

УДК 611.71/72:531.113:611.068

© С.А. Кутя, Г.А. Мороз, 2012.

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

С.А. Кутя, Г.А. Мороз

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», кафедра нормальной анатомии (зав. – проф. В.С. Пикалюк). г. Симферополь.

### STRUCTURAL AND ARCHITECTURAL CHANGES IN TRABECULAR BONE UNDER HYPERGRAVITY AND GLUTARGIN USE

S.A. Kutya, G.A. Moroz

## SUMMARY

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

### СТРУКТУРНО-АРХИТЕКТУРНІ ЗМІНИ ГУБЧАТОЇ РЕЧОВИНИ КІСТОК ПРИ ГРАВИТАЦІЙНИХ ПЕРЕВАНТАЖЕННЯХ НА ТЛІ ВИКОРИСТАННЯ ГЛУТАРГІНУ

С.А. Кутя, Г.О. Мороз

## РЕЗЮМЕ

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

**Ключевые слова:** микроархитектоника, кость, гравитационные перегрузки, глутаргин.

Основная функция костей в организме человека и животных заключается в обеспечении необходимых прочностных характеристик тела или его отдельных органов при статических и динамических нагрузках. Известно, что механические свойства костей определяются как их химическим составом, так и особенностями структурной организации [4, 7].

Цель – установить структурные и микроархитектонические изменения губчатого вещества костей в разных точках скелета при гипергравитационном воздействии на организм крыс и при использовании глутаргина в качестве средства, повышающего устойчивость к действию гравитационных перегрузок.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проведено на 24 крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 260-280 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 Г за 30 минут до сеанса гипергравитации внутрибрюшинно вводили глутаргин в дозе 100 мг/кг массы крысы [3]. Контролем (К-2) для этой серии служили крысы, которым за 30 минут до помещения в контейнеры внутрибрюшинно 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 метадиафизарного 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 мм<sup>2</sup>). Эти показатели отражают соответственно ширину трабекул, расстояние между ними и плотность их расположения. В последующем проводили node-strut анализ [5], заключающийся в подсчете количества соединений (N.Nd.) и окончаний (N.Tm.) в 1 мм<sup>2</sup>, 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) [9]. Для суммарной оценки степени сцепленности в губчатом веществе определяли звездчатый объем костномозговых полостей - V\* [10].

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

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке параметров, отражающих количество костной массы в структуре губчатого вещества метадиафизарной области большеберцовых костей и его архитектонику у животных серии П, обнаружили уменьшение ее объема на 6,97 % (p<0,05), количества трабекул на 4,19 % (p>0,05) и их толщины на 9,32 % (p<0,05) относительно контроля. Эти изменения сочетались с увеличением межтрабекулярных расстояний на 3,51 % (p<0,05) по отношению к контрольным данным. При проведении node-strut анализа обнаружили уменьшение, в сравнении с данными в контрольной серии, количества соединений на 7,09 % (p<0,05), расстояния между ними на 5,36 % (p>0,05) и свободными окончаниями на 7,40 % (p<0,05), число которых увеличилось на 12,92 % (p<0,05). Расстояние от центра соединения до свободного конца трабекулы увеличилось, по сравнению с контролем, на 2,96% (p>0,05). Звездчатый объем костномозговых полостей превышал контрольные значения на 5,67 % (p<0,05) (табл. 1). Изменения исследовавшихся показателей у крыс серии Г были незначительными (отклонения от контроля находились в пределах 2-3%) и не имели статистической достоверности (табл. 1).

Таблица 1

Данные гистоморфометрии срезов большеберцовых костей

Показатель \ Серия	К-1	К-2	П	Г
Sp-BV/TV, %	38,51±1,11	38,54±0,71	35,83±0,37#	38,10±0,29
Tb.N, ед/мм <sup>2</sup>	13,25±0,33	12,98±0,29	12,70±0,09	12,94±0,22
Tb.Th, мкм	58,68±0,54	59,33±1,20	53,21±0,72#	57,82±0,70
Tb.Sp, мкм	132,45±1,72	134,94±4,13	137,10±0,80#	135,80±2,91
N.Nd, ед/мм <sup>2</sup>	7,87±0,20	7,77±0,11	7,31±0,09#	7,79±0,14
N.Tm, ед/мм <sup>2</sup>	3,25±0,07	3,23±0,04	3,67±0,13#	3,32±0,10
Nd.Nd, мкм	287,09±4,22	285,20±4,19	271,72±13,15	279,10±3,51
Nd.Tm, мкм	297,10±3,62	299,66±2,31	305,89±6,47	293,12±3,98
Tm.Tm, мкм	463,95±12,23	464,83±15,57	429,60±3,04#	443,55±13,43
V*, мм <sup>3</sup>	36,16±0,90	36,05±1,34	38,21±0,15#	36,83±0,78

Примечание. # (здесь и далее) – p≤0,05 относительно контроля.

