

УДК: 611-018:616:718.5-092.6."46"
© Глущенко Р.Н., 2012

ВЛИЯНИЕ НАНЕСЕНИЯ МЕТАДИАФИЗАРНОГО ДЕФЕКТА В БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ НА СТРОЕНИЕ ЕЕ ПРОКСИМАЛЬНОГО ЭПИФИЗАРНОГО ХРЯЩА У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Глущенко Р. Н.

ГЗ "Луганский государственный медицинский университет"

Глущенко Р. Н. Влияние нанесения метадиафизарного дефекта в большеберцовой кости на строение ее проксимального эпифизарного хряща у крыс разного возраста // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 148-151.

Нанесение дырчатого дефекта в метадиафизарной области большеберцовой кости крыс достоверно влияло на гистологическое строение ее проксимального эпифизарного хряща и середины диафиза. Кверцетин сглаживал выявленные отклонения. Выраженность выявленных отклонений зависит от возраста подопытных животных

Ключевые слова: большеберцовая кость, гистологическое строение, кверцетин, дефект.

Глущенко Р.М. Вплив нанесення метадіафізного дефекту у великогомілкової кістці на будову її проксимального епіфізного хрящу у щурів різного віку // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 148-151.

Нанесення дірчастого дефекту у метадіафізарній ділянці великогомілкової кістки щурів вірогідно впливало на гістологічну будову її проксимального епіфізного хрящу та середини діафізу. Кверцетин згладжував виявлені відхилення. Визначеність зареєстрованих відхилень залежить від віку піддослідних тварин.

Ключові слова: великогомілкова кістка, гістологічна будова, кверцетин, дефект.

Glushenko R. N. Tibial bone biomineral ultrastructure in white rats at different stages of postnatal development after metadiaphyseal defect // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 148-151.

Piercing defect on the metadyaphisal area of the tibial shaft in rats influence on a histological structure of its proximal epiphyseal cartilage and a middle of diaphysis. Quercetine corrects this condition. The duration and extent of the changes depended on the age of the animals.

Key words: tibia, histological structure, quercetine, defect.

Установлено, что при нанесении сквозного дырчатого дефекта в метадиафизарной области длинных трубчатых костей наряду с интенсивными процессами формирования регенерата изменяются темпы роста, минеральная насыщенность и прочность всех остальных костей скелета [2, 4, 5, 12, 14, 15]. Также, доказана эффективность применения биофлавоноида кверцетина как для оптимизации процессов репаративной регенерации, так и для сглаживания системных реакций скелета в этих условиях [7, 8]. Однако, сведений о том, как изменяется гистологическое строение эпифизарных хрящей поврежденных костей в этих условиях у животных различного возраста нет.

Цель данной работы: исследовать методом однофакторного дисперсионного анализа силу влияния нанесения сквозного дырчатого дефекта большеберцовых костей при сохранении функциональной нагрузки на гистологическое строение их проксимальных эпифизарных хрящей и середины диафизов.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Статья является фрагментом межкафедральной научно-исследовательской работы Луганского государственного медицинского университета "Особенности роста, строения и регенерации трубчатых костей при пластике костных дефектов материалами на основе гидроксилатапата" (государственный регистрационный номер - 0103U006651).

Материал и методы исследования. Представленное исследование было проведено на 252 белых беспородных крысах-самцах трех экспериментальных серий. В первой серии было изучено влияние нанесения сквозного дырчатого дефекта в проксимальных отделах большеберцовых костей на строение ББК неполовозрелых (Д1), половозрелых крыс (Д2) и крыс старческого возраста (Д3). Для создания дефекта крысам под эфирным наркозом стандартным стоматологическим бором диаметром 2,2 мм наносили сквозной дефект на границе проксимального метафиза и диафиза большеберцовых костей. Манипуляция не сопровождалась нарушением целостности костного органа и создавались условия для сохранения функциональной нагрузки на нижнюю конечность [9]. Во второй серии эксперимента было изучено влияние биофлавоноида кверцетина на скорость восстановления ББК после нанесенного дефекта (соответственно, три возрастные группы: ДК1, ДК2, ДК3) [10]. В группах ДК животные после нанесения дырчатого дефекта на диафиз ББК получали кверцетин ежедневно внутривенно через зонд в дозировке, аналогичной 3 г для человека. Третью серию составили интактные животные тех же возрастных групп (в качестве контроля): К1, К2 и К3. Сроки наблюдения составили 7, 15, 30 и 90 дней после нанесения дефекта. По истечении сроков эксперимента животных декапитировали под эфирным наркозом.

Все манипуляции на животных выполняли в

соответствии с правилами Европейской конвенции защиты позвоночных животных, использующихся в экспериментальных и других научных целях [13].

По окончании эксперимента животных декапитировали под эфирным наркозом, выделяли большеберцовые кости, отделяли проксимальные эпифизы, фиксировали их в 10% растворе нейтрального формалина, декальцинировали, обезвоживали и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 10-12 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали при помощи окулярного винтового микрометра МОВ-1-15^х ГОСТ 7865-56 по общепринятой методике [1]. При морфометрии проксимального эпифизарного хряща ББК использовалась морфофункциональная классификация В.Г. Ковешникова (1980) [3]. Программа морфометрии включала в себя измерение общей ширины проксимального эпифизарного хряща ББК, а также ширины зон индифферентного хряща, пролиферирующего хряща, дефинитивного хряща, деструкции и остеогенеза. Помимо этого с использованием 100-точечной сетки Г.Г. Автандилова [1] рассчитывали объемное содержание межклеточного вещества в эпифизарном хряще, а также объемное содержание первичной спонгиозы и удельное количество клеток на поверхности трабекул в зоне остеогенеза. Калибровку измерительных приборов производили с помощью миллиметрового отрезка ГОСТ 2 07513-55 2.

Все полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики и однофакторного дисперсионного анализа с использованием стандартных прикладных программ [6, 11].

Результаты и обсуждение. Количественное выражение влияния нанесенного дырчатого диафизарного дефекта и степень возможной коррекции кверцетином на морфогенез ББК позволяет оценить однофакторный дисперсионный анализ. Данный анализ был применен пошагово: на первом этапе проанализировали влияние дефекта (как действующего фактора) на гистологическое состояние ЭХ контрольных животных (пары сравниваемых групп – К/Д, где К- контроль, Д-группы с дырчатым дефектом ББК), а затем оценивали силу влияния препарата кверцетина на ЭХ ББК с уже присутствующим дефектом (пары сравниваемых групп – Д/ДК. Где Д - группы с дырчатым дефектом ББК, ДК - группы с дырчатым дефектом ББК с коррекцией кверцетином).

Оценивая степень влияния фактора нанесения дефекта в группе Д1, оказалось, что нанесение сквозного механического дефекта на диафиз оказывало достоверное и прогрессирующее влияние на общую ширину эпифизарного хряща в период с 7 по 30 дни, а сила влияния фактора составила соответственно: 43,83%, 46,23% и 69,10%. На ранних сроках наибольшее влияние нанесение дефекта оказало на зоны первичного остеогенеза и пролиферации (сила влияния

фактора нанесения дефекта на ширину этих зоны составила соответственно 40,00% и 35,42% уже к 7 дню. С 15 по 30 дни фактор нанесения дефекта оказал достоверное влияние на количество клеточного компонента и межклеточного вещества в хряще (сила влияния составила 47,40% на 15 день и ослабевала к 30 дню, снижаясь до 40,40%).

Максимальная сила влияния фактора у неполовозрелых крыс приходилась на 30 день эксперимента, когда все зоны эпифизарного хряща подверглись влиянию дефекта с наибольшей силой влияния фактора на количество клеточного компонента и межклеточного вещества в хряще, а также на зоны пролиферации (39,90%) и первичного остеогенеза (37,44%). Наименьшее влияние нанесенный дефект на 30 день оказывал на зоны деструкции и индифферентного хряща. К 90 дню сила влияния фактора нанесения дефекта на эпифизарный хрящ утрачивала статистическую значимость, не превышая 2,00%.

У животных группы Д2 нанесение дырчатого дефекта оказывало достоверное влияние преимущественно на зоны пролиферации и первичного остеогенеза в течение первого месяца эксперимента (сила влияния фактора нарастала, составляя 33,90%, 35,71%, 48,70% для зоны пролиферации и 37,62%, 47,62% и 57,00% - для зоны первичного остеогенеза, соответственно на 7, 15 и 30 дни). В результате и общая ширина хряща оказывалась под сильным влиянием фактора нанесения дефекта, составившее 49,50%, 49,30% и 68,40%, с 7 по 30 дни. Пик влияния условий эксперимента на состояние эпифизарного хряща пришелся на 30 сутки, когда, как и в предыдущей группе, под влияние фактора нанесенного дефекта попадали практически все зоны хряща. К этому сроку влияние нанесения дефекта проявилось на ширине зон индифферентного хряща с силой влияния 38,8%, дефинитивного хряща и деструкции (26,61% и 32,34%). Анализ объемного содержания основных компонентов эпифизарных хрящей большеберцовых костей выявил минимальное на данном сроке влияние нанесение дефекта на объемное содержание первичной спонгиозы в зоне остеогенеза: на 30 день сила влияния фактора составила в этом случае 25,00%, что по величине на 5,00-10,00% несколько меньше, чем для других показателей. К 90 дню в группе Д2, как и в предыдущей группе, фактор нанесения дефекта не представлял статистической важности для строения.

Условия эксперимента достоверно влияли на общую ширину эпифизарного хряща группы Д3 в период с 15 по 90 дни. Сила влияния фактора при этом составила соответственно 46,80%, 46,20% и 59,50%. Достоверное влияние нанесения дефекта на ширину зоны пролиферации было выявлено с 15 по 30 дни, а на зону первичного остеогенеза – в течение первого месяца эксперимента. Сила влияния фактора составила

для ширины зоны пролиферирующих хондроцитов соответственно 32,00% -31,40%, а для ширины зоны первичного остеогенеза – 30,40%, 38,70% и 30,20%. С 15 по 90 дни фактор нанесения дефекта стабильно оказывал влияние, также, на долю клеточного компонента ЭХ с силой влияния 32,80%, 40,40% и 33,70%.

Как и в случае двух предыдущих групп, максимальное влияние условий эксперимента на строение ЭХ разворачивалось к 30 дню. На этом сроке, с наибольшей силой, факт нанесения дефекта повлиял на долю клеточного компонента и межклеточного вещества хряща (сила влияния достигла 46,10%). Следующими по реактивности на нанесение дефекта на 30 день стали объемная доля клеток в хряще (40,4%) и зона деструкции (32,90%). На долю первичной спонгиозы условия эксперимента, как и в группе Д2, оказывали минимальное влияние, т.к. сила влияния фактора достигала лишь значения 25,80% и наблюдалась только на 30 день.

К 90 дню условия эксперимента оказывали прогрессирующей силы влияние на общую ширину хряща, зоны деструкции и первичного остеогенеза, а также под влияние фактора попадала и зона дефинитивного хряща (сила влияния составила 35,0%). На остальные зоны фактор нанесения дефекта к 90 дню не оказывал статистически значимого влияния. Что касается зоны индифферентных хондроцитов, то условия эксперимента достоверно не влияли на ее ширину ни в группе Д1, ни в группе Д3.

На структуры диафизарной стенки, в группе Д1 условия эксперимента оказывали значительно менее выраженное влияние, которое распространялось с 7 по 15 дни на диаметр каналов остеонов и площадь костномозговой полости (сила влияния дефекта как действующего фактора составила 23,50 % и 26,50% для первого параметра, и 39,70% и 34,50% - для второго). К 15 дню наличие дефекта повлияло также на диаметр остеонов с силой влияния фактора, равной 32,8%. В дальнейшем условия эксперимента не оказывали статистически значимого воздействия на указанные структуры диафизарной стенки.

