other types of metabolism, which was accompanied by a decrease in the level of mineral substances in the investigated bones. The investigation of the tibia macronutrient composition showed the same changes in calcium level at the background of not-changed level of phosphorus.

Conclusions. Despite the initial increase of the humerus density characteristics, they became less than control indexes at the end of the experiment. The long-term administration of insulin possibly led to insulin intoxication, which contributed to the disturbance of the exchange regulatory mechanisms of phosphoric and calcium homeostasis.

Keywords: rats, bones, insulin.

Стаття надійшла 15.04.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування