

УДК 546.172.6:616.716.85-001-003.93:616.71-007.234]-092.9

ПОСТТРАВМАТИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ АЛЬВЕОЛЯРНОЙ КОСТИ И ЕЕ СВЯЗЬ С МЕТАБОЛИТАМИ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ У КРЫС

¹Желнин Е.В., ¹Звягинцева Т.В., ¹Кривошапка А.В.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, e-mail: tana_zv@list.ru

46 половозрелых крыс-самцов (линия WAG) были разделены на 3 группы: 1 группа интактные (n=8), 2 группа остеопороз, вызванный введением дексаметазона 1,675 мг/кг 1 раз в сутки внутримышечно в течение 2 недель (n=12), 3 группа (основная) – остеопороз + травма нижней челюсти (n=26). В 3 группе исследование проводили на 7, 14, 28 и 45 сут после травмы. Во всех группах проводили гистологические исследования альвеолярной кости и содержание общих метаболитов оксида азота и нитрит-аниона в крови. Установлено: развитие глюкокортикоидного остеопороза у крыс характеризуется нарушением процессов ремоделирования альвеолярной кости и сопровождается увеличением концентрации нитрит-аниона и снижением общих метаболитов NO в крови. Посттравматическая регенерация альвеолярной кости у крыс с глюкокортикоидным остеопорозом сопровождается увеличением общих метаболитов NO и нитрит-аниона в крови.

Ключевые слова: альвеолярная кость, посттравматическая регенерация, метаболиты оксида азота

POST-TRAUMATIC REGENERATION OF THE ALVEOLAR BONE AND ITS RELATION TO THE NITRIC OXIDE METABOLITES IN RATS WITH GLUCOCORTICOID OSTEOPOROSIS

Zhelnin Y.V., Zvyagintseva T.V., Kryvoshapka O.V.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, e-mail: tana_zv@list.ru

46 adult male rats (line WAG) were divided into 3 groups : Group 1 – intact (n = 8), group 2 – dexamethasone induced osteoporosis – 2 weeks of the 1,675 mg / kg 1 time a day intramuscular injection (n = 12), group 3 (basic) – osteoporosis + injury mandible (n = 26). In group 3 study was performed on 7th, 14th, 28th and 45 days after injury. In all groups histological studies of alveolar bone and the content of total nitric oxide and nitrite anion in the blood were was performed. Established: the development of the glucocorticoid osteoporosis in rats is characterized by impaired alveolar bone remodeling process and is accompanied by an increase of the nitrite anion and decrease total NO metabolites concentration in the blood. Post-traumatic regeneration of the alveolar bone in rats with glucocorticoid osteoporosis accompanied by the NO metabolites and the total nitrite anion increase in the blood.

Keywords: alveolar bone, posttraumatic regeneration, nitric oxide metabolites

При исследовании метаболитов оксида азота (NO) в крови после стандартной травмы нижней челюсти у крыс с нормально протекающими процессами ремоделирования альвеолярной кости и нарушенными вследствие введения дексаметазона мы обнаружили значительное отличие в метаболизме NO между группами [4]. На следующем этапе работы мы провели сопоставление морфологических процессов в альвеолярной кости после ее травматического повреждения (сквозной дырчатый дефект нижней челюсти) с метаболическими показателями крови, среди них с метаболитами NO, в различные стадии посттравматической регенерации и установили определенную взаимосвязь между ними [3]. В частности, чувствительным показателем перестройки и созревания костного регенерата оказался нитрит-анион. Это стало основой предположения о возможности использования метаболитов NO в качестве прогностического критерия течения посттравматического периода. Для

его подтверждения мы решили исследовать метаболиты NO при аналогичном травматическом повреждении нижней челюсти у крыс с остеопорозом.

