

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

**Інститут зоології ім.І.І.Шмальгаузена**

**01601, м.Київ-30, вул. Б.Хмельницького, 15**

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Директор Інституту зоології

ім. І.І.Шмальгаузена

НАН України

член-кор. НАН України

\_\_\_\_\_ І.А.Акімов

«\_\_\_» \_\_\_\_\_

**ЗВІТ**

**ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ**

**«КЛІТИННІ МЕХАНІЗМИ ГРАВІТАЦІЙНО-ЗАЛЕЖНИХ ПРОЦЕСІВ У  
КІСТКАХ СКЕЛЕТУ В УМОВАХ МІКРОГРАВІТАЦІЇ»**

**Етап 4. Проліферативні потенції та ультраструктура остеогенних клітин в  
зонах остеопоротичних перебудов в довгих кістках при мікрогравітації (Біон  
М1)**

**„Цільова комплексна програма НАН України з наукових космічних досліджень  
на 2012 – 2016 рік”**

КЕРІВНИК НДР

Старший науковий співробітник

канд. біол. наук

Н.М. Акуленко

**Київ – 2016**

## Список авторів

Керівник НДР

Старший науковий співробітник

канд. біол. наук

Н.М. Акуленко

Відповідальний виконавець

наук. співроб.

канд. біол. наук

О.В. Скрипченко

Відповідальний виконавець

мол. наук. співроб.

канд. біол. наук

Н.В. Дзюбенко

## РЕФЕРАТ

Звіт складається з 36 сторінок, в тому числі 8 ілюстрацій (світлових та електронних мікрофотографій), 1 таблиця, 23 джерела літератури.

На базі відділу цитології та гістогенезу Інституту зоології НАНУ була зроблена обробка біозразків кісткової тканини мишей (лінія C57 Black) з космічного експерименту Біон-М1. Також було проведено наземний експеримент на тваринах (білі щури, самці, 4-міс. віку) з моделюванням мікрогравітації (зняття опорного навантаження на задні кінцівки протягом 28 діб) для отримання зразків кісткової тканини. Біозразки кісткової тканини були досліджені за допомогою таких методів: культура клітин, світлова мікроскопія, електронна мікроскопія, цифрова мікрофотозйомка, морфометричний та статистичний аналіз з використанням комп'ютерних програм.

Результати та їх новизна.

Були отримані нові для науки данні про гравічутливість стромальних клітин, в тому числі, про їх остеобластичні потенції. Доведено, що в умовах гіпогравітації відбувається індукція адипоцитогенезу. Це підтверджується і електронно-мікроскопічними дослідженнями: в клітинах, що дифференціюються, та в зрілих остеогенних клітинах знижується питомий обсяг органел, що відповідальні за біосинтетичні процеси (клітин кісткового мозку, що містять МСК та остеогенні клітини-попередники. Встановлено, що в умовах модельованої мікрогравітації зменшується кількість колонієутворюючих стромальних клітин кісткового мозку, знижуються їх дифференційовані гранулярна ендоплазматична сітка, комплекс Гольджі), має місце їх часткова деструкція, збільшується кількість лізосом та мієлінових структур. Зростає електронна щільність мітохондрій, відбувається часткова дезорганізація цитоскелету.

Були отримані нові дані про морфо-функціональні особливості клітинних взаємодій остеоцитів, остеобластів, фібробластоподібних та мало дифференційованих клітин в зонах адаптивного ремоделювання кісткових структур. Була запропонована концепція ремоделювання, яка складає наступну послідовність у розвитку клітинних взаємодій після зниження механічного навантаження: первинна реакція остеоцитів (механосенсорних клітин) на зняття механічного стимулу; остеоліз за допомогою остеокластів, передача механічних сигналів через систему каналів функціонально активних остеобластів і ендостального вистилання, а також до стромальних клітин кісткового мозку і периваскулярних клітин.

Результати НДР мають фундаментальне значення, вносить нове в розумінні клітинних механізмів гравічутливості кісткової тканини, а також можуть бути використані при розробці тест-систем з метою діагностики та прогнозів в травматології та ортопедії, космічній медицині.

Ключові слова. Кісткова тканина, остеобласти, остеобласти, мікрогравітація, ре моделювання кістки.

## ЗМІСТ

ЗМІСТ .....	4
ВСТУП.....	5
1. ОСНОВНА ЧАСТИНА .....	7
1.1. СТАН ПРОБЛЕМИ.....	7
1.1.1. Загальні відомості про розвиток, структуру та функції кісткової тканини ...	7
1.1.2. Гравічутливість клітин.....	11
1.2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	15
1.2.1 Умови невагомості (« Біон-М1») .....	15
1.2.2 Модельована невагомість .....	15
1.3 Результати та їх обговорення.....	17
1.3.1. Структурно-функціональні зміни у клітинах кісткової тканини довгих кісток мишей в умовах космічного польоту .....	17
1.3.2. Гістоструктурні перебудови в кістках скелету піддослідних тварин в умовах гіпокінезії і мікрогравітації .....	20
1.3.3. Зміни в гістоструктурі проксимальних метафізів стегнових кісток щурів при гіпокінезії.....	23
1.3.4. Особливості ультраструктури остеоцитів в зонах адаптивних і деструктивних перебудов у кістках піддослідних тварин в умовах мікрогравітації .....	27
1.3.5. Концепція про механізми механотрансдукції і втрати кісткової маси при зниженні (знятті) гравітаційного навантаження .....	29
ВИСНОВКИ .....	33
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ .....	34

## ВСТУП

Зміни кісткової тканини, викликані мікрогравітацією в умовах космічного польоту або імітацією цих умов в різних наземних експериментах, вже кілька десятиліть залишаються дуже популярною темою дослідження. Крім наукових установ, які займаються даними дослідженнями протягом десятиліть і безпосередньо пов'язані з організацією космічних польотів (в Росії - ДНЦ РФ ІМБП РАН, в США науково-дослідні центри NASA), відповідні дослідження проводяться в багатьох медичних і біологічних лабораторій іншої спрямованості [1, 2, 3]. Увага великої кількості дослідників до проблем ремоделювання кістки в умовах мікрогравітації викликана не стільки необхідністю для людства освоювати космос, скільки іншими, більш прагматичними причинами. Зараз можна сміливо сказати, що експерименти в умовах мікрогравітації виявилися виключно успішною моделлю для вивчення багатьох загальних питань, що стосуються ключових подій остеогенеза [3]. Показано, що дані дослідження можуть бути використані як модельний експеримент для вивчення особливостей кальцієвого обміну в організмі [4], або для вивчення тонких регуляторних взаємодій ремоделювання кістки. Великі перспективи має використання мікрогравітації для моделювання в медичних дослідженнях патологій, пов'язаних з особливостями обміну кальцію, зокрема, віковими [5]. Дослідження кісткової тканини в умовах мікрогравітації в певній мірі дозволяють відтворити і проаналізувати ланцюг подій, що призводять до розвитку досить поширених в сучасному суспільстві хвороб, пов'язаних зі зміною звичного способу життя, зокрема, різних проявів остеопорозу [6]. Дослідження недиференційованих попередників кровотворення в умовах мікрогравітації дозволяють зробити висновки про механізми, що впливають на міграцію і проліферацію ранніх попередників остеогенеза і остеоцитів, що регулюють диференціювання в нормі [7]. Вплив зміни механічного навантаження на нормальний стан кісток тканини і остеогенез в умовах мікрогравітації дозволяє також прояснити загальні механізми, що зв'язують масу тіла хребетних тварин і особливості розвитку скелета в онто- і філогенезі [8].

Незважаючи на великі перспективи, що відкривають подібні дослідження, клітинні та тканинні механізми впливу мікрогравітації на кістковий скелет та розвиток остеопоротичних змін залишаються багато у чому нез'ясованими. Не вивчені роль та ступінь участі стромальних клітин-попередників в ієрархії гравічутливості клітин в системі стромально-остеобластно-остеоцитарного синцитію, що забезпечує функціонування кісткової тканини та трансдукцію в ній механічних сигналів. Для в'яснення механізмів гравітаційно-залежних реакцій клітин строми кісткового мозку необхідним є електронно-мікроскопічне вивчення стану клітин: ядра та клітинних органел. Вивченню змін в ультраструктурі клітин строми при мікрогравітації в нашій роботі приділено особливу увагу. Аналіз наукової літератури показав, що такі дослідження нечисленні та малоінформативні. Експерименти на тваринах зі зниженням опорного навантаження на задні кінцівки та вивчення реакції стромальних клітин кісткового мозку в умовах *in vitro* – оптимальна модель для пошуку відповідей на ці фундаментальні питання.

Мета роботи: отримання нових наукових даних про зміни ультраструктури, особливості диференціювання та функціональних потенцій стромальних клітин кісткового мозку, які містять остеогенні клітини-попередники, про механізми гравічутливості клітин при зниженні гравітаційного навантаження.

В завдання роботи входить проведення експерименту на щурах зі зняттям опорного навантаження на задні кінцівки, вивчення на клітинних культурах *ex vivo* строми кісткового мозку, що включають остеогенні клітини-попередники, особливостей колонієутворення, цитологічних та ультраструктурних характеристик клітин, направленості їх диференціювання та специфічного функціонування.

Дослідження виконані з використанням комплексу методів (клітинних культур *ex vivo*, *in vitro*, цитології, цитохімії, електронної мікроскопії, ультраструктурометрії та ін.), цифрової мікро-фотозйомки та комп'ютерних програм аналізу зображень.

