

УДК: 612.398.192: 661.982: 612.015.6: 611.73: 599.323.4
 © Безсмертний Ю.О., 2013

МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ ТА ЇЇ КОРЕКЦІЇ Безсмертний Ю.О.

НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова

Безсмертний Ю.О. Морфологічні та біохімічні зміни скелетних м'язів за умов експериментальної гіпергомоцистеїнемії та її корекції // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 29-32.

Досліджено вплив гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) та її комбінації з введенням інгібітору синтази оксиду азоту L-NAME на стан м'язової системи щурів. Встановлено, що при ГГЦ, на фоні ушкодження судин та тромбоутворення, розвиваються дистрофічні та некротичні зміни в скелетних м'язах, знижується вміст фосфокреатину, глікогену, фосфатидилхоліну, накопичуються продукти пероксидації білків та ліпідів. Дегенеративні зміни в м'язовій системі щурів з ГГЦ посилюються при введенні L-NAME. Декамевіт ефективно знижує рівень гомотеїну в сироватці крові, зменшує біохімічні порушення в м'язовій тканині.

Ключові слова: гіпергомоцистеїнемія, м'язова тканина, декамевіт

Бессмертный Ю.А. Морфологические и биохимические изменения скелетных мышц при экспериментальной гипергомоцистеинемии и её коррекции // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 29-32.

Исследовано влияние гипергомоцистеинемии (ГГЦ) и её комбинации с введением ингибитора синтазы оксида азота L-NAME на состояние мышечной системы крыс. Установлено, что при ГГЦ, на фоне повреждения сосудов и тромбообразования, развиваются дистрофические и некротические изменения в скелетных мышцах, снижается содержание фосфокреатина, гликогена, фосфатидилхолина, накапливаются продукты пероксидации белков и липидов. Дегенеративные изменения в мышечной системе крыс с ГГЦ усиливаются при введении L-NAME. Декамевит эффективно снижает уровень гомотеина в сыворотке крови, уменьшает биохимические нарушения в мышечной ткани.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, мышечная ткань, декамевит.

Bessmertnyi I.A. Morphological and biochemical changes of skeletal muscle at experimental hyperhomocysteinemia and its correction // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 29-32.

Influences of hyperhomocysteinemia (HHcy) and its combination with administration of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on rat muscle was investigated. It was established, that HHcy activated of dystrophic and necrotic changes in the skeletal muscles, reduces phosphocreatine, glycogen, phosphatidylcholine nakaplivayutsya products of protein and lipid peroxidation. Degenerative changes in muscles of rats with HHcy were amplified at L-NAME administration. Decamevitum effectively reduced homocysteine level in blood serum, diminished biochemical disturbances in muscular tissue.

Key words: hyperhomocysteinemia, muscle, Dekamevitum.

Порушення репаративної регенерації залишається однією з найбільш актуальних проблем сучасної травматології та ортопедії. За даними Американської асоціації ортопедів з двох мільйонів переломів довгих кісток, які щорічно реєструються в США, близько 100 тис. (5%) завершуються незгоєнням [2]. Незадовільні віддалені результати лікування хворих з переломами в спеціалізованих травматологічних стаціонарах складають біля 2,5% [4]. Перебіг репаративного остеогенезу залежить від локального кровообігу в зоні ушкодження [2], який в певній мірі детермінується станом периферійних судин до моменту травми. В останні роки з'явилися переконливі докази, що гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) – визнаний чинник судинних уражень та тромбозів – асоціюється з високим ризиком остеопорузу та переломів [3, 9]. Не виключено, що ГГЦ може негативно впливати на процеси репарації кісток та функціонально-пов'язаних з ними тканин (скелетних м'язів), однак детальних досліджень в цьому напрямку не проводилось. Не досліджено, в якій мірі засоби з гіпогомоцистеїнемічною дією здатні запобігати розвитку небажаних змін в м'язовій тканині за ГГЦ.

Мета дослідження: дослідити вплив гіпергомоцистеїнемії, її поєднання з введенням інгібітору синтази оксиду азоту L-NAME та корекції декамевітом на морфологічний та біохімічний стан м'язової системи щурів.

