

УДК: 611.71/.72:531.113:611.068

© Кутя С.А., 2012

СТРУКТУРНО-АРХИТЕКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГУБЧАТОГО ВЕЩЕСТВА КОСТЕЙ ПРИ ГРАВИТАЦИОННЫХ ПЕРЕГРУЗКАХ НА ФОНЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛИПОФЛАВОНА

Кутя С.А.

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.П. Георгиевского»

Кутя С.А. Структурно-архитектурные изменения губчатого вещества костей при гравитационных перегрузках на фоне использования липофлавона // Украинський морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С.59-61.

Исследовано влияние гравитационных перегрузок на строение губчатого вещества метадифизарной зоны великогомалых костей и позвонков (9г, 10 хв, ежедневно, 60-кратно) крыс молодого возраста. Установлено, что систематическое гипергравитационное действие вызывает потерю костного вещества, ухудшает микроархитектонику и приводит к разъединенности трабекулярной сетки. Применение липофлавоу предотвращает развитие формирования негативного костного баланса.

Ключевые слова: микроархитектоника, кость, гравитационные перегрузки, липофлавон

Кутя С.А. Структурно-архітектурні зміни губчастої речовини кісток при гравітаційних перевантаженнях на тлі використання ліпофлавоу // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 59-61.

Досліджено вплив гравітаційних перевантажень на будову губчастої речовини метадіфізарної зони великогомалових кісток та хребців (9г, 10 хв, щоденно, 60-кратно) щурів молодого віку. Встановлено, що систематична гіпергравітаційна дія викликає втрату кісткової речовини, погіршує мікроархітектоніку та призводить до роз'єднаності трабекулярної сітки. Застосування ліпофлавоу запобігає розвитку формування негативного кісткового балансу.

Ключові слова: мікроархітектоніка, кістка, гравітаційні перевантаження, ліпофлавон

Kutyu S.A. Structural and architectural changes in trabecular bone under hypergravity and lipoflavon use // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 59-61.

Influence of gravitational overloads on structure of cancellous bone of metadiaphyseal part of tibia and vertebrae (9g, 10 min, daily, 60 times) of young rats was investigated. It was revealed that systematic hypergravity causes bone loss, impairs microarchitectonics and disconnects trabecular network. Use of lipoflavon prevents formation of negative bone balance.

Key words: microarchitectonics, bone, hypergravity, lipoflavon.

Кость является твердым телом, для которого основными свойствами являются прочность и упругость [1]. Прочность кости – это способность противостоять внешней разрушающей силе. Упругость кости – это свойство приобретать исходную форму после прекращения воздействия факторов внешней среды. Оба эти свойства зависят от двух важных составляющих – количества костной массы и качества кости [4]. На последнее влияет состояние органического матрикса, наличие микроповреждений, скорость метаболизма, степень минерализации костной ткани и, не в последнюю очередь, ее архитектоника. Учитывая отсутствие данных об изменении губчатого вещества в условиях повышенной гравитации, была поставлена **цель** установление структурных и микроархитектонических особенностей губчатого вещества разных костей при гипергравитационном воздействии на организм крыс и при использовании липофлавона в качестве средства, повышающего устойчивость к действию гравитационных перегрузок.

Материал и методы. Экспериментальное исследование проведено на 24 крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 200-220 г. Животные были разделены на четыре серии. Серию П составили животные, ежедневно подвергавшиеся воздействию поперечных гравитационных перегрузок величиной 9g в виде следующих друг за другом трех “площадок” продолжительностью по 3 минуты каждая. Гипергравитацию моделировали путем вращения животных в периферических контейнерах на центрифуге Ц-2/500 (рабочий диапазон от 1 до 50 g, радиус плеча 50 см, градиент нарастания – 1,6 g/c, градиент спада – 0,6-0,8 g/c). Контролем (К-1) для этой серии служили животные, которых на период сеанса гипергравитации помещали в аналогичные контейнеры и размещали на платформе центрифуги. Животным

серии А за 30 минут до сеанса гипергравитации внутривенно вводили липофлавон в дозе 2,5 мг/кг (по кварцетину) массы крысы [5]. Контролем (К-2) для этой серии служили крысы, которым за 30 минут до помещения в контейнеры внутривенно вводили стерильный физиологический раствор в эквивалентных объемах.