У практичному плані дослідження проблеми вкрай важливе для галузей клітинних технологій та клітинної інженерії, що зараз інтенсивно розвиваються, а саме травматології, ортопедії, космічної медицини.

# 1. ОСНОВНА ЧАСТИНА

## 1.1. СТАН ПРОБЛЕМИ

### 1.1.1. Загальні відомості про розвиток, структуру та функції кісткової тканини

Кісткова тканина є одним з типів сполучної тканини і складається з клітинних елементів (остеобластів, остеоцитів, остеокластів) та міжклітинної речовини (матриксу), яка утворена фібрилярними білками і основною (аморфною) речовиною. Матрикс кісткової тканини включає до свого складу кристали мінералу (головним чином гідроксиапатит), завдяки чому кісткову тканину відносять до класу біокомпозитних матеріалів. Оглядові відомості про розвиток, структуру та ряд функцій клітин та міжклітинної речовини кісткової тканини представлені в ряді посібників та статей.

Остеобласти є основним типом клітин кісткової тканини. Накопичена велика кількість відомостей, що відбивають багаточисельні аспекти структури і метаболізму остеобластів. За даними світлової мікроскопії, остеобласти – великі клітини (30-40 мкм діаметром) з ексцентричним ядром і великим об'ємом цитоплазми. Мають базофільну цитоплазму, виявляють ШИК-позитивне забарвлення,  $\gamma$ -метахромазію та інші цитохімічні реакції. Характерним для них є значний вміст лужної фосфатази.

Типовою ознакою ультраструктури остеобластів є інтенсивний розвиток гранулярної ендоплазматичної сітки (ГЕС), яка утворює систему каналів з фібрилярним вмістом. Добре розвинений комплекс Гольджі. В цитоплазмі описані чисельні полісоми, везикули, лізосоми, мітохондрії, іноді "розбухлі" [9].

Остеобласти продукують компоненти органічного матриксу кістки (колагенові білки (I типу) і глікозаміноглікани та ін.) і беруть участь в їх мінералізації. Це доведено біохімічними дослідженнями і особливо радіоавтографічними працями з використанням  $^3\text{H}$ -проліну,  $^3\text{H}$ -гліцину,  $^{35}\text{S}$  - сульфату [10].

Остеобласти синтезують також неколагенові білки: остеокальцин, КСП, остеопонтин,  $\text{TFP}_{\beta 1-5}$ , остеонектин та інші морфогенетичні протеїни кістки ( $\text{BMP}_5$ ). Остеобласти мають рецептори до гормонів та регуляторних факторів (паратгормон, простагландіни  $\text{E}_2$ - $\text{PGE}_2$ ,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  та ін.). Комбінація остеокальцину, лужної

фосфатази у високій концентрації, синтезу колагену I типу при відсутності колагену III типу, наявність рецепторів для ПТГ характерні для остеобластичного фенотипу. Особливості специфічного функціонування остеобластів і механізми їх участі в мінералізації ще не з'ясовані і інтенсивно досліджуються.

Наші дослідження [11] показали, що популяція остеобластів не однорідна в різних зонах кістки: остеобласти варіюють за формою, ультраструктурою, біосинтетичною активністю і розташуванням. За показниками ультраструктури, в зонах інтенсивного остеогенезу нами виділено 4 типи в популяції остеобластів. Остеобласти також приймають участь в транспортуванні кальцію і фосфату в кістковий матрикс. В процесі кісткоутворення більша частина остеобластів замурується в остеїд, який мінералізується, і трансформується в остецити. Деякі остеобласти залишаються на кістковій поверхні, перетворюючись на клітини подовженої форми, які вистилають кісткові поверхні (bone lining cells).

Остецити є термінальною стадією диференціювання остеобластів. Це найбільш багаточисельна клітинна популяція кісткової тканини. Клітини розташовуються в остеоцитарних лакунах і мають довгі відростки, що потрапляють в кісткові канали і формують лакунарно-каналцеву сітку. Остецити мають більш високе, порівняно з остеобластами, ядерно-цитоплазматичне співвідношення, слабо-базофільну цитоплазму. Повний перелік їх функцій ще не складено. Нова точка зору свідчить про те, що остецити виконують функцію забезпечення цілісності кісткового матриксу, беруть участь в регуляції мінерального гомеостазу кісткової тканини, в процесах остеолізу, забезпечують реакцію на механічні стимули [12]. Ультраструктура остеоцитів описана в працях [13], проте наявні відомості суперечливі. За ультраструктурними властивостями, деякі автори розподіляють остецити на три фази: формативні, резорбтивні, дегенеративні. Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що остецити в процесі росту кістки також можуть бути у різних морфо-функціональних станах залежно від ступеню їх зрілості (молоді остецити; зрілі остецити; остецити, що гинуть) і специфічної метаболічної активності [14].



Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що остеокласти не є однорідною популяцією. Наші дослідження ультраструктури остеокластів показали, що остеокласти в кістці, що росте, розрізняються за формою, розміром, кількістю ядер, ступенем розвитку клітинних органел, "щіткової кайми", а також за рівнем біосинтетичної активності, що визначається інтенсивністю включення  $^3\text{H}$ -урідину та  $^3\text{H}$ -метионіну. Базуючись на цьому, ми виділили молоді остеокласти, зрілі функціонально активні остеокласти та остеокласти, що руйнуються (ті, що гинуть) [14]. Вищезгадані морфофункціональні стани остеобластів представляють послідовні стадії їх життєвого циклу в умовах нормальних морфогенетичних процесів в кістці.

Механізми біомінералізації вивчені ще недостатньо. Як один з механізмів мінералізації в грубоволокнистій кістці розглядається концепція „матричних пухирців”, які шляхом екзоцитозу відокремлюються від клітин і в міжклітинному просторі слугують ядрами для формування кристалів гідроксиапатиту. Припускають, що в пластинчастій кістці основна маса іонів аморфного фосфату кальцію відкладається в міжмолекулярних просторах колагенових фібрил, де і відбувається їх мінералізація.

Розвиток кісткових структур з мезенхімної тканини відбувається в онтогенезі двома шляхами в залежності від особливостей кістки. Внутрішньомембранний розвиток має місце в пласких кістках і відбувається шляхом диференціювання периваскулярних мезенхімних клітин в остеобласти. Інший спосіб – енхондральний розвиток кістки – шляхом заміщення попередньо сформованої хрящової закладки кісткою. Енхондральний процес включає: васкуляризацію хрящових закладин; утилізацію хрящової тканини макрофагами і хондрокластами (при відсутності мінералізації хряща) чи остеокластами; диференціювання малодиференційованих клітин, які надходять з судинами в остеогенні клітини і продукують кістковий матрикс на поверхні хрящових трабекул. В процесі розвитку кісткових структур шляхом ремоделювання відбувається заміна первинної грубоволокнистої кістки пластинчастою кістковою тканиною. В губчастій кістці міжклітинний матрикс утворений паралельними, поперечно зшитими кістковими пластинами (ламелами). В

компактній кістці кісткові пластини розташовуються концентрично навколо Гаверсових каналів, в середині яких проходять кровоносні судини та нерви, і формують остеони (діаметром 20-300 мкм). Остеони розташовуються відповідно функціональному навантаженню на кістку: в довгих кістках – паралельно довжині вісі кістки, в губчастих – перпендикулярно вертикальній вісі, в плоских кістках черепа – паралельно до площини кістки та радіально.

В трабекулах і остеонах між ламелами розташовуються лакуни (5-10 мкм), в яких знаходяться остеоцити, а також система каналців (діаметром біля 1 мкм), де проходять контактуючі відростки остеоцитів. Ця лакунарно-каналікулярна сітка, а також периостеоцитарний простір заповнені інтерстиціальною рідиною, і разом з кровоносними судинами їх розглядають як транспортну систему кістки, яка забезпечує трофіку кісткової тканини, а також передачу керуючих сигналів між клітинними елементами кістки в процесі її функціональної адаптації до механічних навантажень, що змінюються.

В довгих кістках формується діафіз (кісткова трубка), епіфізи (проксимальний і дистальний) і перехідні зони (метафізи). В кістках, що ростуть, розташовується хрящова пластинка, що забезпечує ріст кісток в довжину. Діафізи сформовані пластинчастою (чи компактною) кістковою тканиною. Кісткові трабекули епіфізів складаються з губчастої тканини. Кісткова трубка і міжтрабекулярні простори заповнені кістковим мозком. Кісткові поверхні зовні вкриті періостом (окістя), з середини – ендостом, до складу цих структур входять остеогенні клітини. Пластинчаста кістка мінералізована на 80-90% і виконує взагалі механічну і захисну функції, трабекулярна – мінералізована лише на 15-20% і виконує перш за все метаболічну функцію, хоча виконує і опорні функції, особливо в таких кістках як хребці.

Процеси морфогенезу і ремоделювання кісткових структур забезпечуються двома різноспрямованими процесами – кістковою аппозицією (з участю остеобластів) і кістковою резорбцією (з участю остеокластів). Сукупність клітин в зоні ремоделювання названа Parfitt A.M. BRU (bone remodeling unit) – „блок

ремоделювання” чи „одиниця ремоделювання кістки”. Клітинні механізми ремоделювання кісткових структур в наш час є предметом інтенсивного вивчення.