Матеріал та методи. Досліди проведені на 90 білих нелінійних щурах-самцях масою 250-270 г. Під час експериментів всі тварини перебували в стандартних умовах, з 12-годинним світло-тьмювим режимом, вільним доступом до води та їжі і отримували напівсинтетичну крохмально-казеїнову дієту з контрольованим вмістом всіх макро- та мікронутрієнтів [3]. Модель ГГЦ у 60 тварин (групи 2, 2а, 3, 4) створювали шляхом інтрагастрального введення тіолактону D, L-гомотеїну (Fluka, Німеччина) в дозі 100 мг/кг маси тіла 1 раз на добу. Тваринам 3 групи додатково давали неселективний інгібітор синтази оксиду азоту L-NAME (метиловий ефір L-N^ω-нітроаргініну) в дозі 30 мг/кг маси 1 раз на добу. Вказані речовини вводили на 1% розчині крохмалю протягом 28 діб. Контроль (групи 1а, 1) склали 30 щурів, яким вводили еквівалентні об'єми розчину крохмалю.

Для профілактики ГГЦ-індукованих порушень був використаний полівітамінний ком-

плекс декамевіт (Декамевіт®; АТ “Київський вітамінний завод”) – єдиний з вітчизняних препаратів, який містить в одній таблетці високі дози вітамінів В₆, В₉, В₁₂ – 20,0; 2,0; 0,1 мг. Декамевіт додавали в дієту тварин 4 групи весь термін дослідів в кількості 781 мг на 1 кг сухого корму, що забезпечувало надходження 1430 мкг вітаміну В₆, 143 мкг вітаміну В₉, 7,15 мкг вітаміну В₁₂ на 1 кг маси тіла тварин. Вказані дози вітамінів В₆, В₉, В₁₂ перевищують добову потребу щурів в 7-20 разів, при цьому є нетоксичними і мають гіпогемістостатичну дію [3].

Частину тварин (групи 1а, 2а) виводили з експерименту на 14 добу, а решту (групи 1, 2, 3, 4) – на 28 добу під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Досліди виконували згідно міжнародних вимог «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Strasburg, 1986), правил гуманного відношення до експериментальних тварин, затверджених комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова.

Вміст загального ГЦ в сироватці крові визначали імуноферментним методом набором «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія).

Для оцінки стану м'язової тканини виділяли скелетні м'язи стегна, наважку м'язів гомогенізували (тефлон-скло, 3000 об/хв) в 1,15% розчині хлориду калію (1:3 за об'ємом), отриманий гомогенат проціджували через 2 шари марлі для видалення грубих частин [5]. Фосфоліпідний склад гомогенату м'язів визначали після екстракції ліпідів (за Bligh, Dyer) методом тонкошарової хроматографії на силікогелі А5/40 (Chemapol, Чехія). Кількісне визначення фракцій фосфоліпідів після хроматографії проводили за реакцією з фосфорнованіліновим реактивом. Вміст маломолекулярного діальдегіду в гомогенаті м'язів визначали

за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [1], а білкових карбонільних груп – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [6]. Вміст білку в пробах визначали мікробіуретовим методом.

Для дослідження вмісту фосфокреатину наважку скелетних м'язів промивали охолодженим до 0°C 0,13 М розчином NaCl, поміщали у рідкий азот, потім тканини гомогенізували до консистенції порошку [4]. Вміст фосфокреатину визначали в безбілковому перхлорному екстракті м'язів стегна 1:4 (0,6 М HClO₄), нейтралізованому 5М K₂CO₃. Вміст глікогену у м'язах визначали як описано [7].

Для мікроскопічного дослідження шматочки судин, м'язів та нервів фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну за стандартною методикою, зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та заливали в парафін. Гістологічні зрізи готували товщиною до 15-20 мкм, забарвлювали гематоксилін-еозіном та пікрофуксином за ван Гізон. Гістологічні зрізи нервових волокон забарвлювали гематоксилін-еозіном.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм “MS Excel XP”. Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стюдента.

Результати та їх обговорення. Введення тваринам тіолактону ГЦ в дозі 100 мг/кг маси тіла викликало достовірне зростання рівня ГЦ в сироватці крові за станом на 14 та 28 добу в 2,4 та 2,6 рази, відповідно (таб. 1). Введення інгібітору синтезу оксиду азоту L-NAME потенціувало формування ГЦ: у тварин 3 групи (ГЦ + L-NAME) вміст ГЦ втретє перевищував такий в контролі. Збагачення дієти тварин полівітамінним комплексом декамевіт стримувало розвиток ГЦ – вміст ГЦ в сироватці крові у тварин 4 групи (ГЦ + декамевіт) підвищився лише в 1,5 рази.

Таблиця 1. Вміст гомоцистеїну в сироватці крові щурів за умов ГЦ, її поєднання з введенням L-NAME та корекції декамевітом (M±m, n=10)

№ групи	Характеристика групи	Вміст ГЦ в сироватці крові, мкмоль/л
Стан на 14 добу		
1а	Контроль	7,23±0,25
2а	ГЦ	17,2±1,20*
Стан на 28 добу		
1	Контроль	7,19±0,26
2	ГЦ	18,5±0,99*
3	ГЦ + L-NAME	21,9±1,17*#
4	ГЦ + декамевіт	11,0±0,74*#

Примітки: 1. * – p<0,05 – відносно групи відповідного контролю; 2. # – p<0,05 – відносно групи 2

При гістоморфологічному дослідженні скелетних м'язів щурів з тіолактон-індукованою ГЦ (група № 2а) на 14 добу відмічені набряк та помірні дистрофічні зміни. Набряк, який розповсюджувався під епімізієм, поєднувався з руйнуванням сарколеми м'язових волокон, дискомплексацією міофібрил та втратою ними еозінофільності. Між м'язовими волокнами, які характеризувалися втратою повздовжньої міофібрилярності та поперечної посмугованості, простежувались ділянки з вираженою інфільтрацією ефекторними клітинами запалення, що вказувало на ознаки розвитку інтерстиційного міозиту.

В місцях локалізації судин спостерігали набряк та периваскулярну клітинну інфільтрацію. Ендотеліальний шар судин був потовщеним, нерівномірним, з ділянками значної десквамації. На зрізі капілярних судин, в місцях пошкодження ендотеліального шару, спостерігали реактивне розмноження ендотеліоцитів, виражену проліферацію гладком'язових елементів, внутрішньосудинну агрегацію еритроцитів з формуванням поодиноких пристінкових тромбів.

На 28 добу спостереження в м'язових волокнах відмічали глибокі дистрофічні зміни з дезкомплексацією та деградацією міофібрил, форму-

ванням тканинного детриту та некрозу. Ядра міофібрил були гіпохромними, в частині препаратів не простежувались. Саркоплазма міофібрил втрачала такі ознаки структурності як поздовжню та поперечну посмугованість. Глибокі дистрофічні та некротичні зміни в м'язових волокнах викликали реакцію ефекторних клітин – макрофагів, лімфоцитів, рідше нейтрофілних лейкоцитів та тучних клітин, які формували інфільтрати поміж стромальних та ендомізійних проміжків. Мікроскопічно простежувалась типова картина альтеративного та інтерстиційного міозиту.

В судинах, що пронизували м'язові волокна, формувалась картина більш виразних альтераційних та тромботичних змін. Простежувались об'ємні ділянки десквамації та проліферації ендотеліоцитів з стовпчастим стоянням його ядер, гіпертрофією гладеньких міоцитів, звуження просвіту, внутрішньосудинної агрегації тромбоцитів та еритроцитів з формуванням численних тромбів.

У тварин, яким протягом чотирьох тижнів вводили інтрагастрально тіолактон ГЦ в комбінації з L-NAME, порівняно з групою № 2, спостерігали більш глибокі дистрофічні та некротичні зміни, що супроводжувались формуванням запальних інфільтратів, які містили здебільшого еозінофілні клітини. Запальні інфільтрати простежувались поміж альтерованих і розріджених м'язових волокон та в прошарках сполучної тканини з ліпоцитами. В більшості препаратів реєструвались широкі зони спотворено забарвлених поперечних зрізів м'язових волокон базофільного характеру з втратою поздов-

жньої та поперечної посмугованості, ділянками вираженої запальної інфільтрації. На фоні глибоких дистрофічних змін відмічали фокуси вздуття та розшарування міофібрил з утворенням зон некрозу м'язових волокон та формуванням тканинного детриту.

У тварин, яким на фоні введення тіолактону ГЦ у комбінації з L-NAME призначали декамет (група № 4), на фоні незначно відмінного забарвлення м'язових волокон та набряку, відсутні набухання та дисконфлексія міофібрил, збережена їх поздовжня міофібрилярність та поперечна посмугованість. На поперечному зрізі м'язових волокон не помітно контрасту еозінофілії волокон. Ядра м'язових волокон та міосателітних клітин мали базофільне забарвлення. Клітинні інфільтрати відсутні.

