

## СТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ПОЗВОНОЧНИКЕ НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ СВИНЦОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

**В. Е. Мальцева**

*Лаборатория морфологии соединительной ткани (руков. – д. мед. н., проф. Дедух Н. В.), ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины». 61024, Харьков, ул. Пушкинская 80. e-mail: maltseva.val.ev@gmail.com.*

### STRUCTURAL DISORDERS IN SPINE OF IMMATURE RATS AT LEAD INTOXICATION

**V. E. Maltseva**

#### SUMMARY

Lead contamination remains an actual publichealth problem. The effect of lead on the spine has not been thoroughly researched. The experiment was conducted on 16 white laboratory rats, 1.5-month old. The animals in the experimental group were receiving a solution of lead acetate (230 mg/l) in drinking water for 2.5 months. The vertebrae and intervertebral discs were investigated by methods of atomic absorption spectrometry, light microscopy, and histomorphometry. Because of intoxication, the vertebrae and intervertebral discs of rats contained lead; the content of calcium and zinc in their vertebrae decreased. The trabecular bone volume, the growth plate height and the number of contacts of the trabeculae with the cortex in the vertebrae was decreased. Lead intoxication causes degenerative disorders in the intervertebral disc of rats, affecting both the structure of lamellas and the density of cells

### СТРУКТУРНІ ПОРУШЕННЯ У ХРЕБТІ СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ В УМОВАХ СВИНЦОВОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

**В. Є. Мальцева**

#### РЕЗЮМЕ

Забруднення навколишнього середовища свинцем залишається актуальною проблемою охорони здоров'я. При цьому вплив свинцевої інтоксикації на хребет є маловивченим. Дослідження проведено на 16 лабораторних щурах (вік 1,5 міс.), тварини піддослідної групи отримували розчин ацетату свинцю (230 мг/л) в якості питної води 2,5 міс. Досліджували тіла хребців і міжхребцеві диски методами атомно-абсорбційної спектрометрії, світлової мікроскопії та гістоморфометрії. За даними дослідження свинець був виявлений у тілах хребців та у міжхребцевих дисках, спостерігалось зниження вмісту кальцію і цинку в тілах хребців в умовах свинцевої інтоксикації. В тілах хребців щурів виявлені остепенічні порушення і зменшення висоти зони росту, а у міжхребцевих дисках – дегенеративні зміни, пов'язані зі зниженням щільності клітин і зменшенням ширини пластин фіброзного кільця під впливом свинцю.

**Ключевые слова:** свинец, позвоночник, межпозвонковый диск, тело позвонка, крыса, свинцовая интоксикация.

Загрязнение окружающей среды свинцом остается актуальной проблемой здравоохранения в связи с доказанным негативным влиянием на организм человека даже при небольшой концентрации (0,05 мг/л) этого элемента в крови [1]. Замещение кальция свинцом в структуре гидроксилатапата кости отрицательно сказывается на прочностных характеристиках костной ткани, и может быть фактором риска переломов [2]. Дети представляют собой группу риска вследствие наличия у них более быстрого включения свинца в кость, чем у взрослых, что может вызвать не только торможение роста, но и низкий пик костной массы [3]. Проживание в крупных городах повышает вероятность воздействия свинца на организм детей из-за значительного количества автомобильного транспорта и промышленных предприятий, которые являются главными источниками по выбросу соединений свинца в окружающую среду.

По статистике 80% населения в мире страдает от болей в нижней части спины, одной из причин которых являются дегенеративные заболевания

позвоночника. Однако весь перечень факторов, как эндогенных, так и экзогенных, вызывающих данные нарушения, окончательно не установлен. При дегенеративных заболеваниях позвоночника изменения в костной ткани раньше всего появляются в поясничном отделе. Существуют различные исследования, связанные с изучением влияния свинца на длинные кости скелета, но данных, касающихся нарушений в позвоночном столбе крайне мало, что и обусловило необходимость проведения нашего исследования.