Підтримання кальцієвого гомеостазу в організмі (постійна концентрація кальцію в крові на рівні 11мг%) і метаболізм кальцію в кістковій тканині – суміжні процеси. Їх погодження регулюється на системному рівні, і локальними факторами. Як системні (чи дистанційні) регулятори виступають гормони. Паратгормон (ПТГ) – гормон щитовидної залози – підтримує концентрацію  $Ca^{2+}$  в крові і у зовнішньоклітинній рідині, клітини-мішені ПТГ знаходяться в кістковій тканині, кишковикі, нирках. Кальцитонін (КТ) – гормон щитовидної залози, синтезується в С – клітинах і чинить гальмуючий ефект на процеси резорбції кісткової тканини, знижуючи активність остеокластів. Метаболіти вітаміну Д (1,25 - (ОН)<sub>2</sub> Д<sub>3</sub> – кальційтриол А і 24,25 - (ОН) Д<sub>3</sub> беруть участь в процесах диференціювання клітин остеокластичного ряду, гальмують синтез колагену в остеобластах. В системній регуляції кальцієвого гомеостазу приймають участь і інші гормони: гормони росту, полові гормони, глюкокортикоїди та ін. Системні фактори регуляції кісткового метаболізму взаємодіють з локальними (чи місцевими) факторами. Це ростові фактори – поліпептиди, які здатні стимулювати проліферацію, діючи на мембранні рецептори клітин-мішеней. Як локальні регулятори виступають неколагенові білки (остеонектин, остеокальцин, фібронектин та ін.), простагландини і цитокініни (інтерлейкіни) та ін.

### 1.1.2. Гравічутливість клітин

В еволюційному плані клітина – це перший рівень організації живого, здатна сприймати сигнали (фізичні та хімічні) з оточуючого середовища, перетворювати їх в фізіологічний імпульс та формувати реакцію у відповідь на зовнішню дію. Чисельні експерименти з різноманітними типами клітин та клітинних популяцій, виконані в умовах космічного польоту чи при моделюванні мікрогравітації (наприклад з використанням кліностау), показали, що клітина реагує на зміну сили тяжіння.

Механізми впливу гравітації на клітини залишаються здебільшого нез'ясованими. Багато експериментів вказують на роль цитоскелету в цих процесах. В умовах мікрогравітації має місце дезорганізація мікротрубочок в лімфоцитах та епітеліальних клітинах. На рис. 1.2. представлені мікротрубочки в остеобластах.

Французькі вчені виявили, що мікротрубочки тубуліну (елемент цитоскелету) виявляють властивість спонтанної самоорганізації за допомогою реактивно-дифузійних процесів і морфологічної структури, яка виникає, в залежності від напрямку гравітації, тобто механізм, за допомогою якого гравітація втручається в біохімічні процеси – це біфуркаційні властивості деяких типів реактивно-дифузійних процесів. Мікротрубочки в умовах низької гравітації не виявляють самоорганізації, тобто гравітація ініціює цей процес [15].

Такі процеси, вважають автори, можливо, відіграли роль в розвитку життя на Землі. Крім того, гравітація таким чином приймає участь в фундаментальному клітинному процесі і опосередковано впливає на інші клітинні процеси, які в свою чергу залежать від самоорганізації мікротрубочок. Для сприйняття сигналів про зміну напруженості гравітаційного поля існують спеціалізовані гравіорецепторні клітини. Є статоцити у вищих наземних рослинах та отолітовий апарат в клітинах тварин. Загальною для всіх типів клітин в реакціях гравіотаксису (у одноклітинних) чи гравітропізму (у багатоклітинних) є участь в цьому механорецепторів, які сприймають сигнали про зміну напруги гравітаційного поля і передають їх в середину клітини.

За даними Я. А. Виннікова (1995), гравіорецепція у прокариот і ранніх еукариот (кишковопорожнинних, первинноротих) відбувається за допомогою особливих органел, які являють собою кальцієві конкреції (отоконії, отоконіобласти). Сукупність морфогенетичних факторів еволюції (перш за все гравітація Землі) сформувала у них на рівні геному не тільки механізми для рецепції гравітації поля, але і перші органи (рухомі важелі і джгутики) для здійснення локомоцій з метою подолання гравітації. В еукаріотичній клітині, яка вміщує ядерний апарат, з'являється комплекс скорочувальних і здатних до рецепції білків, які формують цитоскелет.

На підставі аналізу літератури і власних досліджень на клітинних культурах Таїрбеков М. Г. (1997, 2002) механізми гравіочутливості клітин розглядаються наступним чином. Механорецептори виступають в якості біологічної „антени”. Подальша реалізація гравітаційного стимулу в клітині відбувається при взаємодії елементів систем внутріклітинної сигналізації з цитоскелетом, ядром, основними цитоплазматичними органелами і клітинною мембраною. Центральна роль передачі фізичного сигналу, в тому числі і гравітаційного, належить вторинним месенджерам, основною функцією яких є перетворення механічного впливу у фізіологічний імпульс у внутрішньоклітинному просторі. До них відносяться, насамперед, високомолекулярні сполуки, а саме: простагландіни, колаген, фібронектин, що складають основу зовнішньоклітинного матриксу (extracellular matrix – ECM), і так звані G-білки, які ідентифікуються як ростові фактори. Перша група бере участь у взаємодії клітини із сусідньою клітиною, тоді як інша – безпосередньо пов’язана з рецепторами і через них з цитоскелетом.

Молекули ECM та G-білків активуються і залучаються до процесу передачі сигналу ззовні до внутрішньоклітинного континіуму при незначних змінах зовнішніх сил на поверхні клітини. Комплекс (ECM, G-білки, рецептор, цитоскелет), що утворюється при цьому, грає визначну роль в регуляції ростових процесів. Ці зміни індукують зсув в характері і швидкості взаємодії молекул, які розташовані на плазматичній мембрані і відповідають за такі процеси, як збудження іонних каналів, активація Na/K АТФ-ази, цАМФ, зміну внутрішньоклітинного  $Ca^{++}$  тощо. Таким чином, механічні сили, застосовані до зовнішньої поверхні клітини, можуть бути причиною суттєвих структурних змін в мембрані і включати всю систему внутрішньоклітинної сигналізації. Активація всього ланцюга передачі сигналу відбувається при дуже незначних діях зовнішніх сил на клітину (наприклад, таких як гравітаційні дії).

Регуляторні функції в клітині виконують механохімічні механізми. Коливання ступеня напруги всередині клітини, що виникають внаслідок перебудови цитоскелету і просторового перерозподілу органел, які розрізняються за масою і розмірами, є однією з основних причин змін метаболічної активності клітини.

Наявність механізму передачі сигналів з поверхні клітини у внутрішньоядерний континіум дозволяє клітині своєчасно і швидко формувати відповідну реакцію на гравітаційний стимул. Молекулярні механізми адаптації клітин до зміненої сили тяжіння, як правило, неспецифічні і здебільшого подібні до механізмів реакцій пристосування по відношенню до інших традиційних факторів оточуючого середовища: високим та низьким температурам, широкому спектру електромагнітних хвиль, хімічним, механічним діям тощо.

## 1.2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 1.2.1 Умови невагомості (« Біон-М1»)

Дослідження проведене на мишах (лінія С 57 black, самці), що перебували на біосупутнику «Біон-М1», тривалість польоту 30 діб (з 19 квітня по 19 травня 2013 р.) в рамках міжнародного експерименту з фахівцями Росії ДНЦ РФ ІМБП РАН.

Після польоту і прибуття в ІМБП РАН миші (5 польотних і 8 контрольних з наземного синхронного експерименту) були піддані наркозу, згідно з вимогами етичних норм.

Біозразки кісткової тканини з гомілкових і плечових кісток фіксували в 2,5% розчині глютаральдегіда на фосфатному буфері, рН – 7,4. і були транспортовані до Києва, де проводилася їх подальша обробка для гістологічних, гістохімічних і електронно-мікроскопічних досліджень (заключення в парафін і епоксидні смоли, виготовлення гісто- і ультратонких зрізів).

### 1.2.2 Модельована невагомість

Нами був поставлений наземний експеримент на тваринах (білі щури, самці, 4 міс. віку) з моделюванням мікрогравітації (зняття опорного навантаження із задніх кінцівок впродовж 21 доби шляхом підвішування за хвіст під кутом 35 по методу Morey-holton et al. [16]). Тварин перед забоем наркотизували ефіром згідно з вимогами етичних норм. Біозразки гомілкових кісток фіксували у 6% формальдегіді і 2,5% глютаральдегіді для гістологічних і електронно-мікроскопічних досліджень відповідно.

Гістопрепарати забарвлювали гематоксиліном Майєра-еозином, гематоксиліном Майєра-тіоніном-еозином, досліджували в світловому мікроскопі «Цейс». Ультратонкі зрізи контрастували ацетатом свинцю і вивчали в електронному мікроскопі «Тесла БС-500».

Аналіз отриманих гістопрепаратів і електронних мікрофотографій проводили з використанням комп'ютерної програми «Biovizard». Підраховані наступні показники: відносний питомий об'єм кісткової тканини в метафізах і діафізах (на умовну одиницю площі зрізу), питомий об'єм щілин і порожнин, кількість остеобластів і остеоцитів, в т.ч. з ознаками апоптозу, порожніх остеоцитарних лакун, а також остеокластів (на одиницю площі гістосрезу) ін. Результати досліджень оброблені статистично з використанням програми Microsoft Excel 2000.



## 1.3 Результати та їх обговорення

### 1.3.1. Структурно-функціональні зміни у клітинах кісткової тканини довгих кісток мишей в умовах космічного польоту

Встановлено, що умови невагомості (Біон-М1) впливають на структуру гомілкових кісток мишей. Мають місце порушення архітектоніки і часткова деструкція кісткових трабекул в метафізах, ділянки розшарування і порожнини в кортикальній кістці діафізів (Рис 1).