В отношении влияния условия эксперимента на структуры диафиза в группе Д2, наиболее восприимчивым к присутствию дефекта показателем стал диаметр каналов остеонов. Сила влияния фактора для этого показателя имела наибольшую протяженность воздействия (с 7 по 90 день) и составляла 41,80%, 30,60%, 46,10% и 36,50%, соответственно установленным срокам эксперимента. Наиболее кратковременное влияние оказывало наличие дефекта на площадь костномозговой полости: сила влияния фактора проявилась только на 7 сутки, составив 24,10%, а наименьшее по величине влияние условий эксперимента проявилось по отношению к диаметру остеонов, на который фактор наличия дефекта оказывал влияние на 7 и 30 дни, не превышая 24,00%.

У крыс группы Д3 условия эксперимента оказывали самое продолжительное и распространенное влияние на структуры диафиза. С 7 суток фактор наличия дефекта воздействовал на диаметр каналов остеонов с силой влияния 41,90%, к 15 дню и до конца наблюдения под влияние условий эксперимента попадали размеры диаметра остеонов и их каналов, для которых сила влияния составила 29,00%, 33,20% и 26,30% и 46,40%, 35,20% и 27,00%, соответственно. Диаметр костномозговой полости попадал под достоверное влияние фактора только на 15 сутки. Сила влияния условий эксперимента на данный параметр составила 23,70% и была минимальной для данной экспериментальной группы.

Для группы ДК1 эффект препарата кверцетина оказал достоверно значимое влияние прежде всего на долю клеточного компонента в эпифизарном хряще. Сила влияния препарата как действующего фактора с 7 по 30 дни нарастала и составила 29,6%-40,2%. К 15 дню внутрижелудочное введение кверцетина неполовозрелым животным на фоне нанесенных дефектов на большеберцовые кости оказывало достоверное влияние на общую ширину проксимального эпифизарного хряща и долю межклеточного вещества в зоне первичного остеогенеза. (таб. В.4). Сила влияния фактора составила при этом 20,2% и 29,6%. Максимальным влиянием действующего фактора разворачивалось к 30 дню и распространилось на все зоны хряща с наибольшей силой влияния на зоны дефинитивного хряща (44,9%), первичного остеогенеза (42,4%), долю клеточного компонента и межклеточного вещества в последней (40,2% и 42,1%, соответственно), зону деструкции (37,9%), и, в меньшей мере – на зону индифферентного хряща, для которой сила влияния фактора составила всего 27,9%. К 90 дню действие кверцетина как фактора, воздействующего на эпифизарный хрящ крыс группы ДК1, более не оказывало на последний статистически значимого влияния.

Влияние кверцетина на фоне нанесенных дефектов большеберцовых костей на структуры эпифизарного хряща в группе ДК2 было отсроченным и проявилось только на 15 сутки, оказав влияние на общую ширину хряща с силой влияния фактора 23,4%. К 30 дню эффект влияния кверцетина распространился на все зоны эпифизарного хряща, воздействуя с максимальной силой на зону первичного остеогенеза (сила влияния 57,5%) и пролиферации (49,9%). Впервые значительным оказалось влияние фактора присутствия кверцетина на ширину зоны индифферентного хряща (39,7%). Зона дефинитивного хряща, объемная доля клеток в зоне первичного остеогенеза и доля межклеточного вещества также оказались под влиянием препарата как действующего фактора к 30 дню, но в меньшей мере, т.к. сила влияния составила всего 28,2% - 29,2%.

В групі ДК3 умови експеримента на стані епіфізарного хряща достовірного впливу не оказували впродовж до останнього терміну спостереження. Тільки к 90 дню фактор присутності кверцетину в організмі крыс інволютивного віку оказав достовірний вплив на ширину зон деструкції з силою впливу 35,3%, зони дефінітивного хряща (35,3%) і первинного остеогенезу (31,0%). В результаті і загальна ширина хряща в групі ДК3 на 90 день оказалась під значительним впливом препарату, сила впливу якого на даний показник склала 53,2%.