По окончании сроков эксперимента (на 61-е сутки) животных декапитировали под эфирным наркозом и забирали для исследования большеберцовые кости и IV поясничные позвонки. После фиксации в 10% растворе нейтрального формалина, проводили их декальцинацию «Трилоном-Б», обезвоживание в спиртах и заливку в парафиновые блоки. Готовили гистологические срезы проксимального метадифизарного участка большеберцовых костей и тел позвонков толщиной 6-8 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Микроморфометрическое исследование проводили на компьютерном морфометрическом комплексе, включающем микроскоп Olympus CX-31, цифровой фотоаппарат Olympus C5050Z и персональный компьютер Intel (R) Celeron. Гистоморфометрию проводили при помощи лицензионной компьютерной программы Image J. Вначале определяли объем губчатого вещества (Sp-BV/TV), под которым понимали процентное содержание костной ткани, расположенной между двумя кортикальными слоями. Следующим шагом было определение параметров, характеризующих собственно микроархитектонику трабекулярной кости: толщина трабекул (Tb.Th., мкм), сепарация трабекул (Tb.Sp., мкм), количество трабекул (Tb.N., в пересчете на 1 мм²). Эти показатели отражают соответственно ширину трабекул, расстояние между ними и плотность их расположения. В последующем проводили node-strut анализ [7], заключающийся в подсчете количества соединений (N. Nd.) и оконча-

ний (N.Tm.) в 1 мм², расстояния между соединениями (Nd.Nd.), между окончаниями (Tm.Tm.) и от соединения до окончания (Nd.Tm.). Под соединениями понимали места разветвления трабекул, а под окончаниями – свободно расположенные концы трабекул в составе трабекулярной сети. В работе использованы аббревиатуры, предложенные American Society of Bone and Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee (комитета по гистоморфометрической номенклатуре Американского общества по исследованию костей и минералов) [8]. Для суммарной оценки степени сцепленности в губчатом веществе определяли звездчатый объем костномозговых полостей - V* [9].

Данные, полученные в результате исследования, обрабатывали с использованием методов вариационной статистики. Достоверной считали вероятность ошибки 5% (p<0,05).

Результаты исследования. Результаты гистоморфометрии губчатого вещества метадиафизарной зоны большеберцовых костей представлены в таблице 1. Обнаружили уменьшение, по отношению к контролю, доли костного вещества на 6,73 % (p<0,05). Это произошло за счет уменьшения как числа трабекул, так и их толщины, так как эти показатели были меньше контрольных на 5,51 % (p<0,05) и 8,23 % (p<0,05) соответственно. Описанные изменения сочетались с увеличением расстояния между трабекулами (отклонение от контроля составило 8,25

% (p<0,05)). Проведенный node-strut анализ выявил уменьшение, по отношению к результатам в контрольной серии, количества соединений и увеличение числа свободных окончаний трабекул на 8,09 % (p<0,05) и 10,22 % (p>0,05) соответственно. Наряду с этим, отмечали увеличение расстояния между соединениями трабекул и уменьшение расстояния между свободными окончаниями трабекул. Отклонение значений этих показателей от контрольных составило 4,45 % (p<0,05) и 5,50 % (p>0,05) соответственно. При оценивании степени сцепленности элементов трабекулярной сети обнаружили увеличение, в сравнении с данными контроля, показателя звездчатого объема костномозговых полостей на 10,88 % (p<0,05).

У животных серии Л, в целом, выявили менее выраженные, чем в серии П, изменения. Так, показатели объема костного вещества, расстояния между соединениями, а также между соединениями и окончаниями, соответствовали контрольным значениям (табл. 1). Показатели количества трабекул, их толщины, количества соединений, расстояния между окончаниями были недостоверно меньше контрольных значений на 2,27%, 6,23%, 3,78% и 4,44% соответственно (табл. 1). В то время как показатели сепарации трабекул, количества окончаний и звездчатого объема костномозговых полостей превосходили данные в контрольной серии на 6,31% (p>0,05), 3,61% (p<0,05) и 5,18% (p>0,05) соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Данные гистоморфометрии срезов большеберцовых костей

Показатель \ Серия	К-1	К-2	П	Л
Cn-BV/TV, %	42,29±0,69	43,14±0,43	39,44±0,54#	42,641±0,22
Tb.N, ед/мм ²	14,44±0,25	14,54±0,09	13,65±0,22#	14,21±0,30
Tb.Th, мкм	52,37±0,21	53,52±1,92	48,06±0,57#	50,18±1,99
Tb.Sp, мкм	139,95±2,09	137,18±2,05	151,50±2,57#	145,83±1,88#
N.Nd, ед/мм ²	5,23±0,07	5,33±0,12	4,81±0,21	5,13±0,07
N.Tm, ед/мм ²	5,12±0,17	5,12±0,04	5,64±0,20	5,31±0,06#
Nd.Nd, мкм	298,29±5,58	296,99±2,20	311,58±2,03#	299,14±7,03
Nd.Tm, мкм	290,97±4,89	297,77±13,40	295,03±8,81	298,15±8,15
Tm.Tm, мкм	393,60±13,27	392,73±13,26	371,95±2,29	375,29±2,50
V*, мм ³	58,81±0,92	58,90±0,56	65,21±0,96#	61,95±1,37

Примечание. # (здесь и далее) - p<0,05 относительно контроля.