Відносний питомий об'єм трабекул достовірно знижується, питомий об'єм порожнин зростає, в умовах модельованої гіпокінезії аналогічні зміни в гомілкових кістках щурів виражені менше (Таблиця). Вказані вище перебудови свідчать про втрату кісткової маси в досліджених кістках.

Відомо, що процеси остеогенезу і адаптивного ремоделювання в кістках скелета відбуваються в тісному топографічному взаємозв'язку з кровоносними капілярами і супроводжуючими їх периваскулярними клітинами. В порівнянні з контрольними, у дослідних тварин відмічено розширення кісткових судинних каналів і посилення васкуляризації кортикальної кістки, що відображає процес її деструктуризації і може розглядатися як реакція на невагомість. У кісткових каналах реєструються клітини моноцитарного ряду, що формують остеокласти – клітини, які резорбують мінералізований кістковий матрикс по ходу вrostання судин. Кількість остеокластів в таких зонах у дослідних тварин збільшується (Таблиця). Проведені раніше дослідження особливостей ультраструктури і метаболізму  $45 \text{Ca}^{2+}$  в остеокластах в умовах зняття опорного навантаження із задніх кінцівок і мікрогравітації показали активізацію остеокластичної резорбції мінералізованого кісткового матриксу [17].

Кровоносні судини супроводжуються також малодиференційованими клітинами фібробластичного типу. Радіоавтографічними дослідженнями з 3Н-тимідином (попередником синтезу ДНК) і застосуванням маркерів остеогенного диференціювання показано, що в зонах остеогенезу і ремоделювання йде послідовне

диференціювання периваскулярно розташованих клітин в остеогенні. У експериментах на щурах з моделюванням і застосуванням ЗН-тімідину встановлено зниження інтенсивності проліферації остеогенних клітин-попередників, уповільнення їх диференціювання в остеобласти і процесів їх трансформації в остеоцити [18].

Таблиця

Морфометричні показники змін в кісткових структурах гомілкових кісток мишей при невагомості (Біон-М1) і щурів (модельована гіпокінезія) на умовну одиницю площі гістозрізу.

Показники		Польотна група ( $m \pm \chi_m$ )	Контрольна група ( $m \pm \chi_m$ )	P
Відносний питомий об'єм в метафізах	Миші	0,193 $\pm$ 0,010	0,231 $\pm$ 0,011	P < 0,05
	Щури	0,238 $\pm$ 0,011	0,263 $\pm$ 0,013	
Відносний питомий об'єм порожнин в діафізі	Миші	0,042 $\pm$ 0,002	0,027 $\pm$ 0,001	P < 0,05
	Щури	0,047 $\pm$ 0,002	0,029 $\pm$ 0,001	P > 0,05
Кількість остеобластів		4,13 $\pm$ 0,20	2,84 $\pm$ 0,14	P < 0,05
Кількість порожніх остеоцитарних лакун		4,21 $\pm$ 0,21	2,57 $\pm$ 0,12	P < 0,05
Кількість функціонально-активних остеобластів		8,14 $\pm$ 0,40	12,72 $\pm$ 0,63	P < 0,05

Дослідження, проведені нами в модельних експериментах із зняттям опорного навантаження із задніх кінцівок щурів і використанням електронної мікроскопії і цитохімічних маркерів остеогенного диференціювання показали, що в зонах ремоделювання і деструктивних перебудов кісткових структур відбувається зменшення кількості остеогенних клітин-попередників, що диференціюються, і зростання кількості фібробластів, тобто умови зняття опорного навантаження уповільнюють (або частково блокують) остеогенне диференціювання частини периваскулярних клітин і стимулюють диференціювання фібробластів, що призводить до появи зон фіброзу, ділянок, заповнених колагеновими фібрилами, що не мінералізуються. На кісткових поверхнях з'являються адипоцити. Таку реакцію

можна розглядати як один з механізмів уповільнення інтенсивності остеогенетичних процесів в кістках і зниження їх міцності. Це відмічено і в експерименті на Біон-М1: поблизу кровоносних судин в кортикальній кістці мишей з'являються характерні зони демінералізації і фіброзу.

У кістковій тканині метафізів і діафізів гомілкових кісток мишей (Біон-М1), а також в гомілкових кістках щурів (модельована невагомість) в популяції остеобластів в зонах остеогенезу зменшується кількість функціонально-активних форм (мають низьке ядерно-цитоплазматичне співвідношення), що продукують органічний кістковий матрикс, тобто остеобластів 2 і 3 типу, згідно запропонованої нами кваліфікації функціонального стану остеобластів [11]. У популяції остеобластів збільшується кількість апоптозних клітин, особливо це характерно для остеобластів кісткової тканини гомілкових кісток мишей (Біон-М1).

За даними електронної мікроскопії в ядрах функціонально-активних остеобластів посилюється гетерохроматинізація, матрикс мітохондрій стає електронно-щільним, цитоплазматична мембрана втрачає чіткість контурів, знижується питомий об'єм гранулярної ендоплазматичної сітки (ГЕС) і комплексу Гольджі, органел, які беруть участь в процесах біосинтезу органічних компонентів кісткового матриксу, колагенових білків і глікозаміногліканів. Специфічним для невагомості є стан ГЕС: вузькі короткі канали ГЕС без розширень розподіляються по всій цитоплазмі і не мають типової для остеобластів в контролі просторової організації. Слід вважати, що порушення типової архітектоніки органел є наслідком дезорганізації (або "розбирання") апарату мікротрубочок, а також деструктивних процесів в мембранах. В умовах модельованої невагомості ці явища виражені у меншій мірі.

Отримані нами дані свідчать, що зняття гравітаційного навантаження призводить до зниження остеогенетичних функцій остеобластів. Це підтверджено і в модельних експериментах на щурах з використанням 3Н-гліцину [19].

У зонах кісткових перебудов має місце трансформація остеобластів в клітини, що вистилають ендост (bone-line cells). Електронно-мікроскопічне дослідження популяції остеобластів в кістковій тканині мишей, що перебували в умовах невагомості («Біон-М1») дозволило виявити таку метаболічну функцію остеобластів

(характерну для остеоцитів), як участь в остеолітичних процесах при адаптивному ремоделюванні кісткової тканини.

При трансформації в клітини, що вистилають ендост, в остеобластах відбувається утилізація частини ГЕС шляхом аутофагоцитоза (у клітинах збільшується питомий об'єм аутофаголізосом), зростає так само питомий об'єм структур комплексу Гольджі, особливо везикулярного компонента – лізосом ( $0,156 \pm 0,006$ , дослід;  $0,124 \pm 0,005$ , контроль,  $P < 0,005$ ). Лізосоми, що містять остеолітичні ферменти, поступають на прилеглу кісткову поверхню, де здійснюють остеолізис мінералізованого кісткового матриксу (Рис. 13).

У популяції зрілих остеоцитів в діафізах гомілкової кістки мишей збільшується кількість апоптозних кліток і порожніх остеоцитарних лакун (Таблиця 1), на основі яких формуються кісткові порожнини і розвивається «порозність». Зростає площа остеоцитарних лакун, в яких знаходяться функціонуючі остеоцити, що свідчить про посилення їх остеолітичної функції – ферментативне розчинення оточуючого остеоцити мінералізованого матриксу. Така реакція остеоцитів підтверджена при аналізі їх ультраструктури – в клітинах достовірно зростає питомий об'єм структур комплексу Гольджі і лізосомних структур ( $0,140 \pm 0,007$ , дослід;  $0,119 \pm 0,005$ ,  $P < 0,05$ ). Посилення процесів остеолізісу в остеоцитах клубової кістки було відмічене нами в експерименті на мавпах на Біон-11 [20]. Остеолітичні процеси направлені на демінералізацію і деструкцію кісткової тканини і призводять до розвитку „порозності” в кістках.

### **1.3.2. Гістоструктурні перебудови в кістках скелету піддослідних тварин в умовах гіпокінезії і мікрогравітації**

Гістологічними дослідженнями встановлено, що в метафізах стегнових кісток щурів при довготривалій гіпокінезії (модельована мікрогравітація) має місце стоншення та зменшення кількості кісткових трабекул, їх часткове розсмоктування, виявлено зони резорбції та розширення міжтрабекулярних просторів в деяких зонах метафізу. Морфометричний аналіз показав зменшення питомого об'єму кісткових

трабекул та збільшення питомого об'єму порожнин, особливо в проксимальних метафізах.

При мікрогравітації в кістковій тканині гребня клубової кістки збільшується питома площа остеоцитарних лакун, достовірно зменшується кількість остеоцитів, що функціонують, збільшується кількість порожніх остеоцитарних лакун. В кістковій тканині виявлені зони розшарування та порожнини.

Отримані дані свідчать про зниження кісткової маси в досліджених кістках в умовах гіпокінезії і мікрогравітації.

В дефінітивному кістковому скелеті підтримка його структурно-функціонального гомеостазу, фізіологічні і адаптивні перебудови забезпечуються поєднанням двох різноспрямованих процесів: кісткової апозиції та кісткової резорбції, котрі урівноважуються відповідно до біомеханічних навантажень. Відомо, що найбільші зміни, зумовлені мікрогравітацією і гіпокінезією виявлені у тих ділянках скелету, що несуть найбільше вагове навантаження, а саме у хребті і кістках кінцівок [21, 22].

В нашому дослідженні головну увагу приділено вивченню змін гістоструктури стегнової кістки і морфо-функціональних властивостей її клітин в зонах проксимальних метафізів стегнової кістки щурів в досліді з гіпокінезією (28 дн.) порівняно з контролем. Губчаста кістка метафізів є метаболічно активною і першою реагує на зміни силових та опорних навантажень.

Гістологічні дослідження показали, що у тварин, що перебували в умовах гіпокінезії, порівняно з контрольною групою, в губчастій речовині метафізів відбуваються помітні перебудови. Структура метафізів стає більш крупно-ячеїстою, кісткові трабекули укорочуються, кількість їх зменшується, порушується їх типова архітектоніка. На трабекулах виявляються окремі обмежені зони резорбції, рарефекації і перфорації кісткових трабекул. Про це можна судити візуально, аналізуючи гістологічні препарати (Рис. 2).

Об'єктивно, це підтверджується морфометричними дослідженнями: показано зниження питомого об'єму, кісткових трабекул в метафізах дослідних тварин, що

дорівнюють (на умовній одиниці площі гістозрізу) в досліді  $0,217 \pm 0,014$  і в контролі –  $0,251 \pm 0,012$ .

Нами відмічено, що в кісткових трабекулах і діафізарній кістковій трубці (особливо в зонах метафіза і середині діафіза) у дослідних тварин виявляються порожнини і щілини, розшарування кісткових пластинок, своєрідні перфорації (Рис. 1.2.). Питомий об'єм таких порожнин вірогідно вище, ніж у контролі: так, в трабекулах метафіза він складає (на умовній одиниці площі зрізу) в досліді  $0,052 \pm 0,002$  і  $0,027 \pm 0,001$  у контролі; в діафізарній трубці зони метафізу відповідно:  $0,037 \pm 0,002$  і  $0,019 \pm 0,001$ .

Значної (вірогідної) різниці, порівняно з контролем, кількості остеобластів і остеокластів на кісткових поверхнях у метафізах не виявлено. В окремих ділянках кісткових трабекул дослідних тварин можна спостерігати більш обширні зони резорбції за участю остеокластів. Слід припустити, що це зони локального ремоделювання, зумовленого зняттям опорного навантаження (Рис.3).

Характерним також для кісткових структур метафізів є збільшення кількості порожніх остеоцитарних лакун:  $2,4 \pm 0,1\%$  в контролі і  $3,7 \pm 0,2\%$  в досліді. Зростає також об'єм окремих лакун, реєструються остецити, що руйнуються. Тобто, наявна реакція остеоцитів на зміну механічного навантаження (остеоцитарний остеолізис).

В нашому дослідженні відмічено тенденцію до деякого витончення компактною кістки в метафізарних і діафізарних зонах у дослідних тварин. Відбувається також локальна трансформація внутрішніх ділянок компактною речовини в губчасту речовину кістки (спонгізація компактною кістки).

Таким чином, наші гістологічні дослідження свідчать, що опорне розвантаження задніх кінцівок щурів, що знаходились в досліді, призводить до деякої втрати кісткової маси і посилення резорбтивних процесів в зв'язку з адаптивним ремоделюванням кісткових структур. Причиною втрати губчастою кістки може бути недостатнє відкладення кісткового матриксу в кожному циклі ремоделювання, що спричиняє поступове витончення трабекул. Цей процес супроводжується локальним посиленням остеоцитарної і остеокластичної резорбції (вздовж лінії зняття опорних силових навантажень) в кісткових структурах. Це

призводить до появи "порозності" і випадків рарефекації і перфорації трабекул і через це - до відсутності тут основи для остеопластичного процесу, а потім до їх часткової (або повної) резорбції. Внаслідок цього збільшується кількість трабекул, що закінчуються сліпо, які не інтегрують в загальну трабекулярну сітку губчастої кістки.

### **1.3.3. Зміни в гістоструктурі проксимальних метафізів стегнових кісток щурів при гіпокінезії.**

В нашому дослідженні головну увагу приділено вивченню змін гістоструктури стегнової кістки і морфо-функціональних властивостей її клітин в зонах проксимальних метафізів стегнової кістки щурів в досліді з гіпокінезією (28 дн.) порівняно з контролем. Губчаста кістка метафізів є метаболічно активною і першою реагує на зміни силових та опорних навантажень.

Гістологічні дослідження показали, що у тварин, що перебували в умовах гіпокінезії, порівняно з контрольною групою, в губчастій речовині метафізів відбуваються помітні перебудови. Структура метафізів стає більш крупно-ячеїстою, кісткові трабекули укорочуються, кількість їх зменшується, порушується їх типова архітектоніка. На трабекулах виявляються окремі обмежені зони резорбції, рарефекації і перфорації кісткових трабекул. Про це можна судити візуально, аналізуючи гістологічні препарати (Рис. 1).

Об'єктивно, це підтверджується морфометричними дослідженнями: показано зниження питомого об'єму, кісткових трабекул в метафізах дослідних тварин, що дорівнюють (на умовній одиниці площі гістозрізу) в досліді  $0,217 \pm 0,014$  і в контролі –  $0,251 \pm 0,012$ .

Нами відмічено, що в кісткових трабекулах і діафізарній кістковій трубці (особливо в зонах метафіза і середині діафіза) у дослідних тварин виявляються порожнини і щілини, розшарування кісткових пластинок, своєрідні перфорації (Рис. 16). Питомий об'єм таких порожнин вірогідно вище, ніж у контролі: так, в трабекулах метафіза він складає (на умовній одиниці площі зрізу) в досліді  $0,052 \pm$

0,002 і  $0,027 \pm 0,001$  у контролі; в діафізарній трубці зони метафізу відповідно:  $0,037 \pm 0,002$  і  $0,019 \pm 0,001$ .

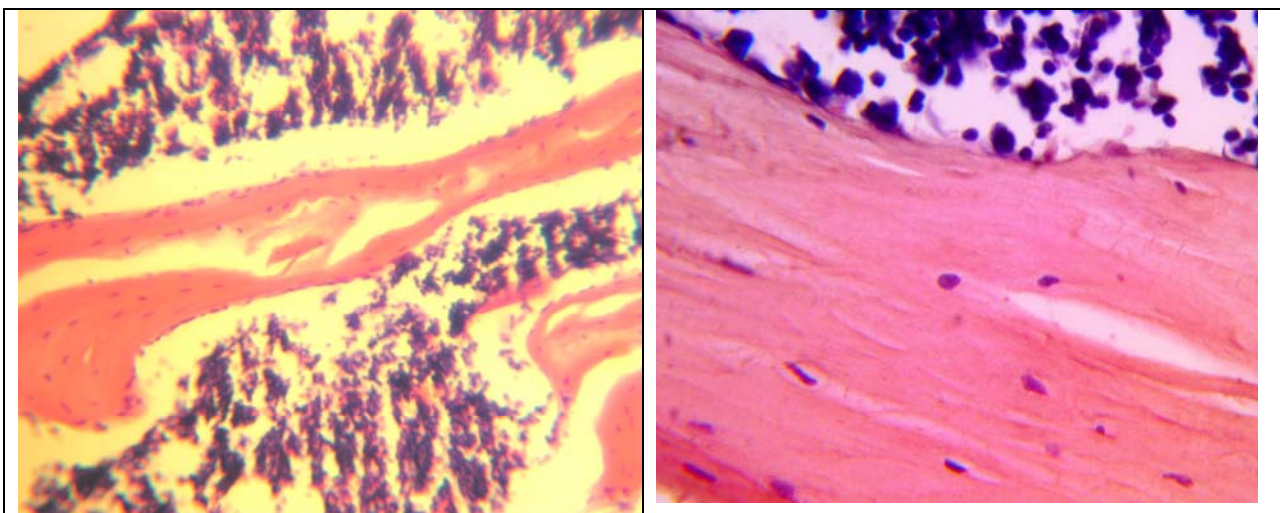


Рис. 1. Зміна архітектонії кісткових трабекул в стегнових кістках щурів. В трабекулах видно порожнини. Гіпокінезія. Гематоксилін-еозин. об.25, ок.12,5.  
Рис. 2. Плечова кістка миші. Зони резорбції на ендостальній поверхні. Гематоксилін-еозин-тіанін,  $\times 400$ .

Значної (вірогідної) різниці, порівняно з контролем, кількості остеобластів і остеокластів на кісткових поверхнях у метафізах не виявлено. В окремих ділянках кісткових трабекул дослідних тварин можна спостерігати більш обширні зони резорбції за участю остеокластів. Слід припустити, що це зони локального ремоделювання, зумовленого зняттям опорного навантаження (Рис.4).

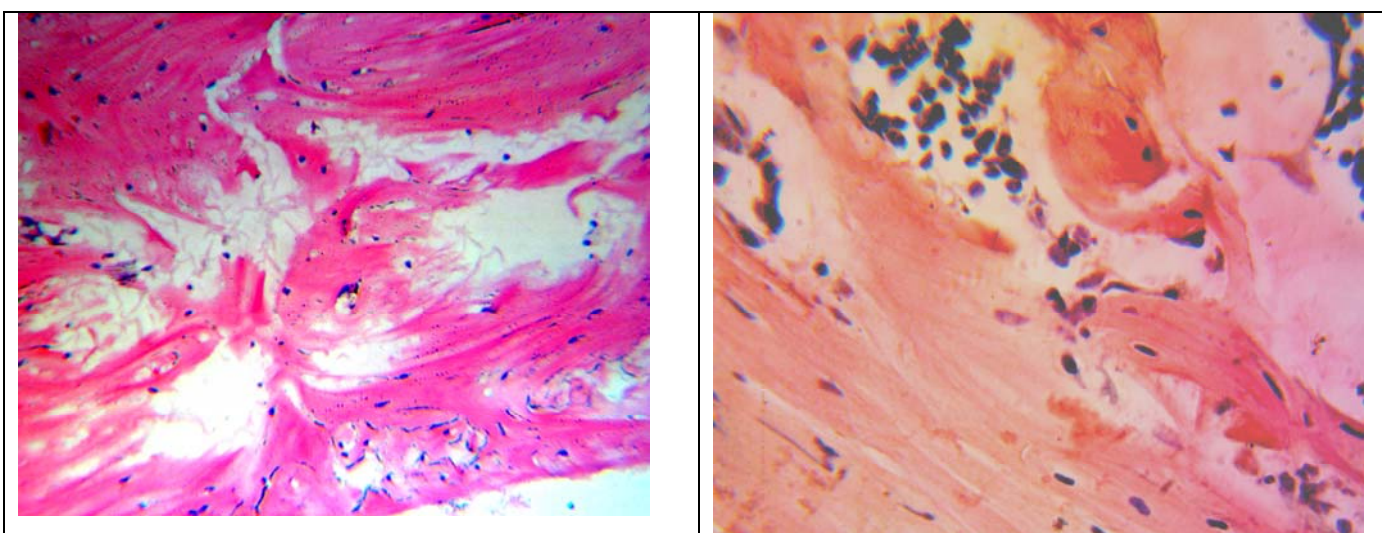


Рис. 3. Порожнини і розриви в діафізарній кістковій трубці. Гіпокінезія. Гематоксилін-еозин. об.25, ок.12,5.

Рис. 4. Плечова кістка миші. Виникнення лакун резорбції. Гематоксилін-еозин-тіанін,  $\times 200$ .



Характерним також для кісткових структур метафізів є збільшення кількості порожніх остеоцитарних лакун:  $2,4 \pm 0,1\%$  в контролі і  $3,7 \pm 0,2\%$  в досліді. Зростає також об'єм окремих лакун, реєструються остеоцити, що руйнуються (Рис. 6). Тобто, наявна реакція остеоцитів на зміну механічного навантаження (остеоцитарний остеолізис).

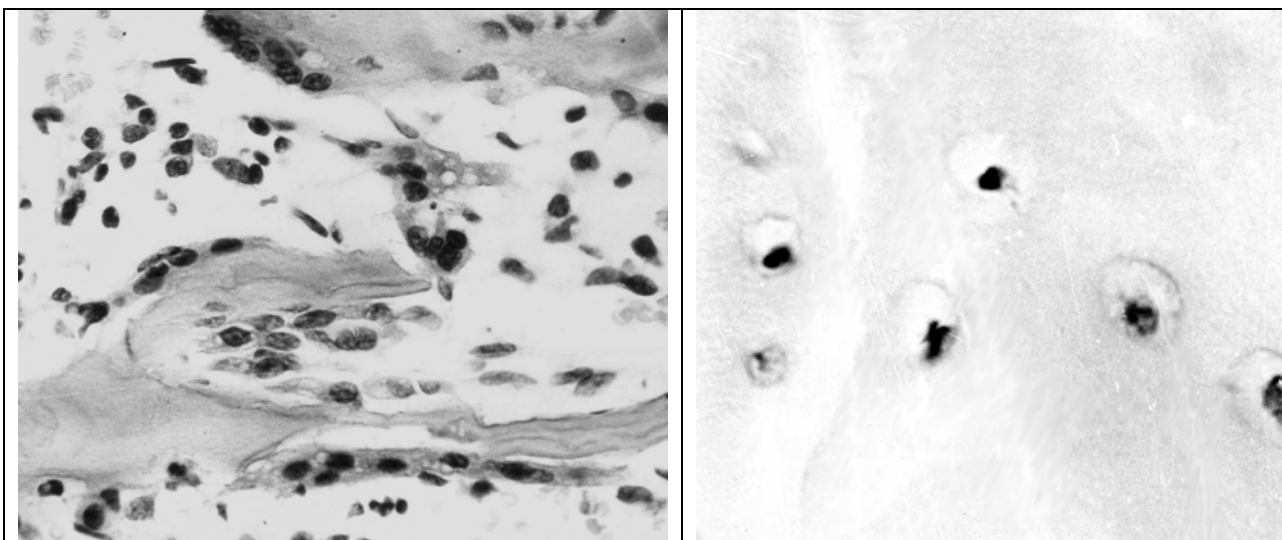
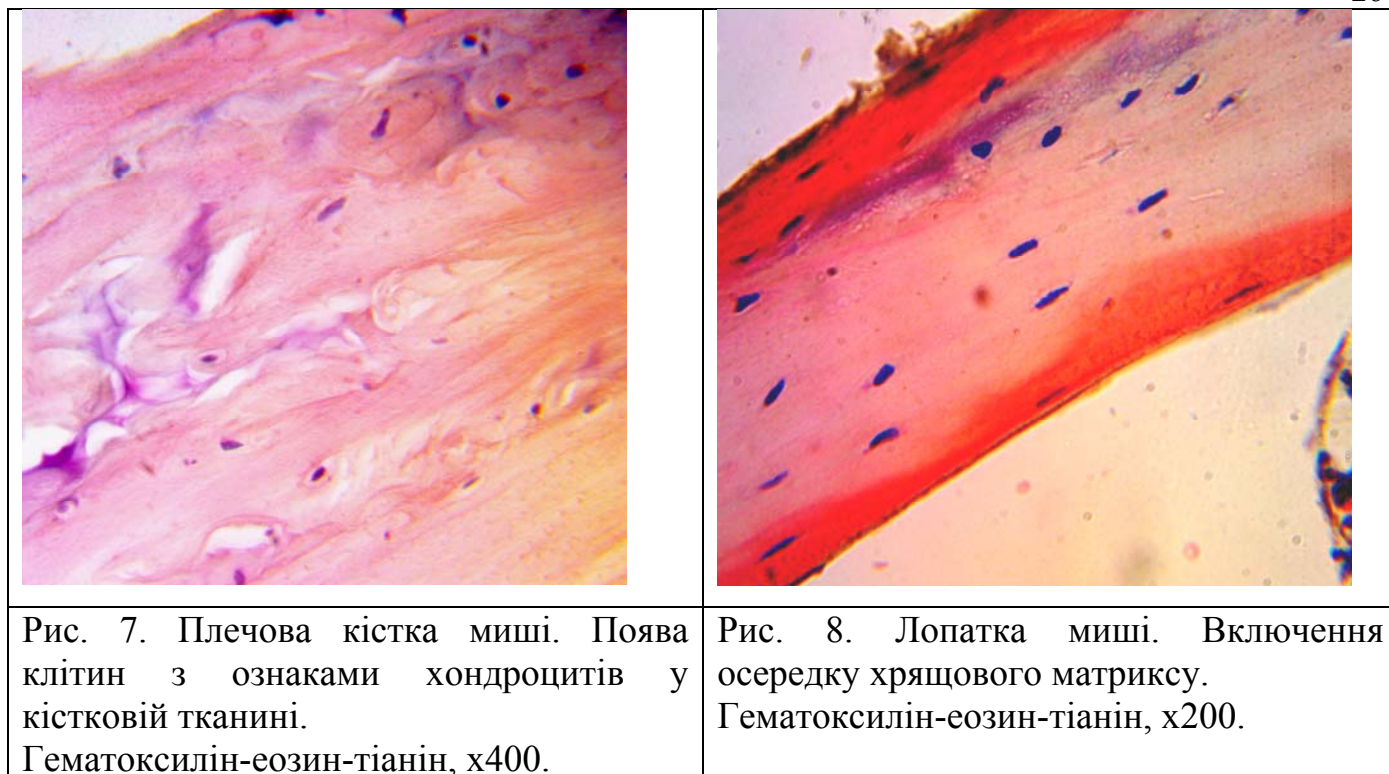


Рис. 5 Резорбція трабекул за участі остеокластів. Гіпокінезія. Гематоксилін-еозин. об.40, ок.12,5.

Рис. 6 Остеоцити. Видно збільшення остеоцитарних лакун. Гіпокінезія. Гематоксилін-еозин. об.60, ок.12,5.

В нашому дослідженні відмічено тенденцію до деякого витончення компактної кістки в метафізарних і діафізарних зонах у дослідних тварин. Відбувається також локальна трансформація внутрішніх ділянок компактної речовини в губчасту речовину кістки (спонгізація компактної кістки).

Дефіцит навантаження призводить до адаптивного диференціювання стромальних клітин в напрямку фібробластів і адипоцитів в локусах ремоделювання. Іноді серед пластинчатої кістки виявляються клітини з ознаками хондроцитів, які синтезують відповідний матрикс (рис. 7, 8). Ця послідовність клітинних взаємодій розглядається як основний механізм втрати кісткової тканини, який лежить в основі розвитку остеопенії і остеопорозу при дефіциті механічного навантаження.



Таким чином, наші гістологічні дослідження свідчать, що опорне розвантаження задніх кінцівок щурів, що знаходились в досліді, призводить до деякої втрати кісткової маси і посилення резорбтивних процесів в зв'язку з адаптивним ремоделюванням кісткових структур. Причиною втрати губчастої кістки може бути недостатнє відкладення кісткового матриксу в кожному циклі ремоделювання, що спричиняє поступове витончення трабекул. Цей процес супроводжується локальним посиленням остеоцитарної і остеокластичної резорбції (вздовж лінії зняття опорних силових навантажень) в кісткових структурах. Це призводить до появи "порозності" і випадків рарефекації і перфорації трабекул і через це - до відсутності тут основи для остеопластичного процесу, а потім до їх часткової (або повної) резорбції. Внаслідок цього збільшується кількість трабекул, що закінчуються сліпо, які не інтегрують в загальну трабекулярну сітку губчастої кістки.

Таким чином, в умовах гіпокінезії в губчастій кістці проксимальних метафізів і компактній речовині стегнових кісток щурів відбуваються процеси адаптивного ремоделювання в зв'язку з дефіцитом опорного навантаження на кінцівки. Значної (вірогідної) різниці, порівняно з контролем, кількості остеобластів і остеокластів на кісткових поверхнях у метафізах не виявлено. Втрата кісткової маси здійснюється перш за все за рахунок остеоцитарної і остеокластичної резорбції частини трабекул

в метафізах, розвитку "порозності" у трабекулах і кортикальній кістці (поява щілин і порожнин у кістковому матриксі).

#### **1.3.4. Особливості ультраструктури остеоцитів в зонах адаптивних і деструктивних перебудов у кістках піддослідних тварин в умовах мікрогравітації**

Встановлено, що в умовах експериментальної гіпокінезії і космічних польотів в кістках експериментальних тварин спостерігається зниження числа трабекул, збільшення їх питомого об'єму, відмічалось візуальне зростання порожнин і міжтрабекулярних просторів. Виявлені зміни в кістковій тканині є ознаками розвитку остеопенії, яка викликана розвантаженням задніх кінцівок. Результати обстеження стегнової кістки, в цілому, узгоджуються з існуючими даними [15, 22, 23], згідно з якими після тривалих космічних польотів відбувається зменшення мінералізації вагонавантажених кісток скелету. Подібні зміни в кістках при дефіциті опорних навантажень також відзначалися в наших гістологічних роботах.

Гістологічний аналіз гістопрепаратів показав, що в структурі остеоцитів кісткової тканини щурів при гіпокінезії виявляються 2 типи клітин - остеоцити з великим округлим ядром і відносно великою масою цитоплазми та клітини сплющеної форми з видовженим ядром і невеликим об'ємом цитоплазми в залежності від функціонального стану клітини. В деяких остеоцитах нами виявлено деструктивні зміни, що виражаються головним чином в появі пікнотичних ядер та деструкції цитоплазми. Остеоцитарні лакуни при цьому були значно розширені, досить часто зустрічалися поодинокі порожні лакуни. Морфометричний аналіз показав достовірне зменшення кількості остеоцитів в кістковій тканині у частини піддослідних тварин в порівнянні з контрольною групою.

Отримані попередні результати досліджень на мишах за проектом «Біон-М1». Однак обробка та аналіз біозразків ще не завершені, але на першому етапі отримані перші цікаві дані, які будуть корисні в галузі космічної біології і медицини. Вперше встановлені дані про вплив 30-добової невагомості на кісткову тканину і остеоцити

мишей, зокрема, вивчено структурні та функціональні особливості остеоцитів кісткової тканини.

Отримані попередні результати досліджень на мишах за проектом «Біон-М1». Однак обробка та аналіз біозразків ще не завершені, але на першому етапі отримані перші цікаві дані, які будуть корисні в галузі космічної біології та медицини. Вперше встановлені дані про вплив 30-добової невагомості на кісткову тканину і остеоцитів мишей, зокрема, вивчено структурні та функціональні особливості остеоцитів кісткової тканини.

Має місце порушення цілісності структури (мікроархітектоніки) кісткової тканини, спостерігаються мікротріщини і мікровідколи, в деяких зразках виявлені порожнини резорбції. Гістологічні дослідження показали, що в кістковій тканині остеоцитів розташовані в кісткових лакунах і мають різну форму, багато з них подовженої, овальної або неправильної форми. Ядра остеоцитів базофільні, хроматин щільний і на цьому тлі ядерця не визначаються. Досить часто зустрічаються остеоцити на стадії руйнування, ядра клітин піддаються каріопікнозу та каріолізісу. Спостерігаються остеоцитарні лакуни, площа яких значно збільшується. Подібні зміни в остеоцитах і лакунах можуть відображати початкові етапи адаптивного ремоделювання кісткової тканини при зниженні опорно-локомоторного навантаження на скелет і розглядаються як початкова стадія розвитку остеопоротичних перебудов в кістковій тканині.

Отримані результати про зміни в популяції остеоцитів в кістковій тканині мишей, що знаходилися в умовах космічного польоту становлять інтерес для розробки і оптимізації методів профілактики і лікування остеопенії та остеопорозу, які виникають у космонавтів, що перебувають на борту космічних станцій, де спостерігається невагомість.

Вивчення і дослідження клубової кістки мавп при дії умов космічного польоту показали, що зміни, які виникають в кістковій тканині й остеоцитах відрізняються специфічністю. Спостерігається картина, подібна «старінню кістки», що супроводжується стоншенням кісткової тканини. В умовах мікрогравітації знайдені зміни в остеоцитах виражені найбільше, і проявлялися переважно в розширенні

остеоцитарних лакун, зростанням кількості апоптичних клітин, які ми класифікуємо як порожні лакуни. Виявлені зміни в популяції остеоцитів вказують на те, що відбувається посилення процесів остеоцитарного остеолізу. Деяка частина остеоцитів зазнає ознак апоптозу.

Отримані оригінальні дані про зміни в архітектоніці остеоцитів в умовах гіпокінезії: реєструвалися ділянки кісткової тканини з порожніми остеоцитарними лакунами, які виникають в результаті загибелі остеоцитів. В контролі порожні лакуни зустрічаються значно рідше. Наші дані підтверджують результати, отримані нами в гістологічних та електронно-мікроскопічних дослідженнях раніше. Було зафіксовано наявність мікропереломів, мікросколів, мікротравм і тріщин, а також щілини, різні за довжиною і шириною. Це свідчить про деструктивні зміни в кістковій тканині, які виникають під впливом гіпокінезії.

Таким чином, після космічних польотів та експериментальної гіпокінезії в досліджуваних кістках у більшості обстежених тварин відбувається специфічна зміна мікроархітектури кісткової тканини й остеоцитів - знижується число трабекул, зростає питомий об'єм кісткової тканини, кількість остеоцитів зменшується, з'являються порожні остеоцитарні лакуни. Вищевикладені дані свідчать про необхідність вивчення особливостей функціонування остеоцитів і їх ролі в перебудові кісткових структур при зниженні опорно-локомоторних навантажень.

### **1.3.5. Концепція про механізми механотрансдукції і втрати кісткової маси при зниженні (знятті) гравітаційного навантаження**

Отримані результати вносять нове до розробленої нами концепції про механізми механотрансдукції і втрати кісткової маси при зниженні (знятті) гравітаційного навантаження [20]. У зонах перебудов кісткових структур має місце наступна послідовність клітинних взаємодій.

Початкова реакція чи активація. Початок перебудови є результатом керуючих дій, обумовлених зміною механічних навантажень на кістку, мікропошкодженнями кістки та іншими причинами, обумовленими взаємодією з іншими системами

організму та з середовищем. В певні моменти часу активується сукупність функціональних одиниць кістки в її необхідних ділянках. Поверхневі вистилаючі клітини (lining cells) активованої функціональної одиниці кістки змінюють свою форму, перетворюючись з плоских округлих клітин в кубічні. Процес може запускатися речовинами, які виконують також функцію активуючих керуючих сигналів: паратиреоїдним гормоном, інсуліноподібними факторами росту (соматомеди), інтерлейкіном – 1, інтерлейкіном – 6, простагландинами, кальцитрилоном (жиророзчинний вітамін D, [1.25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>]), та ін. Процес може блокуватися чи гальмуватися естрогенами, які виконують функцію гальмівного керуючого сигналу.

Стадія залучення остеокластів. Вистилаючі клітини, активовані сукупністю гормональних факторів, секретують ліганд рецептора активатора фактору транскрипції капа Б (RANKL). Цей цитокін приймає участь в керуванні диференціюванням та функціями клітин кісткової тканини, клітин лімфоїдної тканини та епітелію. В кістковій тканині RANKL приймає участь в розвитку остеокластів. З плюрипотентної стоволової клітини кісткового мозку спочатку утворюються попередники остеокластів. Вони мають мембранні рецептори, (рецептори активатора фактору транскрипції капа Б (RANK)). При активації цих рецепторів відповідними RANK-лігандами (RANKL) декілька попередників остеокластів зливаються та диференціюються в зрілі мультиядерні остеокласти.

На цій стадії процес може блокуватися чи гальмуватися остеопротегерином, який виконує функцію керуючого сигналу. Остеопротегерин є рецептором, який вільно переміщується, здатний зв'язувати RANK-ліганди і попереджувати їх активуючі взаємодії з RANK-рецепторами.

На стадії розсмоктування кістки, зрілі остеокласти починають активно резорбувати кістку. Функціональні одиниці кістки переміщуються, утворюються нові остеокласти і розсмоктування кістки прогресує. В кожній функціональній одиниці – області, яка оточена вистилаючими клітинами, резорбція триває близько двох тижнів. Потім остеокласти відповідно до генетичної програми руйнуються (апоптоз). На цій стадії процес активується наступними речовинами, які виконують

функцію керуючих сигналів: інтегринами, інтерлейкінами, вітаміном А. Процес може гальмуватися естрогенами, кальцитоніном, інтерфероном, морфогенетичними протеїнами кістки (BMPs).

Суттєвим та специфічним фактором для розвитку остеогенних клітин є фактор транскрипції Cbfa1 (зв'язуючий фактор ядра альфа-1). Існує і велика кількість інших факторів ендогенної природи, які стимулюють розвиток та функції остеобластів.

Залучення до процесу перебудови кістки остеобластів може стимулюватися рядом речовин, які відіграють роль керуючих сигналів. Серед них: трансформуючі бета-фактори росту, морфогенетичні протеїни кістки, соматомедини, інсуліноподібні фактори росту, фактори росту фібробластів, паратиреоїдний гормон, кальцитриол, та інші. Залучення до процесу перебудови кістки остеобластів може гальмуватися лептином.

Стадія утворення остеоїду. Функціонально активні остеобласти утворюють шари остеоїду та повільно наповнюють порожнину резорбції. Вони також секретують фактори росту, остеопонтин, остеокальцин та інші протеїни. Хімічними стимулюючими керуючими сигналами можуть бути: трансформуючі бета-фактори росту, морфогенетичні протеїни кістки, соматомедини та інші. Гальмуючими керуючими сигналами можуть бути фактори росту фібробластів, фактор росту, отриманий з кров'яних платівок, глюкокортикоїди.

Стадія мінералізації остеоїда та стадія визрівання мінералів. Коли остеоїд, що утворився, досягає діаметру  $6 \cdot 10^{-6}$  м, він починає мінералізуватися. Процес керується остеобластами. Швидкість процесу залежить від вмісту кальцію, фосфору, ряду мікроелементів. Процес гальмується пірофосфатом. Через декілька місяців після того, як порожнина резорбції поповнюється кістковою тканиною, кристали мінералу упаковуються більш компактно і щільність нової кістки збільшується. Швидкість процесу залежить від вмісту мінералів і, зокрема, мікроелементів.

Згодом настає стадія сталості рівноваги. Остеобласти перетворюються на вистилаючі клітини, деякі з остеобластів перетворюються на остецити. Остецити залишаються в кістці, утворюючи сітку за допомогою довгих клітинних відростків, які можуть сприймати механічні дії.

Протягом багатьох років вважали, що в дефінітивному скелеті процеси кісткової резорбції та формування кістки збалансовані: об'єм резорбованої кістки дорівнює об'єму новоствореної кістки, а зниження активності остеобластів призводить до подібної реакції остеокластів. Проте, є дані, що зниження кісткоутворення у трансгенних мишей супроводжувалося посиленням остеокластичної активності. Крім того, в уявленнях про механізми ремоделювання, не беруть до уваги популяцію остеоцитів, які без сумніву, також задіяні в цьому процесі.



## ВИСНОВКИ

Отримані нові дані про клітинні механізми гравітаційно-залежних змін у кісткових структурах і остеогенних клітинах (остеобластах) за умов тривалої мікрогравітації і зняття опорного навантаження на кістковий скелет.

Встановлено, що умови мікрогравітації («Біон-М1») впливають на структуру довгих кісток. В діафізах стегнових кісток у мишей, що перебували в польоті, у порівнянні з контрольними має місце порушення цілісності структури (мікроархітектоніки) кісткових трабекул у метафізах, у кортикальній кістці з'являються порожнини і щілини, питомий об'єм яких достовірно вищий, ніж у контролі. У кістковій тканині метафізів і в діафізах (поблизу судинних каналів) виявлені зони фіброза і демінералізації кісткового матриксу.

Порівняно з контролем, популяція остеобластів в періості й ендості стає більш однорідною, зменшується кількість функціонально активних остеобластів та збільшується кількість неактивних остеобластів, які вистилають кісткові поверхні. За даними електронної мікроскопії в ядрах остеобластів посилюється гетерохроматинізація, матрикс мітохондрій стає електронно-щільним, цитоплазматична мембрана втрачає чіткість обрисів, знижується питомий об'єм гранулярної ендоплазматичної сітки (ГЕС) та комплексу Гольджі, органел, що приймають участь у процесах біосинтезу компонентів кісткового матриксу. Специфічним для мікрогравітації є стан ГЕС: вузькі короткі канали ГЕС без розширень розподіляються по всій цитоплазмі і не мають типової для остеобластів в контролі просторової організації. В популяції остеобластів збільшується кількість апоптозних клітин. Отримані нами дані свідчать, що зняття опорного навантаження призводить до зниження в остеобластах інтенсивності біосинтезу органічних компонентів кісткового матриксу. Відбувається трансформація остеобластів у вистилаючі ендост клітини.

Описані вище перебудови є свідченням втрати кісткової маси, що призводить до розвитку „порозності” в трабекулах та подальших деструктивних змін в кісткових структурах.

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Canciani B, Ruggiu A, Giuliani A, Panetta D, Marozzi K, Tripodi M, Salvadori P.A, Cilli M, Ohira Y, Cancedda R, Tavella S. Effects of long time exposure to simulated micro- and hypergravity on skeletal architecture. // *J Mech Behav Biomed Mater.* - 2015 - 51- p.1-12.
2. Grimm D, Grosse J, Wehland M, Mann V, Reseland J.E, Sundaresan A, Corydon T.J. The impact of microgravity on bone in humans.// *Bone.* 2016 Jun;87:44-56.
3. Wittkowske C, Reilly G.C, Lacroix D, Perrault C.M. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation.// *Front Bioeng Biotechnol.*, 2016, - 15;4 – p. 87.
4. Smith S.M, Heer M, Shackelford L.C, Sibonga J.D, Spatz J, Pietrzyk R.A, Hudson E.K, Zwart S.R. Bone metabolism and renal stone risk during International Space Station missions.// *Bone.* 2015 Dec, 81: 712-20.
5. Xiao W, Li S, Pacios S, Wang Y, Graves DT. Bone Remodeling Under Pathological Conditions. // *Front Oral Biol.* 2016; 18:17-27.
6. Siamwala J.H, Rajendran S, Chatterjee S. Strategies of Manipulating BMP Signaling in Microgravity to Prevent Bone Loss.// *Vitam Horm.* – 2015 - 99 –p. 249-272.
7. Mao X, Chen Z, Luo Q, Zhang B, Song G. Simulated microgravity inhibits the migration of mesenchymal stem cells by remodeling actin cytoskeleton and increasing cell iffness. // *Cytotechnology*, 2016, 68(6): 2235-2243.
8. Iwaniec U.T, Turner R.T. Influence of body weight on bone mass, architecture and turnover.// *J Endocrinol.* – 2016 - 230(3) – p.115-130.
9. Родіонова Н.В. Динамика пролиферации и дифференцировки остеогенных клеток при снятии опорной нагрузки // *Цитология и генетика*, – 2011. – 45, №2. – С. 22–27.
10. Tonna E.A., Cronkite E.P. An autoradiography study of periosteal cells proliferation with triatited thymidine *Lab.Invest.*1962.v.11. №6. p.455-461.

11. Rodionova N.V. Functional morphology of the cells in osteogenesis. Kiev: "Naukova dumka". 1989. 192p. (in Russian).
12. Vashishth D, Verborgt O, Divine G, Schaffler MB, Fyhrie DP. Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age // *Bone*. - 2000 Apr. - 26 (4). - P. 375 – 380.
13. Doty S.B., Morey-Holton E.R., Durnova G.N., Kaplansky A.S. Morphological studies of bone and tendon. *J. Appl. Physiol.* 1992. № 73. p.10-13.
14. Rodionova N.V. The ultrastructure of DNA-synthesizing cells in enchondral place and of osteogenic cells-precursors. *Ontogenesis* 1984.v.15. № 3. p.252-257.
15. Vico L. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weightbearing bones of cosmonauts / L. Vico, P. Collet, A. Guignandon A. et al. // *The Lancet*. - 2000.- Vol. 355, № 9215.-P.1607-1611.
16. Morey-Holthson E., Wroński T.J. Animal model for simulating weightlessness // *The Physiologist*. – 1981. – 24, N 6. – P. 4.
17. Астахова В. С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека // АН Украины. Ин-т травматологии и ортопедии. – Киев. – 2000. – 174 с.
18. Janderova L., McNeil N., Murrell A.N., Mynatt R.L., Smith S.R. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis // *Obes. Res.*, 2003. – 11, № 1. – P. 65–73.
19. Rodionova N.V., Oganov V.S., Zolotova N.V. Changes in the osteocytes ultrastructure under the conditions of microgravity. 33<sup>rd</sup> COSPAR Scient. Ass. 2000.
20. Rodionova, N.V., Oganov V.S., Zolotova N.V. Ultrastructural changes in osteocytes in microgravity conditions // *J. Gravit Physiol.* – 2002. – 30 (4). – P. 765 – 770.
21. Grigoriev A.I., Oganov V.S., Bakulin A.V. et al. Clinical and physiological evaluation of bone changes among astronauts after long-term space flight. *Aviakosm. Ekolog. Med.* 1998. № 32. p.21-25.
22. Дурнова Г.Н., Капланский А.С., Корольков В.И., Кротов В.П. Гистоморфометрия подвздошных костей обезьян после антиортостатической

гипокинезии и «сухой» иммерсии//Авиакосм. и эколог. медицина. – 2004. – Т. 38. - 5 (33). – С. 42 – 45.

23.Оганов В. С. Костная система, невесомость и остеопороз // Москва: Слово, 2003. – 260 с.