З боку діафізу большеберцових кісток в групі ДК1 вплив умов експеримента був транзитним і відобразився тільки на 7 днів на площі кістномозгової порожнини (сила впливу фактора склала 25,7%). Структури діафізу в групі ДК2 а саме – діаметр каналів остеонів і площа кістномозгової порожнини – оказались під вплив умов експеримента тільки на 90 день (сила впливу фактора для даних структур склала 37,3% і 29,7%). У крыс групи ДК3 із вищезазначених структур діафізу під вплив умов експеримента потрапив розмір діаметра каналів остеонів. Сила впливу фактора була статистично значимою тільки на 7 і 15 днів і склала 32,8% і 35,8%, відповідно. К 15 дню фактор присутності кверцетину в організмі живих груп ДК3 також впливав на діаметр остеонів з силою впливу 34,8%. Далі до кінця спостереження умови експеримента не проявляли статистично значимого впливу на структури діафізу.

Висновок. Проведені дослідження дозволяють утвердити, що нанесення сквозного дрячатого дефекту в большеберцової кістки достовірно впливає на гістологічне будову їх проксимальних епіфізарних хрящів і діафізів. Внутрішньокішковий застосування біофлавоноїду кверцетину в терапевтичній дозуванні в значительній ступені згладжує виявлені відхилення. Найбільш ефективно застосування кверцетину у немолодих крыс, найменше – у живих періоду виражених стареческих змін.

Перспективи дальніших досліджень. Отримані в ході даного експерименту будуть доповнені результатами ультраструктурного дослідження мінерального компонента ББК з дрячатим дефектом на фоні застосування кверцетину і при його відсутності.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Автандилов Г.Г. Медичинська морфометрія. Руководство / Г.Г. Автандилов – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Климовицкий В.Г. Возможные пути оптимизации репаративных процессов у пострадавших с переломами длинных костей конечностей (взгляд на проблему) / В.Г. Климовицкий, В.Н. Пастернак, В.М. Оксонец // Ортопедия, травматология и протезирование.- 2006. - № 1. –

С.90-99.

3. Ковешников В.Г. Зональное строение эпифизарного хряща / В.Г. Ковешников // Антропология, антропология, спорт. – Винница, 1980. – Т. 2. – С. 251-252.
4. Корж Н.А. Нарушение регенерации костной ткани при переломах длинных костей (оценка факторов риска) / Н.А. Корж, Л.Д. Горидова, К.К. Романенко // Проблемы остеологии. - 1999. - Т.2, №1.- С. 40.
5. Лаврищева Г.И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко - М.: Медицина, 1996. – 208 с.
6. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – Киев: Морион, 2000. – 320 с.
7. Лузин В.И. Прочностные характеристики плечевой кости белых крыс различного возраста при нанесении дрячатого дефекта большеберцовых костей / В.И. Лузин, В.Н. Прочан // Украинский медицинский альманах. – 2009. – Том 12, №2. – С. 102-106.
8. Лузин В.И. Рост и формирование костей скелета белых крыс при нанесении дрячатого дефекта большеберцовых костей на различных этапах постнатального онтогенеза / В.И. Лузин, В.Н. Прочан // Украинский морфологический альманах. – 2008. – Том 6, №4. – С. 69-74.
9. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В.И. Лузин, Д.В. Ивченко, А.А. Панкратьев, и соавт. // Украинский медицинский альманах. – 2005. – Том 8, №2 (дополн.). – С. 162.
10. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Доклады АН СССР.- 1979.- Т.247, №6.- С.1513-1516.
11. Юнкеров В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – [2-е изд., доп.]. – СПб.: ВМедА, 2005. – 292 с.
12. Bostrom M.P. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing / M.P. Bostrom, N.P. Camacho // Clin. Orthop. - 1998. - Vol. 355. - P. 274-282.
13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. - Strasbourg, 1986. - 52 p.
14. Wong R.W. Effect of quercetin on bone formation / R.W. Wong, A.B. Rabie // J. Orthop. Res. – 2008. – Vol. 26 (8). – P. 1061-1066.
15. Wong R.W. Effect of quercetin on preosteoblasts and bone defects / R.W. Wong, A.B. Rabie // Open Orthop. J. – 2008. – Vol.2. – P. 27-32.

Надійшла 14.10.2012 р.

Рецензент: проф. С.А.Кашенко