Результаты гистоморфометрии губчатого вещества тел позвонков представлены в таблице 2. Установленное у животных серии П уменьшение по сравнению с контролем объема костной массы на 15,28 % (p<0,05) происходило за счет как уменьшения количества трабекул на 7,37 % (p>0,05), так и их истончения на 8,36 % (p<0,05). Эти изменения привели к закономерному увеличению межтрабекулярных расстояний на 10,21 % (p<0,05). При подсчете числа соединений трабекул, их свободных окончаний и расстояний между ними обнаружили уменьшение количества соединений с закономерным увеличением расстояния между ними. Значения этих показателей у крыс серии П отличались от контрольных на 6,48 % (p>0,05) и 7,72 % (p>0,05) соответственно. Увеличение числа окончаний сочеталось с уменьшением расстояния между ними. Отклонение величин этих показателей от данных у контрольных животных составило 8,63 % (p>0,05) и 8,98 % (p<0,05) соответственно. Расстояние от центра соединения до окончания трабекул увеличилось на 2,56 % (p>0,05) в сравнении со значением этого показателя у контрольных животных. При определе-

нии звездчатого объема костномозговых полостей выявили значительное увеличение (на 15,74 % (p<0,05)) значения этого показателя по отношению к контролю.

Наблюдавшееся снижение объема костной ткани в структуре губчатого вещества позвонков у животных серии П, сопровождалось уменьшением этого показателя и в серии Л. При этом, отклонение от контроля составило 5,60% (p<0,05). Однако, это отличие было менее выраженным, чем отклонение в серии животных с моделированием гравитационных перегрузок без использования противоперегрузочной защиты на 9,68%. Показатель толщины трабекул снизился на 5,41% (p>0,05). Наряду с этим, обнаружили увеличение, в сравнении с данными в контрольной серии, межтрабекулярных расстояний на 4,85% (p>0,05). При оценке показателей звездчатого объема и расстояния между окончаниями трабекул, достоверно изменявшихся у крыс серии П, у животных серии Л выявили отличия той же направленности, но меньшей выраженности. Так, показатель расстояния между свободными окончаниями трабекул снизился, относительно контроля, на 4,31% (p<0,05).

Звездчатый объем костномозговых полостей был увеличенным, в сравнении с контролем, на 8,65% ($p < 0,05$). Наряду с этим, наблюдали уменьшение

количества трабекул на 8,19 % ($p < 0,05$) относительно контроля (табл. 2).

Таблица 2. Данные гистоморфометрии срезов позвонков

Показатель	Серия	К-1	К-2	П	Л
$S_{BV}/TV, \%$		39,85±0,93	40,01±0,68	33,76±0,39#	37,77±0,22#
$Tb.N, \text{eд}/\text{мм}^2$		14,14±0,42	14,38±0,48	13,10±0,31	130,20±0,20#
$Tb.Th, \text{мкм}$		56,41±0,54	56,54±0,50	51,69±0,87#	53,48±1,43
$Tb.Sp, \text{мкм}$		166,32±1,16	166,30±0,84	183,31±3,19#	174,37±3,87
$N.Nd, \text{eд}/\text{мм}^2$		9,05±0,29	8,96±0,44	8,46±0,26	8,77±0,07
$N.Tm, \text{eд}/\text{мм}^2$		3,63±0,15	3,61±0,10	3,94±0,19	3,73±0,06
$Nd.Nd, \text{мкм}$		279,61±11,62	287,24±3,54	301,19±4,36	298,37±4,94
$Nd.Tm, \text{мкм}$		295,41±9,85	294,49±8,76	302,97±12,29	308,63±2,36
$Tm.Tm, \text{мкм}$		454,41±15,64	456,61±13,30	413,63±9,12#	436,93±9,79
$V^*, \text{мм}^3$		47,16±1,21	46,99±1,68	54,59±0,98#	51,05±0,67#

Заключение. Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что многократно повторяющееся гипергравитационное воздействие на организм крыс молодого возраста является причиной потери костной массы в структуре метадиафизарной зоны большеберцовых костей и, в большей степени, позвонков. Это происходит за счет исчезновения и истончения трабекул. Микроархитектура губчатого вещества этих точек скелета характеризуется наличием меньшего числа соединений трабекул, увеличение количества их свободных окончаний, а изменения показателя звездчатого объема указывают на повышение степени разобщенности элементов трабекулярной сети. Предварительное же введение крысам липофлавона предотвращает утрату костного вещества и сохраняет его микроархитектонику.