Цель исследования. Сопоставить динамику морфологических процессов посттравматической регенерации альвеолярной кости с содержанием метаболитов NO в крови у крыс с остеопорозом, вызванным дексаметазоном.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на 46 половозрелых крысах-самцах линии WAG. Животные были разделены на 3 группы: 1 группа – интактные (n=8); 2 группа – остеопороз (n=12); 3 группа (основная) – остеопороз+травма нижней челюсти (n=26). Остеопороз в группах 2 и 3 моделировали введением дексаметазона из расчета 1,675 мг/кг 1 раз в сутки внутримышечно в течение 2 недель. Животным 3 группы наносили травматическое повреждение нижней челюсти в виде перфорационного (сквозного дырчатого) дефекта диаметром 2 мм [4]. Оперативное вмешательство осуществляли под общим наркозом (аминазин 10 мг/кг, кетамин 50мг/кг) в условиях асептики и антисептики. Эксперименты на животных

проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, законом Украины «О защите животных от жестокого отношения». Протокол экспериментов на животных и соответствие проведенных научных исследований современным требованиям биоэтики утверждены Комитетом по вопросам биоэтики Харьковского национального медицинского университета. Гистологические исследования альвеолярной кости с участком травматического дефекта были выполнены в соответствии с общепринятыми методами, руководствуясь рекомендациями Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова [8]. Морфометрию проводили по Г.Г. Автандилову [1]. Использовали окраску срезов гематоксилином и эозином, пикросириусом красным, что позволило определить степень зрелости коллагеновых волокон, а также исследование окрашенных срезов в поляризованном свете для выявления ориентационной упорядоченности коллагеновых структур и начала образования грубоволокнистых костных трабекул [9,10]. Во всех группах определяли содержание суммарных метаболитов NO и нитрит-аниона в крови [7]. У животных 3 группы эти показатели изучали в динамике на 7, 14, 28 и 45 сутки. Исполь-

зованные измерения и параметры были приведены в соответствии с международной системой единиц, а полученные цифровые данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики на персональном компьютере с использованием прикладных программ «Stadia-6».

Результаты исследования и их обсуждение

Прежде всего следует отметить, что еще до травмы под влиянием двухнедельного введения дексаметазона (2 группа) в альвеолярной кости происходят нарушения остеопоретического характера всех структурных компонентов челюсти, с наиболее выраженными проявлениями в компактной (рис. 1) и губчатой (рис. 2) костях. Исследование содержания общих метаболитов NO и нитрит-аниона у этих крыс показало, что под влиянием дексаметазона концентрация первых снижается, вторых – увеличивается по сравнению с интактными животными (рис 3 а,б).

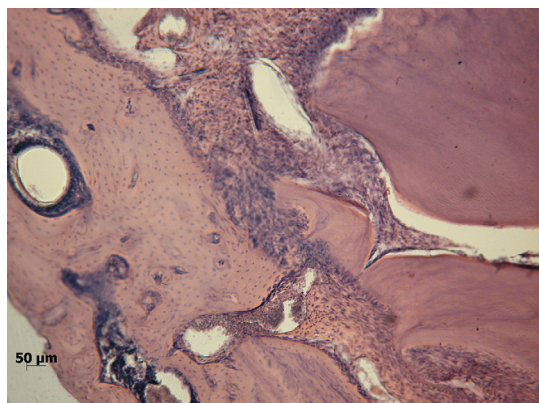


Рис. 1. Компактная кость с резорбционными полостями. Нарушение организации периодонта. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

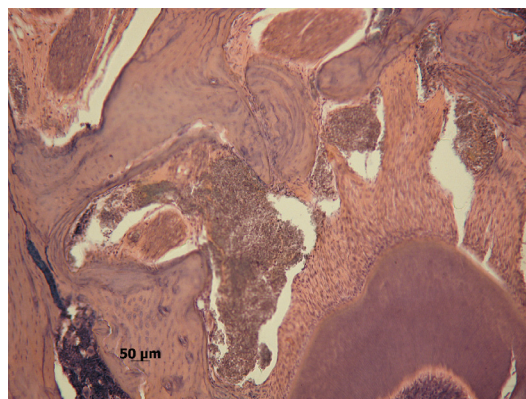


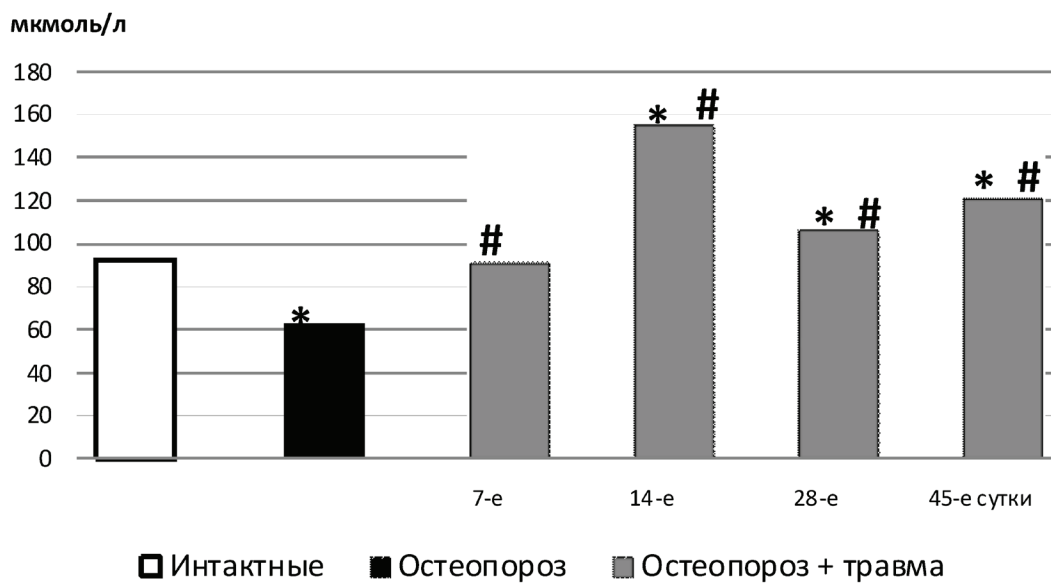
Рис. 2. Участок губчатой кости. Стенка альвеолы нарушена. Ткань периодонта в виде «язычков» располагается между фрагментами губчатой кости. Очаги клеточного дегенерата. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

На фоне остеопоретического повреждения альвеолярной кости происходят следующие нарушения процессов остеорепарации.

Через 7 дней после травмы отсутствует даже начальное формирование костных трабекул (рис. 4). Превалирует грануляционная ткань, в то время как при обычном течении процесса площадь фиброретикулярной тка-

ни более чем в 2 раза превышает площадь грануляционной [6]. Концентрация общих метаболитов NO увеличивается после травмы влиянием травмы в сравнении с обнаруженной до операции, но не выходит за пределы уровня интактных крыс (рис. 3а). Содержание нитрит-аниона увеличивается в 1,7 раза в сравнении с таковым до операции и превышает норму в 2,2 раза (рис. 3б).

а



б

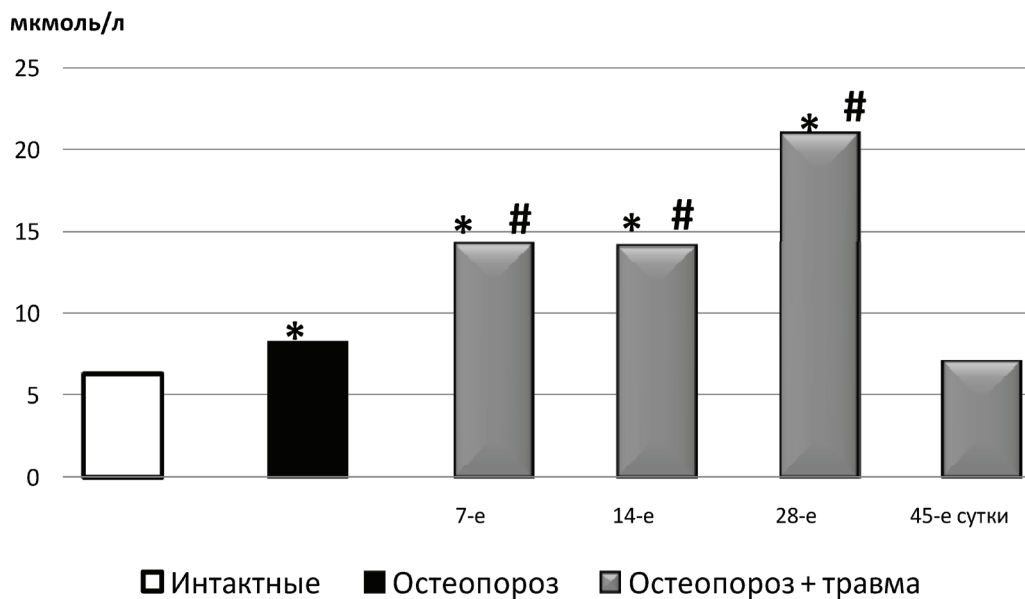


Рис. 3. Содержание общих метаболитов оксида азота (а) и нитрит-аниона (б) в сыворотке крови крыс с остеопорозом после травмы альвеолярной кости:

* – достоверно относительно 1 группы (интактные);

– достоверно относительно 2 группы (остеопороз)

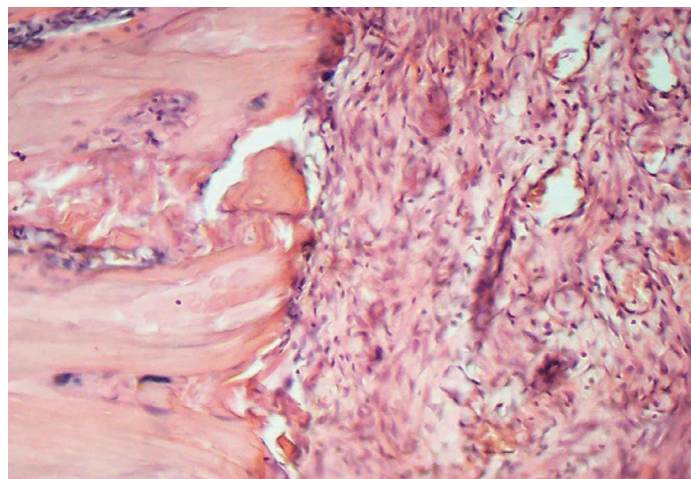


Рис. 4. Участок дефекта. Молодая грануляционная ткань. Низкая плотность клеток. Синусоиды. В материнской кости выраженные деструктивные изменения. 7 сутки. Гематоксилин и эозин. Ув. 100

О замедлении темпов репарации на 14 сутки свидетельствует наличие в регенератах кровяного сгустка, присутствие крупных территорий грануляционной ткани, превалирование тонких коллагеновых волокон при исследовании в поляризованном свете. В материнской кости, окружающей дефект, по-прежнему определялись значительные деструктивные изменения, аналогичные отмеченным на 7 сутки. Отсутствие гистологической динамики между 7 и 14 сутками после повреждения соответствует стабильному повышению нитрит-аниона в крови в эти же сроки. Концентрация общих метаболитов NO достигает максимума.

Через 28 суток отставание процессов посттравматической регенерации альвеолярной кости проявилось в значительном замедлении перестройки грануляционной ткани, очаги которой выявляются даже в этот срок. При обычном течении процесса грануляционная ткань отсутствует уже на 14 сутки [6]. При исследовании препаратов в поляризованном свете также обнаружено замедление процесса коллагенообразования и формирования зрелых пучков коллагеновых волокон. Морфометрические исследования обнаружили замедление нарастания массы коллагеновых волокон в формирующемся регенерате. Ориентационная упорядоченность, формирование коллагеновых волокон и их пучков нарушена.

В материнской кости вблизи дефекта, а также в губчатой кости тела челюсти сохранились отмеченные на предыдущий срок деструктивные изменения. Что касается метаболитов NO, то концентрация нитрит-аниона в крови достигает максимума.

Уровень общих метаболитов NO снижается по сравнению с 14 сутками, но остается выше по сравнению с 1 и 2 группой.