Цель исследования: изучить влияние свинцовой интоксикации на тела позвонков и межпозвонковые диски поясничного отдела позвоночника крыс.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование было проведено на 16 белых лабораторных крысах-самцах возрастом 1,5 мес. на момент начала эксперимента. Животных разделили на 2 группы: контрольную и опытную. Крысы опытной группы получали

раствор ацетата свинца (230 мг/л) в дистиллированной воде в качестве питьевой, в контрольной группе – дистиллированную воду. Исследования длились 2,5 мес., после чего животных выводили из эксперимента путем передозировки эфира. Для последующего анализа были выделены поясничные отделы позвоночника. При работе с животными соблюдались международные нормы по биоэтике [4].

Атомно-абсорбционная спектрометрия тел позвонков и межпозвонковых дисков были проведена на базе Сумского государственного университета согласно принятой там методике [5]. В телах позвонков и дисках проводили анализ на содержание свинца. Дополнительно в костной ткани тел позвонков определяли содержание кальция и цинка.

Гистологическую обработку образцов проводили по методике Д. С. Саркисова [6]. С каждого препарата выполнили по 5 фронтальных центральных срезов, окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ материала проводили под световым микроскопом Primostar (Carl Zeiss). Гистоморфометрические исследования включали измерение высоты зоны роста, количества клеток в пролиферативных колонках, объема губчатой кости тела позвонка, количества контактов трабекул с кортексом; ширины пластин и плотности клеток внешнего отдела фиброзного кольца, плотности клеток студенистого ядра, согласно рекомендациям Г. Г. Автандилова [7].

Цифровые данные были обработаны методами вариационной статистики (t-критерий Стьюдента), методом корреляционного анализа Пирсона и регрессионного анализа. Результаты и обсуждение

Спектрометрический анализ был проведен с целью не только установления факта непосредственного наличия свинца в тканях дисков и тел позвонков, но и изучения изменения макро- и микроэлементного состава костной ткани тел позвонков в условиях моделирования свинцовой интоксикации. По данным спектрометрического анализа в телах позвонков крыс опытной группы было выявлено наличие свинца, тогда как в контроле его не было обнаружено. Полное отсутствие свинца в костной ткани у крыс контрольной группы можно объяснить молодым возрастом животных на момент начала эксперимента и последующим употреблением дистиллированной воды в качестве питьевой.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдалось достоверное снижение содержания кальция в кости в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) у крыс опытной группы, что могло возникнуть в результате замещения кальция свинцом в структуре гидроксилапатита [2]. Также необходимо отметить наличие тенденции снижения содержания цинка в опытной группе, по сравнению с контролем. По данным J. Lai и соав. добавление в пищу цинка крысам при свинцовой интоксикации улучшает рост кости в длину, что может

указывать на возможный недостаток цинка в организме животных при моделировании воздействия свинца [8]. Известно, что дефицит цинка в организме отражается на темпах роста, так как цинк является активным центром в структуре щелочной фосфатазы, фермента, участвующего в минерализации остеоида [9]. Существуют данные подтверждающие, что свинец угнетает активность щелочной фосфатазы в кости, но механизм этого явления не установлен [10]. Обнаруженное снижение содержания цинка в кости, возможно, вызывает угнетение биосинтеза щелочной фосфатазы остеообластами, а значит – нарушение минерализации.

В телах позвонков крыс контрольной группы при гистологическом анализе структурная организация губчатой и компактной кости не была нарушена. Зона роста была представлена слоем покоящихся хондроцитов, хондроцитов клиновидной формы, располагающихся в пролиферативных колонках, зоной гипертрофированных клеток и кальцифицирующимся хрящом, что соответствовало норме.

У крыс опытной группы в губчатой кости отмечалось разрежение трабекулярной сети, трабекулы были истончены и имели неровные поверхности. При измерении объема губчатой кости было выявлено снижение этого показателя на 7,8% ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контролем (табл. 1). Данные изменения могут быть связаны как с усилением резорбтивных процессов, на что указывает снижение толщины и зазубренность поверхностей костных трабекул, так и с торможением костеобразования, что в целом является нарушением ремоделирования кости. В местах контакта трабекул с компактной костью тел позвонков встречались трабекулы со слепыми окончаниями, а по данным гистоморфометрии количество контактов трабекул с кортексом уменьшилось на 33,5% ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Снижение количества таких контактов может свидетельствовать об усилении резорбтивных процессов.

При изучении структуры зоны роста наблюдалось изменение характерной зональности, что проявлялось в уменьшении ширины зон гипертрофии и кальцификации, а в пролиферативной зоне – появлении бесклеточных участков. Высота зоны роста была снижена на 3,8% ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контролем, а количество хондроцитов в пролиферативных колонках снизилось на 13,6% ( $p < 0,05$ ) (табл.). Данные морфометрии зоны роста указывают на возможное замедление темпов роста и формирования кости в результате уменьшения количества хондроцитов в зоне пролиферации и общего снижения высоты зоны роста, а также могут быть связаны с уменьшением содержания кальция и цинка в костной ткани опытных животных.

Для подтверждения зависимости между снижением объема губчатой кости и изменениями в зоне роста тел позвонков крыс опытной группы был

Таблица

**Изменение морфометрических параметров тел позвонков и межпозвонковых дисков крыс при свинцовой интоксикации**

Вид измерений	Контроль (M±m)	Опыт (M±m)
<b>Тела позвонков</b>		
Высота зоны роста (µm)	90,7±1,81	87,3±1,53*
Количество хондроцитов в пролиферативной колонке	6,6±0,09	5,7±0,09*
Объем губчатой кости (%)	44,8±0,02	37±0,02*
Количество контактов трабекул с кортексом	19,6±1,07	13,04±0,69*
<b>Межпозвонковые диски</b>		
Плотность фиброхондроцитов (на мм <sup>2</sup> )	189,4±7,89	166,4±3,42*
Ширина пластинок ФБ (µm)	36,4±0,74	33,6±0,73*
Плотность клеток в СЯ (на мм <sup>2</sup> )	463,6±23,15	353,4±14,2*

Примечание: \* – различия между средними значениями  $p < 0,05$   
Сокращения: ФБ – фиброзное кольцо, СЯ – студенистое ядро.

проведен корреляционно-регрессионный анализ. Выявлено, что существует сильная корреляция  $r = 0,91$  ( $p = 0,025$ ) между указанными выше параметрами, причем изменение доли губчатой кости можно описать уравнением  $y = 0,5195x - 8,4039$ , где  $y$  – объем губчатой кости в телах позвонков (%),  $x$  – высота зоны роста (µm) в 83 % случаев.

Полученные нами данные о нарушениях в зоне роста, а также о снижении объема губчатой кости, соответствуют изменениям, описанным в литературе для длинных костей крыс при свинцовой интоксикации [11, 12].

Спектрометрический анализ показал наличие свинца в межпозвонковом диске крыс опытной группы, тогда как в контроле данный элемент не был обнаружен. Наличие свинца в тканях диска вероятно связано с нарушением структуры диска, что приводит к накоплению кальция в местах структурных изменений [13], который впоследствии возможно замещается свинцом. Содержание свинца в трех образцах взятых для анализа значительно колебалось, возможно, из-за различной степени дегенерации диска у отдельных животных.

При гистологическом анализе в межпозвонковом диске крыс опытной группы имели место структурные изменения, как в фиброзном кольце, так и в студенистом ядре. В фиброзном кольце было отмечено растрескивание пластинок по ходу коллагеновых волокон, при этом более крупные трещины располагались между параллельно расположенными пластинами. На участках растрескивания наблюдалось снижение численности клеток, что было подтверждено данными гистоморфометрии, согласно которым количество клеток во внешнем отделе фиброзного кольца уменьшилось на 12,14 % ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контролем. Уменьшение численности клеток может быть обус-

ловлено цитотоксическим эффектом свинца. Ширина пластинок в дисках животных опытной группы также уменьшилась на 7,7 % ( $p < 0,05$ ). Известно, что свинец угнетает синтез гликозаминогликанов хондроцитами [14], что вероятно и объясняет изменение ширины пластинок фиброзного кольца, наряду со снижением плотности клеток.

Во внутреннем отделе фиброзного кольца наблюдали разволокнение пластинок, на участках отмечено формирование крупных изогенных групп хондроцитов, включающих от 4 до 6 клеток. Матрикс имел строение сходное с гиалиновым хрящом. В некоторых лакунах хондроцитов встречался клеточный детрит.

В студенистом ядре повышена плотность клеток с пикнотичными ядрами, общее количество клеток по данным гистоморфометрии было снижено на 23,8 % ( $p < 0,05$ ), по сравнению с контролем. Такие изменения в численности клеток свидетельствуют о влиянии свинца на клеточную популяцию студенистого ядра и фиброзного кольца.

**ВЫВОДЫ**

В условиях моделирования свинцовой интоксикации у неполовозрелых крыс обнаружена кумуляция свинца, как в телах позвонков, так и в межпозвонковых дисках, а также снижение содержания кальция и цинка в телах позвонков.

В телах позвонков обнаружены остеопенические нарушения и изменения в зоне роста, при этом уменьшается объем губчатой кости, количество контактов трабекул с кортексом, высота зоны роста и количество хондроцитов в пролиферативных колонках.

В межпозвонковых дисках выявлены дегенеративные изменения, что выражалось в снижении плотности клеток и изменении структурной организации пластинок фиброзного кольца.

*Данное исследование было выполнено в рамках плановой НИР института «Вивчити механізми розвитку остеопенічних та остеопоротичних порушень скелету в умовах травматичного ушкодження довгих кісток» 2011–2013 р., ЦФ 2011.1. АМНУ, № Госрегистрации 0111U000068.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Preventing disease through healthy environments exposure to lead: a major public health concern. – Электронный ресурс. – Точка доступа: <http://www.who.int/ipcs/features/lead.pdf>.
2. The effect of Pb (2+) on the structure and hydroxyapatite binding properties of osteocalcin/T. L. Dowd, J. F. Rosen, L. Mints, C. M. Gundberg//Biochim Biophys Acta. – 2001. – Vol. 1535, № 2. – P. 153–163.
3. The association between environmental lead exposure and bone density in children/J.R. Campbell, R. N. Rosier, L. Novotny, J. E. Puzas//Environ. Health Perspect. – 2004. – Vol. 112, № 11. – P. 1200–1203.
4. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад – Електронний ресурс. – Режим доступу: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137).
5. Макро- та мікро- елементи (обмін, патологія та методи визначення). Монографія/М. В. Погорелов, В. І. Бумейстер, Г. Ф. Ткач, та інші. – Суми: Видавництво СумДУ, 2010. – 147 с.
6. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника/Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перова//М.: Медицина, 1996. – 542 с.
7. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия/Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
8. Effect of iron and zinc levels in diet on development of bone in growing rats exposed to lead/J. Lai, J. Zhou, S. Yin, X. Zhao//Wei Sheng Yan Jiu. – 2004. – Vol. 33, № 4. – P. 461–463.
9. The role of zinc in the growth and development of children/M. J. Salgueiro, M. B. Zubillaga, A. E. Lysionek, et al.//Nutrition. – 2002. – Vol. 18. – P. 510–519.
10. Payal B. New insight into the effects of lead modulation on antioxidant defense mechanism and trace element concentration in rat bone/B. Payal, H. P. Kaur, D. V. Rai//Interdisc Toxicol. – 2009. – Vol. 2, № 1. – P. 18–23.
11. Effect of lead on bone development and bone mass: a morphometric, densitometric, and histomorphometric study in growing rats/A. Escribano, M. Revilla, E. R. Hernández et al.//Calcif Tissue Int. – 1997. – Vol. 60, № 2. – P. 200–203.
12. Effect of lead on bone and cartilage in sexually mature rats: A morphometric and histomorphometry study/J. Gonzalez-Riola, E. R. Hernandez, A. Escribano, et al.//Environ. Res. – 1997. – Vol. 74. – P. 91–93.
13. Disc Calcification. – Электронный ресурс. – Точка доступа: <http://www.mdguidelines.com/disc-calcification>.
14. Zhitnikov A. I. Chondrocyte metabolism in growing and definitive cartilage exposed to lead acetate/A. I. Zhitnikov, P. M. Mazhuga//Tsitol Genet. – 1988. – Vol. 22, № 2. – P. 3–7.