Многообразие свойств липофлавона, обладающего мощным антиоксидантным, антигипоксантным и мембраностабилизирующим действием, обеспечивает его способность повышать неспецифическую резистентность организма к действию стрессорных факторов [6]. Немаловажным свойством препарата, учитывая наличие повреждающего эффекта гравитационных перегрузок на сосудистую стенку, является его ангиопротекторный эффект. Он основан на способности кверцетина, являющийся его действующим началом липофлавона, модулировать функции эндотелия благодаря комплексному воздействию на различные рецепторные системы, ферменты и белки, а также антиоксидантным свойствам. Входящие также в его состав фосфатидилхолиновые липосомы способны восстанавливать эндотелийзависимые реакции сосудов благодаря антиоксидантным свойствам [2]. Положительный эффект липофлавона в отношении костной ткани объясняется, скорее всего, тем, что кверцетин обладает антирезорбтивными свойствами, которые выражаются в способности ингибировать дифференцировку предшественников остеокластов, унестать активность и индуцировать апоптоз зрелых остеокластов [10, 11]. Кроме того, он стимулирует дифференцировку остеобластов и активирует щелочную фосфатазу [12]. Немаловажную роль в остеопротекторном действии препарата играет и его выраженное антиперекисное действие (за счет активации каталазы) именно в костной ткани [3].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дубровский В.И. Биомеханика / В.И. Дубровский, В.Н. Федорова. – М.: Изд-во ВЛАДОС-ПРЕСС, 2004. – 672 с.

2. Кислова О.В. Фармакологічна корекція препаратом «Ліпофлавіон» судинної дисфункції, що викликана впливом іонізуючого опромінення / О.В. Кислова, І.В. Іванова, А.І. Соловійов // Медична хімія. – 2009. – Т.11, №1. – С. 40 – 44.

3. Макаренко О.А. Антиоксидантні механізми дії флавоноїдів у кістковій тканині / О.А. Макаренко // Одеський медичний журнал. – 2010. - №5. – С. 17 – 20.

4. Некачалов В.В. Патология костей и суставов / В.В. Некачалов. – СПб: СОГИС, – 2000. – 288 с.

5. Пат. 37164 Україна, МПК А 61В 5/145. Спосіб корекції несприятливої дії гравітаційних перевантажень препаратом „Ліпофлавіон” в експерименті / Пикалюк В.С., Мороз Г.О., Кутя С.А., Коняєва О.І., винахідники і власники В.С. Пикалюк, Г.О. Мороз, С.А.Кутя, О.І. Коняєва. – № 200804002; заявл. 31.03.2008, опубл. 25.11.2008, Бюл. № 22, 2008.

6. Харченко В.В. Основні механізми дії ліпосомального кверцетину в лікуванні хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки в поєднанні із гіпертонічною хворобою / В.В. Харченко // Фітотерапія. Часопис. – 2009. – №2. – С. 14 – 17.

7. Garrahan N.J. A new method for the two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies / N.J. Garrahan, R.W. Mellish, J.E. Compston // J. Microsc. – 1986. – Vol. 142 (Pt3). – P. 341 – 349.

8. Parfitt A.M. Bone Histomorphometry: Standartization of Nomenclature, Symbols, and Units / A.M. Parfitt, M.K. Dreznier, F.H. Glorieux [et al.] // J. Bone Min. Res. – 1987. – Vol. 2, №6. – P. 595 – 610.

9. Vesterby A. Star volume in bone research. A histomorphometric analysis of trabecular bone structure using vertical sections / A. Vesterby // Anat. Rec. – 1993. – Vol. 235, №2. – P. 325 – 334.

10. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption / A. Wattel, S. Kamel, R. Mentaverri [et al.] // Pharmacology. – 2003. – Vol. 65. – P. 35 – 42.

11. Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and activation of osteoclasts / J.-T. Woo, H. Nakagawa, M. Noyota [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2004. – Vol. 27, №4. – P. 504 – 509.

12. Wong R.W.K. Effect of quercetin on bone formation / R.W.K. Wong, A.B.M. Rabie // J. Orthop. Res. – 2008. – Vol. 26, №8. – P. 1061 – 1066.

Надійшла: 10.09.2012 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін