



ПОВЕРЖАЮ

Проректор по научной работе

А.Н. Черноус

2013 р.

**Промежуточный отчет №4
от 26.09.2013
к договору № 62.21.01-02.13.СП**

**Применения пасты из плодов черники
для профилактики остеопороза**

В настоящее время существует несколько методик моделирования остеопороза у лабораторных животных. Наиболее распространенной является методика стероидного остеопороза, которая позволяет быстро и эффективно вызвать нарушения строения и функции костной ткани, которые сопоставимы с клинической картиной остеопороза. Воздействия глюкокортикоидов на костную ткань, которые способствуют развитию остеопороза это:

- подавление пролиферации, дифференциации и функциональных возможностей остеобластов;
- усиление апоптоза остеобластов;
- стимуляция активности остеокластов;
- снижение абсорбции кальция в кишечнике;
- усиление экскреции кальция с мочой;
- увеличение секреции паратгормона;
- уменьшение секреции кальцитонина;
- уменьшение количества участков обновления костной ткани;
- образование участков асептического некроза костной ткани;
- увеличение синтеза коллагеназ;
- уменьшение синтеза кортикотропина и гонадотропина.

А.Н. Черноус

Кроме того глюкокортикоиды приводят к увеличению чувствительности остеобластов к паратиреоидному гормону (ПТГ, паратгормон) и к активной форме витамина D, снижению синтеза простагландина E и локального синтеза инсулин-подобного фактора роста (IGF)-I а также оказывают влияние на протеины, связывающиеся с IGF.

Учитывая вышеизложенное, методом моделирования остеопороза в нашем эксперименте был выбран «стероидный остеопороз». В эксперименте было задействовано 160 белых крыс самцов возрастом 22 месяца, которые были разделены на 4 группы.

Первую группу составляли интактные животные (40 крыс-самцов), для проведения корректного сравнительного анализа. Данная группа животных содержалась в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе (гранулированный корм).

Вторую группу животных (40 крыс-самцов) составляли крысы, находящиеся на обычном пищевом рационе, которым моделировали остеопороз ежедневным внутрибрюшинным введением гидрокортизона в дозе 40 мг/кг в течении 28 дней.

Третьей группе животных дополнительно в пищу вносили кальций из расчета 100 мг в сутки для профилактики развития остеопороза.

Четвертую группу крыс старческого возраста составляли животные, которым параллельно с моделированием остеопороза и диетой с избытком кальция ежедневно перорально вводили 2 г пасты из плодов черники для выявления возможности профилактики нарушения функции костной ткани.

После окончания моделирования остеопороза крыс выводили из эксперимента путем передозировки кетамина (70 мг/кг) и выделяли 3-и поясничные позвонки для оценки состояния губчатой костной ткани. Оценка морфофункционального состояния костной ткани проводилась с использованием следующих методов:

1. Гистология

Для приготовления гистологических препаратов выделяли поясничный позвонок с последующей его фиксацией в 10% растворе нейтрального формалина в течение суток и декальцинации в 5% растворе азотной кислоты в течение двух суток. Декальцинированные образцы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (60 – 70 – 96 – 100) и заливали в парафин. Готовили гистологические срезы толщиной 5-7 мкм и окрашивали их гематоксилин-эозином. Полученные препараты изучали с помощью светового микроскопа "OLYMPUS".

2. Растровая электронная микроскопия с рентгеновским микроанализом

Кость фиксировали в 1,25% растворе глутаральдегида течение 1 суток с дофиксацией в 1% растворе осмия и обезвоживанием в спиртах возрастающей концентрации (50 - 70 - 80 - 90 и 100%). Полученные образцы заливали в смесь смол «Эпон-аралдит». После полимеризации смолы проводили срединный разлом позвонка. Для улучшения визуализации подготовленную поверхность напильяли серебром в стандартной вакуумной установке ВУП-5.

3. Атомно-абсорбционная спектрофотометрия кости

Кость взвешивали с точностью до 0,001 г, сжигали в муфельной печи при температуре 450⁰С для удаления органической матрицы. После получения пепла проводили его растворения в смеси соляной (2 мл) и азотной (1 мл) кислот и доводили объем раствора до 10 мл бидистиллированной водой . Полученный раствор анализировали на спектрофотометре С115 -М1 с пламенным и электротермическим атомизатором . Выбор метода атомизации основывался на концентрации элемента в растворе. Перед определением каждого элемента строили калибровочный график, используя стандартные

растворы элементов (ГСОПМ) . При калибровке использовали не менее четырех известных концентраций. После проведения процедуры определения содержания элемента в растворе вводили массу образца и получали концентрацию элемента в 1 грамме исследуемой ткани. Измерения и расчеты проводили с использованием программы AAS - SPECTR .

4. Изучение микротвердости костной ткани и прочностных свойств кости

Изучение микротвердости проводили на приборе ПМТ-3. Перед проведением исследования поверхность кости шлифовали и фиксировали образец на металлическом столике с помощью эпоксидных смол. Для определения микротвердости в исследуемый образец под действием нагрузки P вдавливалась алмазная пирамида. В наших опытах величина нагрузки составила 0,1 кгс. После воздействия нагрузки на поверхности образца остается отпечаток в виде пирамиды с квадратным основанием. Для определения числа твердости H (кгс/мм²) нагрузки P делят на условную площадь боковой поверхности отпечатка:

$$HV = 18544\left(\frac{P}{d^2}\right),$$

где P - нагрузка на пирамиду; d - диагональ отпечатка.

Для исследования прочностных свойств выделяли поясничный позвонок и проводили определение прочности на разрыв и сжатие. Для определения зависимости между силой прочности на растяжение и прочности на сжатие использовали специальную установку (рис. 1), с помощью которой определялись внутренние продольные силы костей (P , кгс) через воздействие на них внешних сил. Предел прочности костей на разрыв и сжатие по закону Гука определяется по формуле

$$\sigma = \frac{P}{S}, \text{ где } \sigma - \text{напряжение, при котором разрушается кость, } \frac{\text{кгс}}{\text{мм}^2}, P -$$

сила, приведшая к разрушению кости, кгс; P - площадь поперечного сечения кости, $мм^2$.

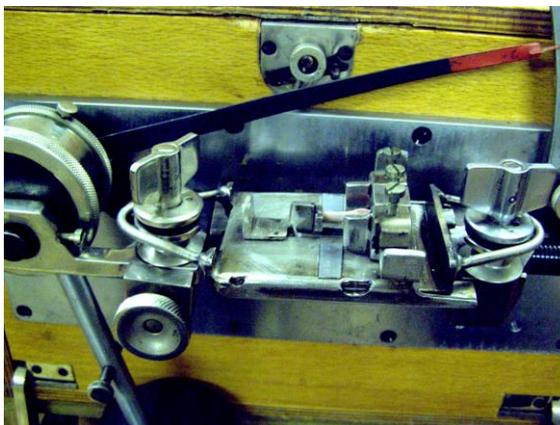


Рис. 1. Устройство для определения силы разрушения кости на разрыв и сжатие.

5. Статистический метод

Полученные цифровые данные обрабатывались статистически на персональном компьютере с использованием программы «АТЕСТАТ» для MS EXEL. Достоверность различия экспериментальных и контрольных данных оценивали с использованием критерия Стьюдента, достоверной считали вероятность ошибки, которая меньше или равна 5% ($p \leq 0,05$).

Результаты

Введение животным гидрокортизона в течении 28 дней приводит к развитию выраженного остеопороза, проявления которого отчетливо прослеживаются при анализе гистологических препаратов поясничных позвонком. Обращает на себя внимание резкое сужение трабекул губчатой костной ткани, которое визуализируется во всех полях зрения. Отличительной особенностью трабекул кости экспериментальных животных является наличие большого количества конусов ремоделирования, что при снижении общего количества остеобластов свидетельствует о преобладании процессов резорбции над синтезом (рис. 1).

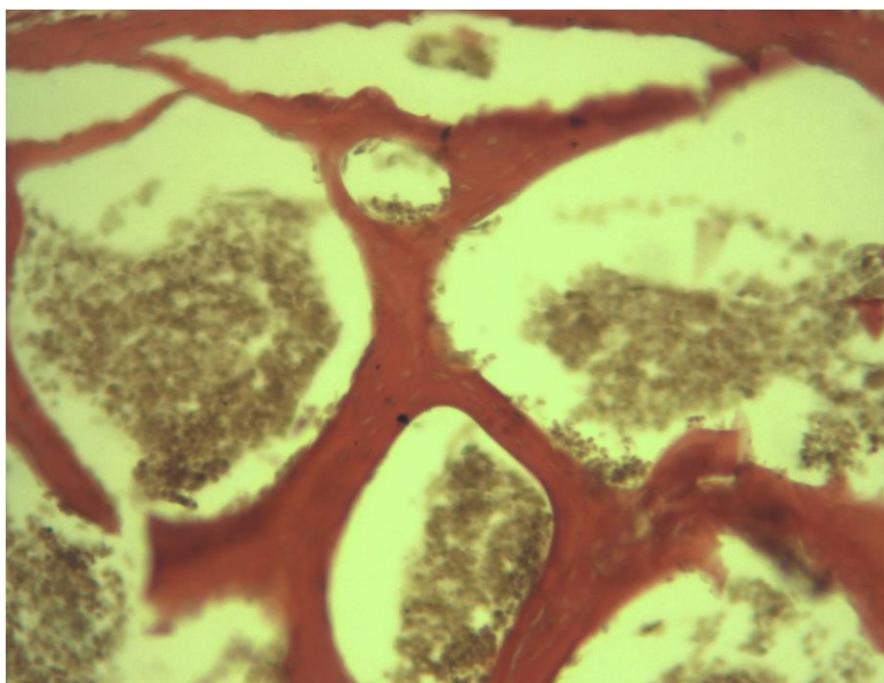


Рисунок 1 Губчатое вещество поясничного позвонка крысы после 28 дней введения гидрокортизона. Окраска – гематоксилин-эозин. Ув. 200

Трабекулы губчатого вещества мозаично окрашены, что является признаком неравномерной кальцификации вследствие потери минеральной составляющей костной ткани. Часть трабекул имеют краевые узуры, что является следствием остеокластической резорбции костной ткани. В глубине трабекул визуализируются пустующие остеоцитарные лакуны. Проводя анализ губчатого вещества, обращает на себя внимание снижение

относительной площади трабекул и расширение межтрабекулярного пространства, что является основным признаком развития остеопоротических изменений в костной ткани.

Исследование костной ткани поясничного позвонка методом растровой электронной микроскопии позволяет подтвердить результаты гистологического исследования. Трабекулы губчатого вещества истонченные, межтрабекулярное пространство расширено. На поверхности трабекул визуализируются микротрещины в продольном и поперечном направлении, что свидетельствует о снижении прочностных свойств и может быть предиктором развития спонтанных переломов (рис. 2).

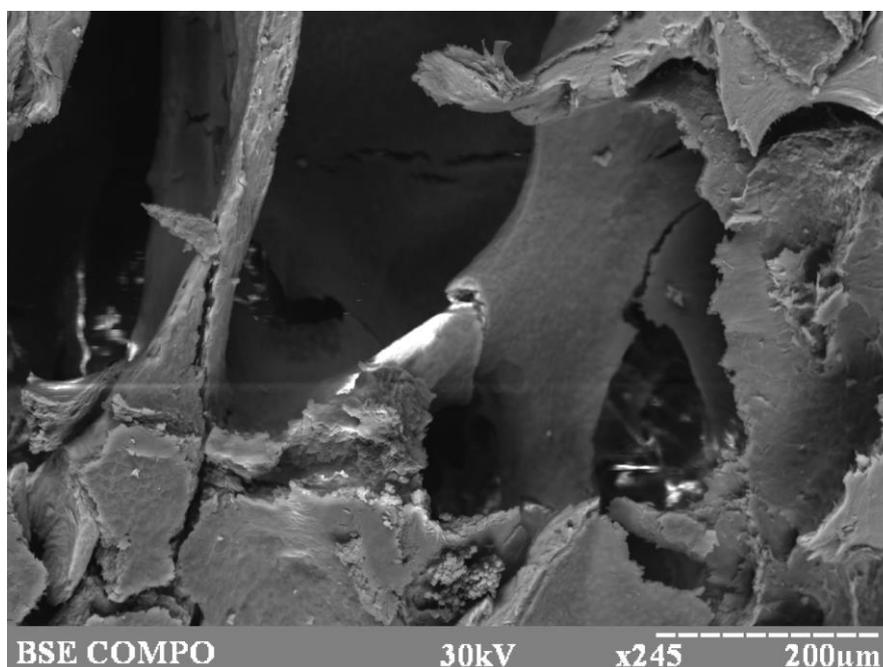


Рисунок 2. Растровая электронная микроскопия поясничного позвонка крысы после 28 дней введения гидрокортизона.

Рентгеновский микроанализ поверхности трабекул показал снижение уровня кальция в костной ткани с 23,54 в% в контрольной группе до 18,65 в% при моделировании остеопороза. Содержание фосфора снижается с 13,87 в% до 11,13 в%, что свидетельствует о нарушении минерализации коллагенового матрикса кости.

Изучение микроэлементного состава поясничного позвонка позволило выявить дефицит некоторых элементов, что при сопоставлении с результатами рентгеновского микроанализа свидетельствует о тотальном нарушении минеральной составляющей костной ткани. Так, наблюдается снижение уровня марганца с 7,94 мг/г до 6,58 мг/г, магния – с 12,7 мг/г – до 10,23 мг/г, меди – с 24,7 мг/г – до 19,3 мг/г и железа с 6,8 мг/г – до 4,2 мг/г.

Нарушение минеральной составляющей костной ткани приводит к снижению микротвердости костных трабекул у крыс старческого возраста с $151,37 \pm 0,39$ кгс/мм² до $123,37 \pm 0,15$ кгс/мм², что также является пре диктором развития переломов. Прямым признаком снижения прочностных свойств кости является падения удельной прочности кости на разрыв с $3,8 \pm 0,05$ кгс/мм² до $3,4 \pm 0,12$ кгс/мм². При этом в большей степени происходит нарушение прочности при сжимающем усилии – прочность на сжатие снижается с $11,12 \pm 0,07$ кгс/мм² до $9,94 \pm 0,07$ кгс/мм², что является критическим уровнем для костной ткани и может привести к спонтанным компрессионным переломам тел позвонков.

Таким образом, моделирование остеопороза путем введения животным гидрокортизона приводит к нарушению пространственной структуры кости с увеличением межтрабекулярного пространства и уменьшением площади костной ткани. Одновременно развивается минеральный дефицит, который затрагивает не только фосфорно-кальциевый обмен, но и микроэлементную составляющую костной ткани. Вышеперечисленные изменения приводят к снижению прочностных свойств как костной ткани (микротвердость), так и кости как органа в целом.

Применение диеты, богатой кальцием не приводят к существенному улучшению строения и функции костной ткани у экспериментальных животных. На гистологических препаратах отмечается наличие суженных костных трабекул и увеличение количества конусов ремоделирования. При этом положительным фактом является снижение мозаичности окраски кости, что может быть следствием снижения потери кальция. Как и у животных

экспериментальной серии наблюдается снижение количества остеобластов на фоне увеличения площади лакун остеокластической резорбции.

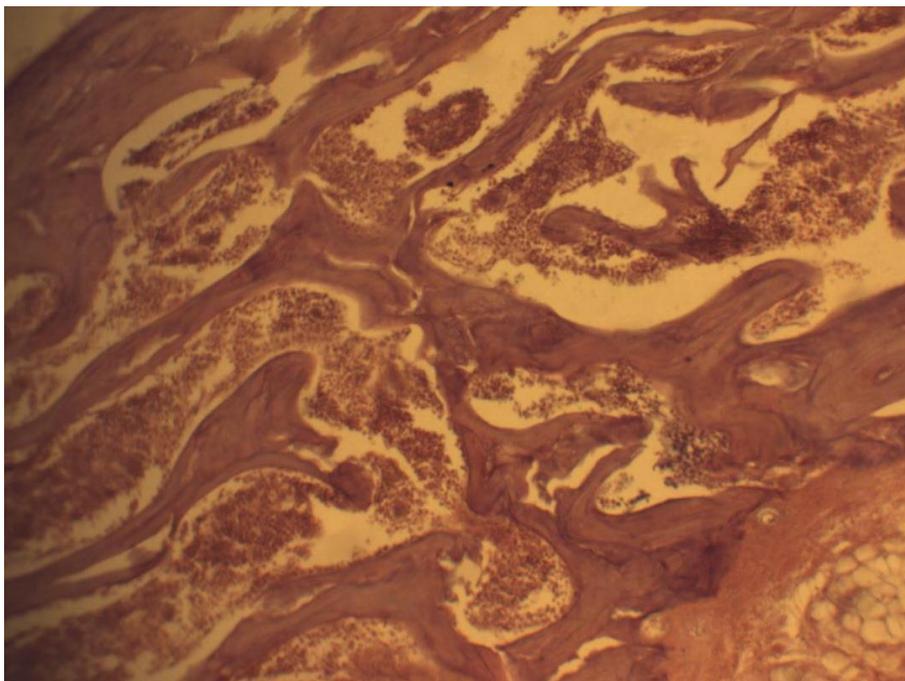


Рисунок 3 Губчатое вещество поясничного позвонка крысы после 28 дней введения гидрокортизона и использования диеты. Окраска – гематоксилин-эозин. Ув. 200

Растровая электронная микроскопия показала наличие суженных трабекул и расширение межтрабекулярного пространства. Даже наличие избытка кальция в диете не приводит к снижению количества микротрещин и разломов в костных трабекулах. Уровни кальция и фосфора, выявленные методом рентгеновского микроанализа не показали существенного увеличения уровня элементов на поверхности трабекул. Содержание кальция и фосфора составляет соответственно 19,87 в% и 12,04 в%, что незначительно превышает уровень эксперимента, но остается значительно ниже контрольных показателей.

Экзогенное введение кальция не приводит к нормализации микроэлементного гомеостаза костной ткани. Уровни исследуемых микроэлементов составляют 6,89 мг/г, 10,09 мг/г, 18,79 мг/г и 4,4 мг/г, что значительно ниже контрольных показателей.

Увеличение содержания кальция в костных трабекулах приводит к незначительному увеличению показателя микротвердости до $136,12 \pm 0,09$ кгс/мм², оставаясь меньше контроля на 10,08% ($p \leq 0,05$). Прочностные свойства поясничного позвонка в целом остаются на уровне результатов эксперимента и составляют $3,56 \pm 0,12$ кгс/мм² для растяжения и $10,2 \pm 0,28$ кгс/мм² – для сжатия.

Таким образом, применение для профилактики остеопороза диеты оказалось неэффективным и привело лишь к незначительному увеличению содержания кальция в костной ткани не повлияв на обмен микроэлементов и прочностные параметры позвонков.

Введение в рацион лабораторных животных пасты из плодов черники на фоне диеты, богатой кальцием привело к улучшению большинства исследуемых параметров.

Гистологические исследования показали наличие незначительного снижения толщины костных трабекул и расширения межтрабекулярного пространства. Влияние гидрокортизона на метаболизм костной ткани незначительно нивелируется, о чем свидетельствует снижение количества конусов ремоделирования и увеличение количества остеобластов как на поверхности, так и в толще костных трабекул. При этом отмечаются единичные узурсы по краям костных балочек и наличие мозаичности окрашивания (рис. 4). Количество лакун остеокластической резорбции также снижено по сравнению с экспериментальной группой животных.

Растровая электронная микроскопия показала незначительное снижение толщины трабекул на поверхности которых наблюдается формирование единичных микротрещин, преимущественно продольного направления (рис. 5). Микропереломы трабекул отсутствуют, что является косвенным признаком повышения прочностных свойств костной ткани.

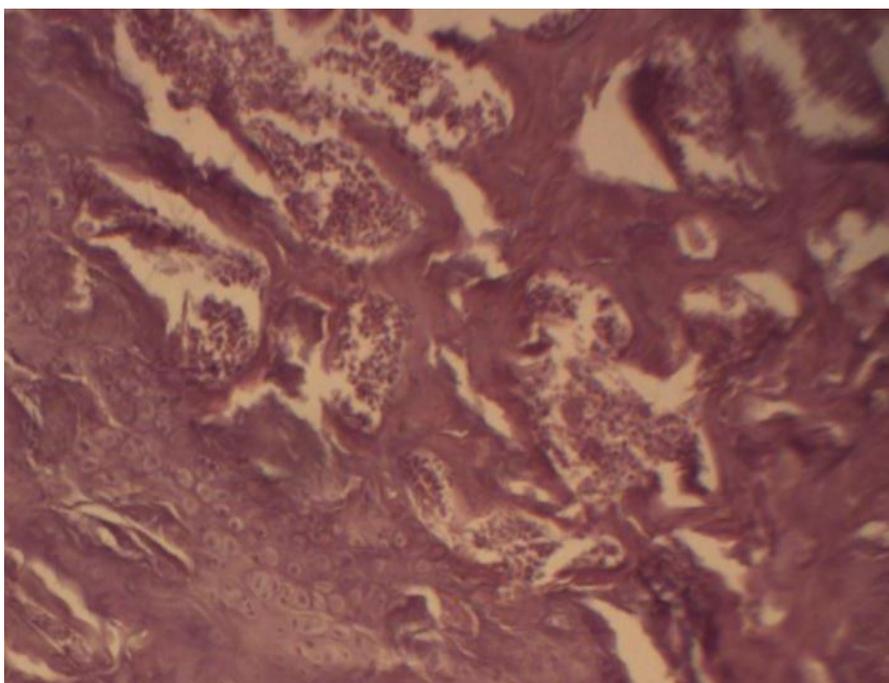


Рисунок 4 Губчатое вещество поясничного позвонка крысы после 28 дней введения гидрокортизона и пасты из плодов черники. Окраска – гематоксилин-эозин. Ув. 200

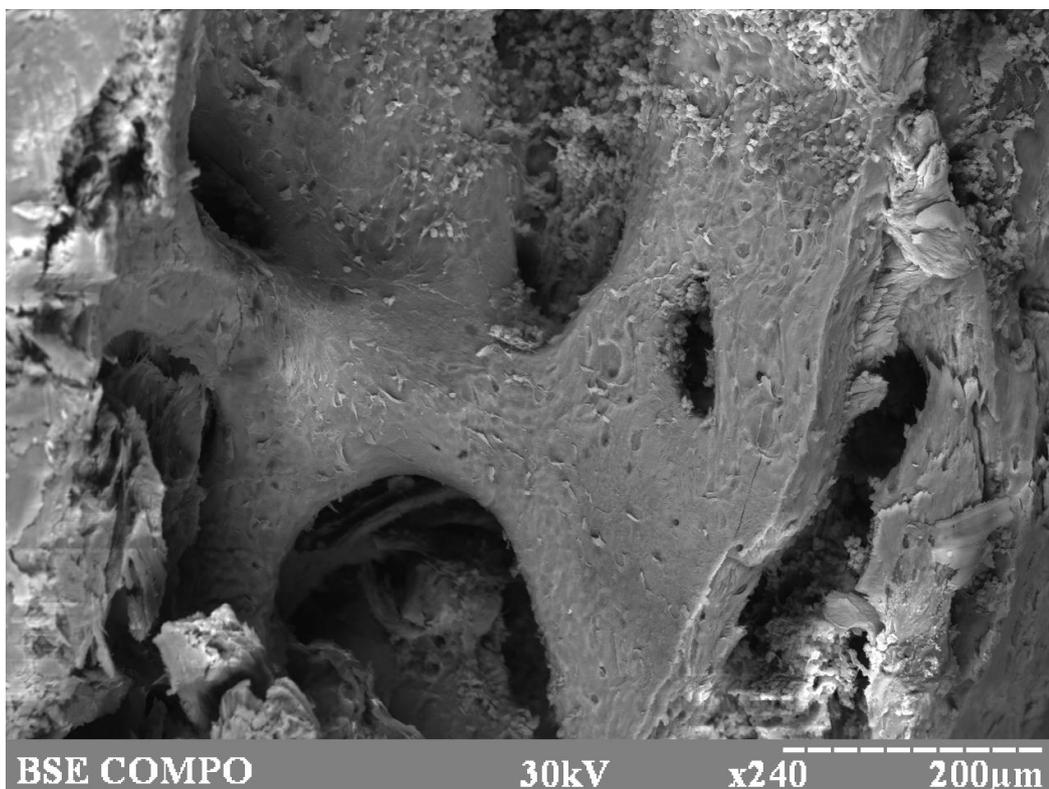


Рисунок 5. Растровая электронная микроскопия поясничного позвонка крысы после 28 дней введения гидрокортизона и пасты из плодов черники.

