

УДК 616:577.118:57.081(477)

Ультраструктурні зміни регенерату великогомілкових кісток тварин в умовах техногенного мікроелементозу організму і їх корекція препаратом діаліпон

О.В. Кореньков

Медичний інститут Сумського державного університету. Україна

Ultrastructural changes in tibial regenerate cells of mature and old rats in conditions of consumption of high doses of heavy metal salts by the animals were studied with help of the method of transmission electron microscopy. In experimental conditions, dystrophic and destructive changes of osteoblast organelles were observed, and there were lower calcium and phosphorus levels in the regenerate bone part, this fact being confirmed by an x-ray microanalysis. A possibility to correct the revealed changes with an antioxidant drug dialipon was found out.

С помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии исследованы ультраструктурные изменения клеток регенерата большеберцовых костей зрелых и старых крыс в условиях употребления животными повышенных доз солей тяжелых металлов. В условиях эксперимента наблюдаются дистрофические и деструктивные изменения органелл остеобластов, а в костной части регенерата уменьшается содержание кальция и фосфора, что подтверждается рентгеновским микроанализом. Установлена возможность коррекции выявленных изменений антиоксидантным препаратом диалипон.

Ключові слова: важкі метали, кістковий регенерат, ультраструктурна будова остеобластів, рентгенівський мікроаналіз, діаліпон

Вступ

Стабільний хімічний склад кісток є обов'язковою умовою для нормального перебігу репаративного остеогенезу [1]. Відомо, що зміни вмісту мікроелементів у доквіллі, які спричиняють екологічні чинники, можуть призводити до розвитку мікроелементозів організму [7]. На сьогодні у зв'язку з розвиненням промислового виробництва відбувається інтенсивне потрапляння солей важких металів у зовнішнє середовище і, як наслідок цього, їх накопичення в організмі людини [3]. На жаль, електронно-мікроскопічні дослідження регенератів кісток у цих умовах нечисленні, а в несприятливих екологічних умовах Сумщини зовсім відсутні. Тому *метою нашої роботи* було дослідити ультрамікроскопічні зміни остеобластів з визначенням остеотропних макроелементів у кістковій частині регенерату великогомілкових кісток в умовах надлишкового надходження до організму солей важких металів, а також встановити можливість корекції виявлених змін лікарським препаратом діаліпон.

Матеріал і методи

Експериментальна частина роботи полягала в моделюванні дірчастого дефекту діаметром 1,5 мм в середній третині діафіза великогомілкової кістки щурів, який виконували зубним бором в асептичних умовах під ефірним наркозом з подальшим дослідженням місця дефекту методами трансмісійної і растрової електронної мікроскопії з рентгенівським мікроаналізом кісткової частини регенерату. Об'єктом дослідження були 60 щурів 8- і 24-місячного віку. Тварин виводили з експерименту на 3-тю, 10-ту, 15-ту, 24-ту добу після перелому відповідно до стадій репаративного остеогенезу за Н.А. Коржом, Н.В. Дедух [4].

Піддослідних тварин було розподілено на 3 серії: I серія (20 щурів) — контрольні тварини, які споживали питну воду стандартної якості [9];

II серія (20 щурів) — тварини, які протягом двох місяців споживали питну воду з комбінацією солей важких металів (мідь ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) — 5 мг/л, цинк (ZnCl_2) — 5 мг/л, залізо (FeSO_4) — 10 мг/л,

марганець ($MnCl_2 \times 4H_2O$) — 1 мг/л і свинець ($Pb(NO_3)_2$) — 3 мг/л, що імітує воду за екологічних умов Сумської області [2].

III серія (20 щурів) — тварини, що перебували в умовах споживання надмірної кількості солей важких металів, у яких досліджували можливість корекції морфологічних змін репаративної регенерації великогомілкових кісток препаратом діаліпон у дозі 100 мг на 1 кг маси тіла один раз на добу протягом 30 діб.

Аналіз джерел літератури показав, що окрема негативна дія на організм надлишкової кількості таких важких металів, як марганець, залізо, мідь, цинк і свинець, в основному може бути пов'язана з їх прооксидантною властивістю [5, 8]. Тому, на нашу думку, для корекції даного стану необхідно було використати лікарській препарат з антиоксидантною дією. Саме таку властивість має альфа-ліпоєва кислота, яка є дійовою речовиною діаліпону. Крім цього, вона здатна відновлювати інші антиоксиданти організму [6]. Згідно з даними Praffly [11] альфа-ліпоєва кислота і її водорозчинна форма (дигідроліпоєва кислота) здатні утворювати хелатні сполуки з іонами свинцю, міді, цинку, марганцю, заліза, «схоплювати їх як кігтями» і виводити з організму. «Батько-засновник» теорії антиоксидантів, лауреат Нобелівської премії американський вчений зі світовим ім'ям доктор Lester Packer назвав альфа-ліпоєву кислоту ідеальним антиоксидантом [10]. Усе зазначене пояснює причину того, чому ми обрали саме цей лікарський препарат.

Результати і їх обговорення

На 3-тю добу після перелому на растровому електронному мікроскопі можна було бачити, що в ділянці дефекту кісток щурів усіх серій розташовувалася гематома, яка являла собою щільну масу. Окрім остеогенних клітинних елементів різноманітної форми, у ділянці дефекту визначалася велика кількість клітинних елементів крові (рис. 1), тканинні базофіли, макрофаги. Клітинні елементи розташовувалися безсистемно, не маючи закономірного взаємозв'язку між собою. Унаслідок діяльності клітинних елементів фібробластичного диферону ділянка дефекту заповнювалася міжклітинним матриксом, структурними формами якого були гранулярний матеріал і волокнисті елементи. Колагенові фібрили і волокна грануляційної тканини мали пухке і неупорядковане розташування, без певної орієнтації.

На 10–15-ту добу після ушкодження під час електронно-мікроскопічного дослідження кісткової мозолі у тварин другої серії встановлено, що кіст-

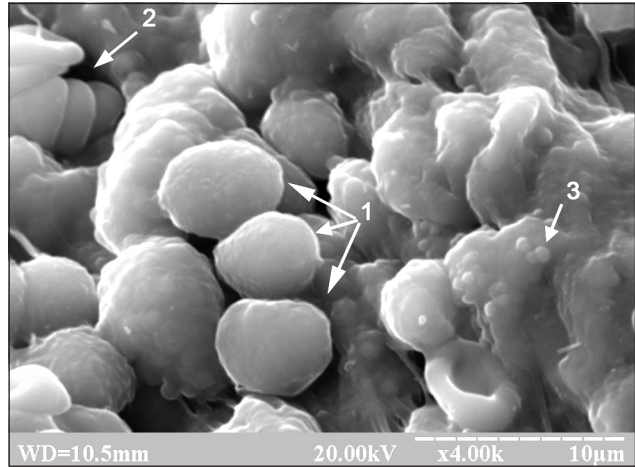


Рис. 1. Електронна сканограма регенерату великогомілкової кістки щура зрілого віку другої серії на 3-тю добу після перелому. Лімфоцити (1), еритроцити у вигляді «монетного» стовпчика (2), тромбоцити кулеподібної форми (3). 3б. x 4000

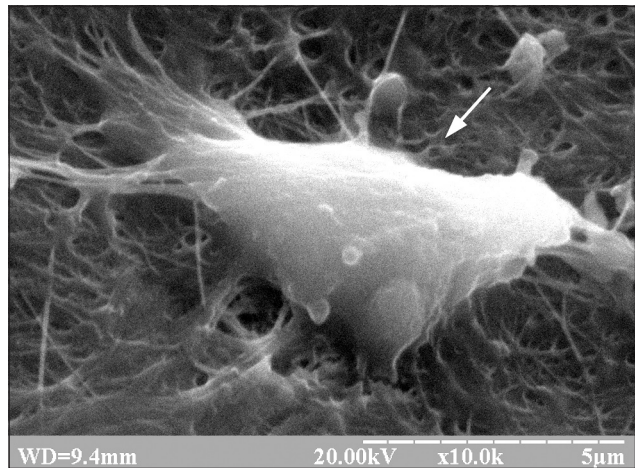


Рис. 2. Електронна сканограма остеогенної клітини у формі трикутника в кістковому регенераті на 10-ту добу після перелому у тварин старечого віку другої серії. 3б. x 10000

кова частина регенерату представлена кістковими балочками примітивної кісткової тканини. Зрілих кісткових структур на 15-ту добу виявлено не було, що виявилось суттєвою різницею по відношенню до тварин зрілого віку контрольної серії. Характерною морфологічною ознакою на 10-ту добу у тварин старечого віку була наявність відшарованого окістя у крайових відділах дефекту, що може бути пов'язано зі збільшенням кількості крововиливів і зі збільшенням терміну їх реорганізації. Міжбалковий простір був заповнений клітинними елементами фібро- та остеобластичного диферону (рис. 2), які забезпечували синтез сполучнотканинного і кісткового матриксу.

Трансмійсна ультрамікроскопія доводить, що характерною для цих клітин була наявність ядер із сильно розпушеною та осміофільною мембраною. Гранули деконденсованого хроматину були рівно-

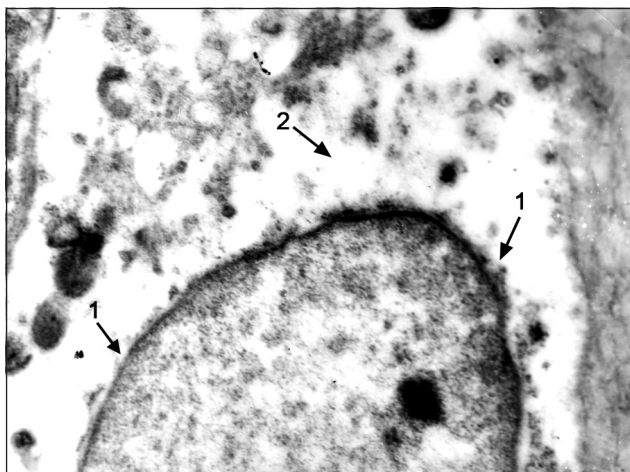


Рис. 3. Електроннограма. Ультраструктура остеобласта регенерату великогомілкової кістки щура зрілого віку другої серії на 10-ту добу після ушкодження. Розрив ядерної мембрани (1), спустошення (2) цитоплазми у перінуклеарній ділянці. Контрастування цитратом свинцю. 36. x 32000

мірно розкидані по площі зрізу, а гетерохроматин у вигляді осміофільного кільця локалізувався уздовж ядерної мембрани. У перінуклеарній ділянці цитоплазми практично були відсутні органели (рис. 3). Мітохондрії остеобластів були набряклими, з деструктивними змінами зовнішніх мембран і крист. В окремих мітохондріях виявлялися мієлоподібні утворення. Цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулума сильно розширені, мембрани розпушені, з поодинокими рибосомами на їх поверхні. У цитоплазмі є наявними включення ліпідів з різко зменшеною кількістю вільних рибосом і полісом. У невеликої кількості остеобластів визначалися ділянки некробіозу цитоплазми. Мембрани пластинчастого цитоплазматичного комплексу Гольджі піддавалися редукції та дезорганізації.

На 10–15-ту добу після перелому на фоні приймання діаліпону ядра остеобластів у тварин зрілого віку мали чітку ядерну мембрану. Хроматин частково знаходився в конденсованому стані і прилягав до внутрішньої мембрани ядра. У тварин старечого віку ядерна мембрана з глибокими інвагінаціями, осміофільна, мала ділянки розпушення. У центральній частині ядра визначалися електроннопрозорі ділянки матриксу, а на 15-ту добу у внутрішній частині ядра спостерігалися електроннощільні ядерця. Матрикс мітохондрій мав неоднорідну електронну щільність, його кристи розпушені. У тварин зрілого віку мітохондрії мали середню електронну щільність і дрібногранулярну структуру. У цитоплазмі цих тварин спостерігалися сильно розширені, а у тварин старечого віку — сплюснені цистерни і гіперплазія мембран ендоплазматичної сітки, на поверхні яких знаходилася велика кількість

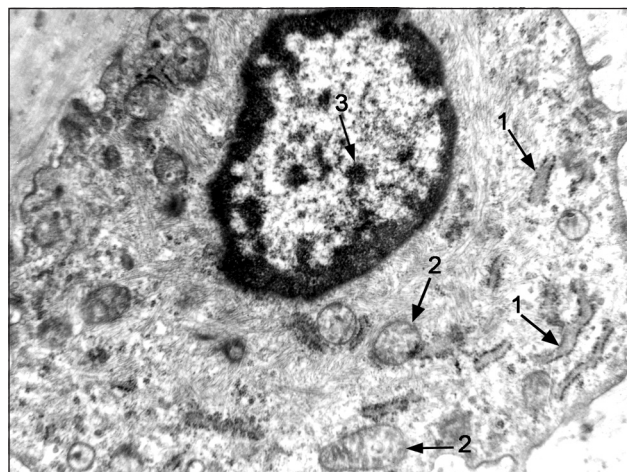


Рис. 4. Електроннограма. Ультраструктура остеобласта регенерату великогомілкової кістки щура старечого віку третьої серії на 15-ту добу після ушкодження. Сплюснені цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулума (1), чітко оконтуровані зовнішні мембрани мітохондрій (2), ядерце (3). Контрастування цитратом свинцю. 36. x 32000

рибосом (рис. 4). Пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі у двох вікових груп був суттєво гіпертрофований, а його гладенькі мембрани були оточені великою кількістю дрібних везикул.

Як видно з таблиці, у трабекулах ретикулофіброзної кісткової тканини у тварин зрілого і старечого віку на 10-ту добу відбулося зниження, порівняно з контролем, концентрації остеотропних макроелементів, які забезпечували процес мінералізації: Ca — на 20,94% ($p < 0,05$) і 23,14% ($p < 0,05$),

Таблиця. Показники макроелементів у кістковій частині регенерату за даними рентгенівського мікроаналізу ($M \pm m$, $n=10$)

Серія	Вік	Доба	Макроелементи	
			Ca,%	P,%
I серія	зрілі	10	17,71±0,52	9,66±0,21
		15	27,34±0,37	11,91±0,16
		24	34,82±0,84	14,84±0,91
	старі	10	22,12±0,41	10,34±0,43
		15	33,39±0,23	12,55±0,36
		24	39,95±1,8	16,44±0,59
II серія	зрілі	10	14±0,48*	9,24±0,19
		15	22,34±0,44*	10,52±0,23
		24	28,27±1,68*	11,95±0,42*
	старі	10	17±0,33*	7,57±0,28*
		15	26,24±0,44*	11,39±0,17
		24	33,76±1,32*	14,17±0,63*
III серія	зрілі	10	17,2±0,21○	9,48±0,13
		15	26,85±0,17○	11,49±0,25
		24	33,9±0,33○	14,1±0,16○
	старі	10	21,14±0,24○	9,74±0,17○
		15	31,44±0,29○	11,85±0,13
		24	37,9±0,18○	15,82±0,27○

Примітка: знаком * ($p < 0,05$) показано достовірну різницю тварин другої серії відносно до першої. Знаком ○ показано достовірну різницю третьої серії відносно до другої

P — на 4,35% ($p > 0,05$) і 26,78% ($p < 0,05$) відповідно. На фоні приймання діаліпону в цей термін у кістковій частині регенерату тварин зрілого і старечого віку було встановлено зростання кількості Ca на 22,85% ($p < 0,05$) і 24,35% ($p < 0,05$), P — на 2,59% ($p > 0,05$) і 28,6% ($p < 0,05$) по відношенню до тварин другої серії.

На 15-ту добу після перелому вміст остеотропних макроелементів у кісткових структурах регенерату мав динамічний приріст порівняно з попереднім терміном спостереження. Методом рентгенівського мікроаналізу було встановлено, що на поверхні кісткових балочок кількість Ca і P у щурів зрілого і старечого віку становила ($22,34 \pm 0,44$)% і ($10,52 \pm 0,23$)% (проти ($14 \pm 0,48$)% і ($9,42 \pm 0,19$)% на 10-ту добу) і ($26,24 \pm 0,44$)% і ($11,39 \pm 0,17$)% (проти ($17 \pm 0,33$)% і ($7,57 \pm 0,28$)%), але порівняно з контрольними показниками це було на 18,28% ($p < 0,05$) і 21,41% ($p < 0,05$) менше для Ca, на 11,67% ($p > 0,05$) і на 9,24% ($p > 0,05$) для P. Використання діаліпону у тварин третьої серії призвело до збільшення кількості Ca і P у кістковій частині регенерату великогомілкових кісток у середньому на 20,18% ($p < 0,05$) і 19,81% ($p < 0,05$) для Ca і на 9,22% ($p > 0,05$) і 4,03% ($p > 0,05$) для P.

На 24-ту добу після ушкодження кістковий дефект був заповнений регенератом, у структурі якого визначалася ретикулофіброзна і пластинчаста кісткова тканина. На періостальній поверхні кістки у тварин другої серії можна бачити невідновлену заглибину від минулої травми, хоча у тварин першої і третьої серії межа дефекту слабо простежувалася. На поверхні кісткових трабекул розташовувалися остеобласти, а у складі пластинчастої кістки визначалися вторинні остеоцити з довгими відростками. У тварин другої серії ядра остеобластів були витягнутої форми, з просвітленим матриксом, конденсованим хроматином і ділянками лізису ядерної мембрани. Перінуклеарна ділянка цитоплазми була заповнена аморфними масами з низькою електронною щільністю, і в ній в основному були відсутні органели. У тварин зрілого віку мітохондрії були округлої форми, з деяким збільшенням кількості крист порівняно з попереднім терміном спостереження, а матрикс зберігав грубоволокнисту структуру. Також зустрічалися мітохондрії з кристами, які піддавалися лізису, а у щурів старечого віку кристи мітохондрій піддавалися тотальному лізису, їх матрикс був електроннопрозорим (рис. 5). Залишалися значно розширені цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулума, на його мембранах практично були відсутні рибосоми. Пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі був слабо

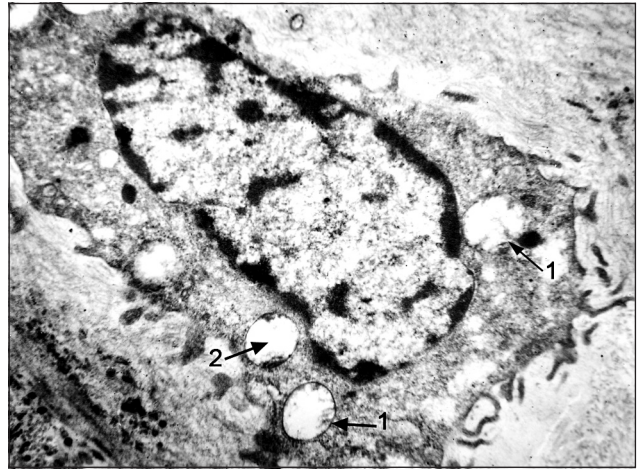


Рис. 5. Електроннограма. Ультраструктура остеобласта регенерату великогомілкової кістки щура старечого віку другої серії на 24-ту добу після ушкодження. Лізис крист мітохондрій (1) і просвітлення їхнього матриксу (2). Контрастування цитратом свинцю. Зб. $\times 27000$

розвинутий. У цитоплазмі дуже часто спостерігалися вторинні лізосоми і незначна кількість рибосом і полісом. Цитоплазматична мембрана утворювала короткі вирости. Матрикс основної міжклітинної речовини являв собою аморфну субстанцію середньої електронної щільності і містив колагенові волокна.

На фоні приймання діаліпону ядерна мембрана остеобластів була чітко оконтурована. Більша частина хроматину знаходилася в деконденсованому стані. Мітохондрії у тварин зрілого віку набували дрібнозернистого матриксу, оконтуровану зовнішню мембрану і велику кількість крист, а у тварин старечого віку мітохондрії залишалися набряклими, в них містився електроннопрозорий матрикс і невелика кількість крист. Пластинчастий цитоплазматичний комплекс Гольджі являв собою стопки паралельно орієнтованих мембран, які були оточені великою кількістю дрібних електроннопрозорих везикул. Цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки були сплюснені. На їх мембранах визначалася велика кількість рибосом.