При исследовании позвонков у животных серии П обнаружили уменьшение доли костной ткани в структуре губчатого вещества на 11,24 % (p<0,05) относительно контроля. Выявили уменьшение количества трабекул на 6,84 % (p<0,05), их истончение – на 4,27 % (p<0,05) по отношению к контролю. Эти

изменения привели к увеличению межтрабекулярных расстояний на 10,51 % (p<0,05). Также обнаружили увеличение количества свободно лежащих окончаний в структуре трабекулярной сети на 12,05 % (p<0,05) в сравнении с данными контрольной серии и уменьшение расстояния между ними на 9,17 %

( $p < 0,05$ ). Звездчатый объем был увеличенным относительно контрольных значений на 11,06 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

У животных серии Г обнаружили изменения такой же направленности, как и у крыс серии П, но меньшей степени выраженности. Так, показатель объема костного вещества у крыс серии Г снизился относительно контроля на 5,02 % ( $p > 0,05$ ), что было меньше отклонения в серии П на 6,22 %. Толщина трабекул уменьшилась, относительно контроля, на 2,95 % ( $p > 0,05$ ), в то время как показатель сепарации

трабекул был увеличенным на 5,91 % ( $p > 0,05$ ), что, однако было меньшим, чем отклонение в серии П, на 4,60 %. Отмеченное у животных серии П увеличение количества свободных окончаний трабекул, наблюдали и в серии Г. Отклонение этого показателя от контроля составило 3,04 % ( $p > 0,05$ ). Наряду с описанными изменениями наблюдали увеличение, в сравнении с данными в контрольной серии, показателя звездчатого объема на: 2,75 % ( $p > 0,05$ ) в серии с глутаргином, что было меньше, чем отклонение в серии П, на 8,31 % (табл. 2).

Таблица 2

Данные гистоморфометрии срезов позвонков

Серия / Показатель	К-1	К-2	П	Г
Cn-BV/TV, %	42,58±0,40	42,26±0,39	37,79±0,46#	40,14±1,18
Tb.N, ед/мм <sup>2</sup>	12,81±0,26	13,01±0,43	11,93±0,21#	13,03±0,15
Tb.Th, мкм	63,24±1,16	63,70±1,74	60,54±0,25#	61,82±0,96
Tb.Sp, мкм	163,29±4,28	165,51±5,16	180,46±8,64	175,29±0,83
N.Nd, ед/мм <sup>2</sup>	9,52±0,32	9,50±0,23	9,00±0,24	9,20±0,23
N.Tm, ед/мм <sup>2</sup>	2,67±0,12	2,69±0,04	2,99±0,05#	2,77±0,05
Nd.Nd, мкм	323,12±9,80	320,91±7,84	325,59±7,53	326,58±7,05
Nd.Tm, мкм	412,81±10,72	412,96±7,02	426,67±12,60	422,90±8,13
Tm.Tm, мкм	526,74±16,70	534,78±22,21	478,45±11,83#	542,90±6,89
V*, мм <sup>3</sup>	27,16±1,00	26,84±1,18	30,17±0,88#	27,58±0,33

### ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что многократно повторяющееся гипергравитационное воздействие на организм крыс зрелого 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. Микроархитектоника 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 глутаргина предотвращает утрату костного вещества и сохраняет его микроархитектонику.

В протекторном эффекте глутаргина необходимо выделить два аспекта: общее (коррекция нарушений, вызванных влиянием гипергравитации в организме в целом) и местное действие (предотвращение возникновения изменений в костной системе). Согласно литературным данным, защитный эффект

глутаргина связан с наличием в составе препарата L-аргинина, выступающего в качестве донатора оксида азота. Оксид азота ограничивает деструктивное действие стресс-реакций путем прямого уменьшения стрессорной активации свободно-радикального окисления за счет повышения активности антиоксидантных ферментов [1] и благодаря наличию собственных антиоксидантных свойств [6]. Немаловажную роль в ликвидации гипоксических проявлений, имеющих место при гипергравитации, может играть способность L-аргинин-NO системы в модуляции кислород-транспортной функции крови при окислительном стрессе и гипоксии [2]. Предотвращение утраты костной массы при применении глутаргина, наблюдавшееся у животных при многократно повторяющихся перегрузках, вероятно, связано со способностью препарата угнетать костную резорбцию, за счет торможения остеокластогенеза под действием L-глутамата, входящего в состав препарата [8].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы) / Ю.М. Степанов, И.Н. Кононов, А.И.

- Журбина [и др.] // Журнал АМН України. – 2004. – Т. 10, №1. – С. 340–352.
2. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина / В.В. Зинчук // Успехи физиологических наук. – 2003. – Т. 34, № 2. – С. 33–45.
3. Пат. 35792 Україна, МПК А 61В 5/145. Спосіб корекції несприятливої дії гравітаційних перевантажень в експерименті / Пикалюк В.С., Кутя С.А., Мороз Г.О., Коняєва О.І., винахідники і власники В.С. Пикалюк, С.А.Кутя, Г.О. Мороз, О.І. Коняєва. – № 200803985; заявл. 31.03.2008, опубл. 10.10.2008, Бюл. № 19, 2008.
4. Augat P. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength / P. Augat, S. Schorlemmer // Age and Ageing. – 2006. – Vol. 35, S.2. – ii27–ii31.
5. 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.
6. Hirst D.G. Nitric oxide physiology and pathology / D.G. Hirst, T. Robson // Methods Mol. Biol. – 2011. – Vol. 704. – P. 1–13.
7. Keaveny T.M. Architecture and trabecular bone – toward an improved understanding of the biomechanical effects of age, sex and osteoporosis / T.M. Keaveny, O.C. Yeh // J. Musculoskel. Neuron. Interact. – 2002. – Vol. 2, №3. – P. 205–208.
8. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss / S.J. Wimalawansa, G. De Marco, P. Gangula, C. Yallampalli // Bone. – 1996. – Vol. 18. – P. 301–304.
9. Parfitt A.M. Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units / A.M. Parfitt, M.K. Drezner, F.H. Glorieux [et al.] // J. Bone Min. Res. – 1987. – Vol. 2, №6. – P. 595–610.
10. 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.