Накопичення ГЦ в плазмі крові супроводжувалось суттєвими порушеннями біохімічних характеристик скелетних м'язів (табл. 2). Вже за двотижневої ГЦ погіршувалось енергопостачання м'язів стегна: достовірно знижувались (на 18,6 та 21,3%) запаси глікогену та макроергу фосфокреатину. Негативна динаміка посилювалась зі збільшенням тривалості ГЦ. Між вмістом ГЦ в сироватці крові та вмістом фосфокреатину в м'язах виявлявся достовірний обернений кореляційний зв'язок ($r=-0,58$, $p<0,05$). За ГЦ з'являлись ознаки оксидативного пошкодження м'язових білків та ліпідів: введення тіолактону ГЦ спричиняло підвищення вмісту карбонільних груп білків та МДА в стегнових м'язах в 1,2-1,3 рази за станом на 14 добу та в 1,6-2,1 рази за станом на 28 добу досліду.

Таблиця 2. Біохімічні показники скелетних м'язів щурів за умов ГЦ, її поєднання з введенням L-NAME та корекції декаметом ($M \pm m$, $n=10$)

№ групи	Характеристика групи	Глікоген мкмоль/г тканини	Фосфокреатин, мкмоль/г тканини	Карбонільні групи, мкмоль/г білку	МДА, мкмоль/г білку
Стан на 14 добу					
1а	Контроль	35,4±1,42	7,03±0,29	6,11±0,35	2,59±0,17
2а	ГЦ	28,8±1,53*	5,58±0,26*	7,29±0,45*	3,42±0,22*
Стан на 28 добу					
1	Контроль	34,0±1,59	6,57±0,17	6,06±0,38	2,48±0,16
2	ГЦ	26,5±1,14*	4,97±0,34*	9,74±0,63*	5,28±0,32*
3	ГЦ + L-NAME	21,4±1,9*#	3,92±0,29*#	11,3±0,42*#	6,31±0,37*#
4	ГЦ + декамет	29,9±1,25	5,98±0,20*#	7,73±0,52*#	3,19±0,23*#

Примітки: 1. * - $p<0,05$ – відносно групи відповідного контролю; 2. # - $p<0,05$ – відносно групи 2.

Інгібування синтезу оксиду азоту збільшувало виразність ГЦ-індукованих біохімічних змін у скелетних м'язах щурів. Наприклад, у щурів 3 групи (ГЦ+L-NAME) зниження вмісту фосфокреатину та глікогену сягало 40,3 та 37,1%. Декамет ефективно стримував процеси пероксидації білків та ліпідів і запобігав виснаженню запасів високоенергетичних сполук у стегнових м'язах щурів з ГЦ.

За умов ГЦ змінювався фосфоліпідний склад скелетних м'язів (табл. 3): за станом на 14 та 28 добу достовірно зменшувалось на 24,3 та 36,5% вміст метильованих фосфоліпідів (ФХ), зростав на 23,3 та 51,3% вміст неметильованих фосфоліпідів (ФЕА), підвищувався на 44,4 та

82,7% вміст ЛФХ (продукту деградації ФХ).

Суттєво порушувались і звичайні співвідношення між фракціями фосфоліпідів – підвищувалось (в 1,6-2,4 рази) відношення ФЕА/ФХ та зменшувалось (в 1,9-2,5 рази) відношення ФХ/ЛФХ. Введення L-NAME поглиблювало ГЦ-індуковані порушення фосфоліпідного спектру скелетних м'язів щурів, а насичення організму тварин декаметом суттєво зменшувало масштабність виявлених відхилень.

Такі зміни фосфоліпідного спектру за ГЦ вказують на інгібування метилтрансферазних реакцій в скелетних м'язах, адже перетворення ФЕА на ФХ відбувається за участі фосфатидилетаноламін-N-метилтрансферази, яка каталізує

перенесення метильної групи з S-аденозилметіоніну на ФЕА [16]. Не виключено, що зниження в скелетних м'язах вмісту ще однієї

метильованої сполуки – фосфокреатину – також є наслідком ГЦ-індукованого пригнічення процесів метилювання.

Таблиця 3. Вміст фосфоліпідів у скелетних м'язах щурів за умов ГЦ, її поєднання з введенням L-NAME та корекції декамевітом ($M \pm m$, $n=10$)

№ групи	Характеристика групи	Фракції фосфоліпідів, мг/г тканини			Відношення	
		ФХ	ЛФХ	ФЕА	ФХ / ЛФХ	ФЕА / ФХ
Стан на 14 добу						
1а	Контроль	8,03±0,56	0,27±0,023	3,43±0,16	30,8±3,30	0,44±0,040
2а	ГЦ	6,08±0,30*	0,39±0,033*	4,23±0,32*	16,4±1,41*	0,71±0,065*
Стан на 28 добу						
1	Контроль	8,43±0,47	0,29±0,021	3,31±0,11	30,1±1,66	0,41±0,035
2	ГЦ	5,35±0,30*	0,48±0,041*	5,01±0,38*	12,1±1,42*	0,99±0,12*
3	ГЦ + L-NAME	4,88±0,21*	0,53±0,042*	6,50±0,28*#	9,91±1,03*	1,37±0,11*#
4	ГЦ + декамевіт	6,17±0,22*#	0,34±0,016#	4,12±0,24*	18,6±1,6*#	0,67±0,04*#

Примітки: 1. * – $p < 0,05$ – відносно групи відповідного контролю; 2. # – $p < 0,05$ – відносно групи 2.

Таким чином, ГЦ спричиняє низку дегенеративно-дистрофічних змін в м'язовій тканині, які можуть негативно відображатись на процесах репарації кісткової тканини. Токсичний вплив високих рівнів ГЦ на організм пов'язують з розвитком оксидативного стресу, гіпометилюванням та дестабілізацією геному, порушенням біосинтезу та функції багатьох білків [3, 8], в тому числі і білків кісткової тканини [9]. Показово, що полівітамінний комплекс декамевіт забезпечує корекцію рівня ГЦ в плазмі крові, зменшує прояви оксидативного стресу та гіпометилювання і, таким чином, ефективно стримує розвиток дегенеративно-дистрофічних процесів в скелетних м'язах щурів.

Висновки:

1. Тіолактон-індукована ГЦ вже на 14 добу експерименту викликає значні зміни в скелетних м'язах, які проявляються набряком, дискомплексцією міофібрил з втратою поздовжньої міофібрилярності та поперечної посмугованості і розвитком інтерстиційного міозиту. В віддалені терміни (28 діб) на фоні ушкодження ендотелію судин та тромбоутворення в м'язах розвивались виражені об'ємні дистрофічні та некротичні процеси. Поєднання ГЦ з введенням неселективного інгібітора синтази оксиду азоту L-NAME викликало більш виразні альтеративні та дистрофічно-некротичні прояви.

2. В скелетних м'язах щурів з ГЦ знижується вміст фосфокреатину та глікогену, порушується фосфоліпідний склад, накопичуються продукти пероксидації білків та ліпідів. Введення L-NAME прискорює формування дегенеративно-некротичних змін у кістково-м'язовій системі щурів.

3. Збагачення дієти щурів декамевітом достовірно запобігає розвитку ГЦ та зменшує масштабність порушень у м'язовій системі тварин.

Перспективи подальших досліджень направлені на розробку та впровадження патогенетично обґрунтованих методів профілактики та лікування порушень репаративної регенерації довгих кісток при гіпергомоцистеїнемії та асоційованих станах.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М. : Наука, 1972. – 252 с.
2. Корж Н. А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Системные факторы, влияющие на заживление перелома. (Сообщение 3) / Н. А. Корж, Н. В. Дедух, О. А. Никольченко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – №2. – С. 93-99.
3. Пентюк О. О. Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О. О. Пентюк, М. Б. Луцюк, К. П. Поставітенко // Досягнення біології та медицини. – 2004. – №1 (3). – С.35-38.
4. Ролік О. В. Незрощення довгих кісток (аналіз, фактори ризику, лікувальна тактика) / О. В. Ролік, І. А. Засаднюк // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2005. – №2. – С. 61-64.
5. Хурані І.Ф. Влияние флавоноида детралекса на биохимические изменения в мышцах и токсический эффект при облучении крыс / И. Ф. Хурані, А. Я. Какарькин, А. А. Пентюк // Biomedical and biosocial anthropology. – 2005. – №5. – С.24-28.
6. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins / R. L. Levine, J. A. Williams, E. R. Stadtman, E. Shacter // Methods Enzymol. – 1994. – №233. – P.346-357.
7. Kits Van Heijningen A. J. Free and fixed glycogen in rat muscle / A. J. Kits Van Heijningen, A. Kemp // Biochem J. – 1955. – Vol. 59, №3. – P.487-491.
8. Plasma homocysteine is regulated by phospholipid methylation / A. A. Noga, L. M. Stead, Y. Zhao [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, №8. – P. 5952-55.
9. The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B(6) and B(12) deficiencies in osteoporosis: a systematic review / M. Herrmann, J. Peter Schmidt, N. Umanskaya [et al.] // Clin Chem Lab Med. – 2007. – Vol. 45, № 12. – P.1621-32.

Надійшла 17.11.2012 р.
Рецензент: проф. В.І. Лузін