Через 45 суток у животных основной группы регенерат узкий, представлен губчатой, а не пластинчатой, как при обычной посттравматической регенерации альвеолярной кости, костной тканью с расширенными межтрабекулярными пространствами, заполненными фиброретикулярной тканью. Исследования в поляризованном свете подтвердили низкую зрелость регенерата и различную зрелость костных трабекул. Содержание общих метаболитов NO по-прежнему превышает как норму, так и показатели 2 группы (остеопороз), содержание нитрит-аниона достоверно не отличается от показателей 1 и 2 группы (рис. 3 а,б).

Таким образом, сопоставление результатов морфологических исследований динамики посттравматической регенерации альвеолярной кости, происходящей на фоне глюкокортикоидного остеопороза, и метаболитов NO в крови показывает, что нарушение процессов остеорепарации находит отражение в изменениях содержания метаболитов NO в крови. Несмотря на отмеченное снижение содержание общих метаболитов NO под влиянием дексаметазона, их концентрации в дальнейшем (после травмы) быстро нарастают. Кроме того, при снижении общих метаболитов NO под влиянием дексаметазона, концентрация нитрит-аниона превышает норму. В динамике заживления концентрация этого метаболита прогрессивно растет, что представляет опасность в связи с образованием токсич-

ного пероксинитрита. Чрезмерное нарастание метаболитов NO расценивается как формирование вторичного иммунодефицитного состояния [2], ведет к угнетению обмена веществ в костной ткани, угнетает рост и дифференцировку остеобластов [5].

Выводы

Развитие глюкокортикоидного остеопороза у крыс характеризуется нарушением процессов ремоделирования альвеолярной кости и сопровождается увеличением концентрации нитрит-аниона и снижением общих метаболитов NO в крови.

Посттравматическая регенерация альвеолярной кости у крыс с глюкокортикоидным остеопорозом сопровождается увеличением общих метаболитов NO и нитрит-аниона в крови.

Авторы выражают сердечную благодарность за консультативную помощь в настоящем исследовании заведующей лабораторией морфологии соединительной ткани ГУ «Институт патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка АМН України» доктору биологических наук профессору Дедух Нинель Васильевне.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Бондарь Т.Н. Система L-аргинин/оксид азота и иммунитет // Экспериментальна і клінічна медицина. 2009. № 3. С. 4–8.
3. Гулюк А.Г., Желнин Е.В. Взаимосвязь маркеров остеогенеза и процессов посттравматической регенерации альвеолярной кости у крыс // Фундаментальные исследования. 2013. №7, Часть 3. С. 534-539.
4. Гулюк А.Г., Желнин Е.В. Метаболиты оксида азота при посттравматической регенерации альвеолярной кости у крыс в условиях введения дексаметазона // Вісник стоматології. 2013. №2 (83). С. 19-22.
5. Должкова К. П. NO-залежні механізми регенерації кісток нижньої щелепи за умов надходження в організм нітрату натрію : Автореф. дис. канд. мед. наук. – Харків, 2011. – 20 с.
6. Желнин Е.В. Морфологические особенности посттравматической регенерации альвеолярной кости в эксперименте. Український морфологічний альманах. 2012. Т. 10, № 3. С. 35-38.
7. Покровский М.В., Метельская В.А., Артюшкова Е.Б. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови экспериментальных животных // Актуальные вопросы фармакологии и фармации : сборник трудов межвузовской научной конференции, посвящённой памяти профессора В.В.Пичугина и 75-летию КГМУ (Курск, 25 декабря 2009 г.) – Курск, 2009. – С. 255–257.
8. Саркисов Д.С., Перова Ю.Л. Микроскопическая техника. – М.: Медицина, 1996. 542 с.
9. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions / B.L. Figueiredo, G. P. Sampio, C. Ricardo et al. // Micron. 2007. Vol.38, № 6. P. 580-583.
10. Li X.J., Lei T., Gao J.H. Detection of collagens in hypertrophic scars by picrosirius polarization method // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2002. Vol. 422, №3. P. 217-219.