Під час проведення рентгенівського мікроаналізу у тварин другої серії було відзначено ознаки порушення мінералізації регенерату великогомілкових кісток на 24-ту добу після перелому (див. таблицю). Їх прояв у щурів зрілого віку виявлявся у зменшенні кількості Ca з 34,82% (у контролі) до 28,27% (в експерименті) ($p < 0,05$), а також P з 14,84% до 11,95% ($p < 0,05$). У щурів старечого віку кількість Ca, який містився в кістковому регенераті великогомілкових кісток, складала 33,76%, а фосфору 14,17%, що на 15,5% ($p < 0,05$) було менше в першому і на 13,8% ($p < 0,05$) у другому випадку

від контрольних показників. На фоні використання діаліпону у тварин зрілого і старечого віку середня концентрація Са і Р у кістковій частині регенерату за даними рентгенівського мікроаналізу була на 19,91% ($p < 0,05$) і 12,26% ($p < 0,05$) більшою в першому і на 17,9% ($p < 0,05$) і 11,64% ($p < 0,05$) у другому випадку, ніж у тварин другої серії.

Висновки

В умовах техногенного мікроелементозу організму спостерігається затримка регенерації кісткової тканини.

Під впливом солей важких металів в ультраструктурі остеобластів спостерігаються дистрофічні і деструктивні зміни органел, які є більш вираженими у щурів старечого віку.

Потрапляння надлишкової кількості солей важких металів до організму щурів зрілого і старечого віку призводить до порушення мінералізації кісткової частини регенерату на всіх стадіях репаративного остеогенезу.

На фоні приймання діаліпону у тварин зрілого віку ультраструктурна організація остеобластів регенерату великогомілкової кістки набувала типової будови, що свідчить про високу метаболічну активність органел.

Вплив діаліпону на організм щурів старечого віку призводить до помірно вираженої активації процесів внутрішньоклітинного метаболізму остеобластів, відсутності деструктивних змін внутрішньоклітинних мембран і органел за умов збереження дистрофічних змін.

У разі використання антиоксиданту діаліпону остеорепаративні процеси перебігають більш інтенсивно, і в ділянці дефекту формується якісно мінералізована кісткова тканина.

Література

1. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеопатологии / Ю.И. Денисов-Никольский, С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, И.В. Матвейчук. — М.: Новости, 2005. — 336 с.
2. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Сумській області у 2006 році. — Суми: Джерело, 2007. — С. 8–21.
3. Батян А.Н. Основы общей и экологической токсикологии / А.Н. Батян, Г.Т. Фрумин, В.Н. Базылев. — СПб.: СпецЛит, 2009. — 352 с.
4. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации / Н.А. Корж, Н.В. Дедух // Ортопед. травматол. — 2006. — № 1. — С. 76–84.
5. Мазо В.К. Новые пищевые источники эссенциальных микроэлементов — антиоксидантов / В.К. Мазо, И.В. Гмошинский, Л.И. Ширина. — М.: Миклош, 2009. — 208 с.
6. Пис Й. Альфа-липовая кислота — универсальное средство против свободных радикалов, клеточного старения, загрязнения окружающей среды / Й. Пис; пер. с нем. — СПб.: ДИЛЯ, 2009. — 96 с.
7. Рустембекова С.А. Микроэлементозы и факторы экологического риска: для практикующих врачей / С.А. Рустембекова, Т.А. Барабошкина. — М.: Логос, 2006. — 112 с.
8. Токсикологическая химия / Т.В. Плетенева, Е.М. Саломатин, А.В. Сыроешкин и др.; под ред. Т.В. Плетенева. — М.: ГЭОТАР — Медиа, 2008. — 512 с.
9. Фомин Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. Энциклопедический справочник. / Г.С. Фомин. — 4-е изд. перераб. и доп. — М.: Протектор, 2010. — 1008 с.
10. Packer L. Alpha-Lipoic acid: The metabolic antioxidant / L. Packer, E.H. Witt, H.J. Tritschler // Free Radicals in Biology and Medicine 20. — 1996. — S. 625–626.
11. Praffly J.R. Lipoic Acid: The Antioxidant Chameleon / J.R. Praffly. — University of Iowa: 22.02.2001 (Artikel aus einem Review, ohne Quellenangabe).