Наиболее значительные изменения констатируются при проведении рентгеновского микроанализа поверхности костных трабекул губчатого вещества поясничных позвонков (рис. 6). Так весовое содержания кальция на поверхности трабекул составляет 22,14 в%, что лишь на 5,95% ($p \leq 0,05$) меньше уровня контроля. Уровень фосфора недостоверно отличается от контроля и составляет 12,75 в%.

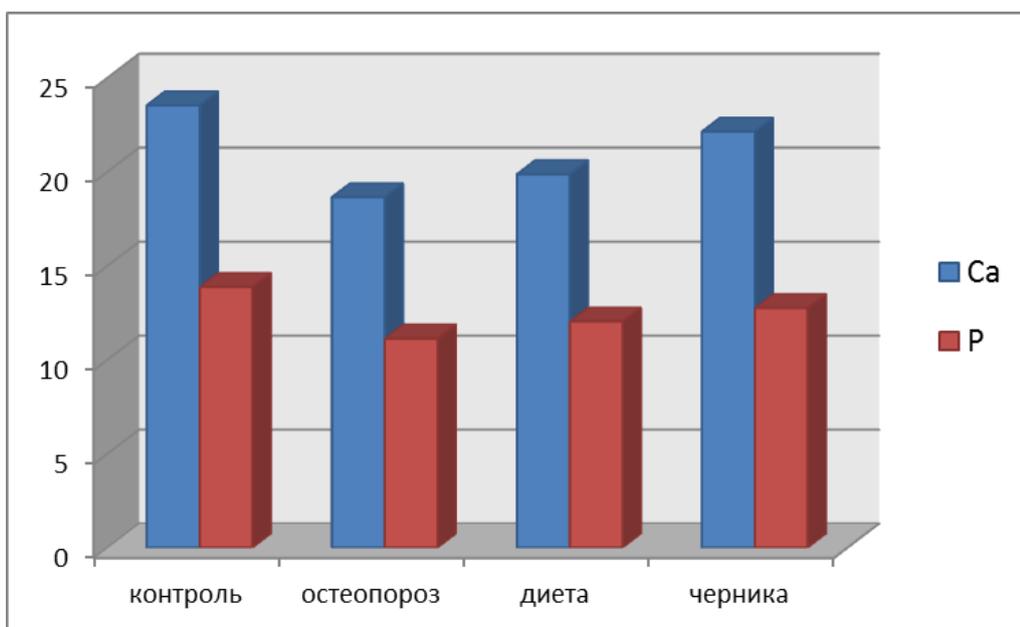


Рисунок 6. Результаты рентгеновского микроанализа поверхности трабекул поясничных позвонков животных контрольной и экспериментальной серии.

Проведение атомно-абсорбционного анализа костной ткани показало практически полную нормализацию микроэлементной составляющей органа (рис. 7). Разница с контролем наблюдается только для магния и железа и составляет соответственно 7,45% ($p \leq 0,05$) и 6,92% ($p \leq 0,05$). Уровень марганца и меди составляет соответственно 7,46 мг/г и 24,12 мг/г (рис. 6). Содержание микроэлементов в костной ткани является критически необходимым для функционирования клеток кости и обеспечения процессов кристаллообразования. Как известно, медь является абсолютно необходимым фактором для инициации образования ядра гидроксиапатита и даже

незначительное снижение ее уровня в кости может привести к нарушениям процессов минерализации органического матрикса. Высокое содержание микроэлементов в активной форме в пасте из плодов черники приводит к профилактике нарушения минерального гомеостаза и как следствие – предупреждению развития выраженного остеопороза у экспериментальных животных.

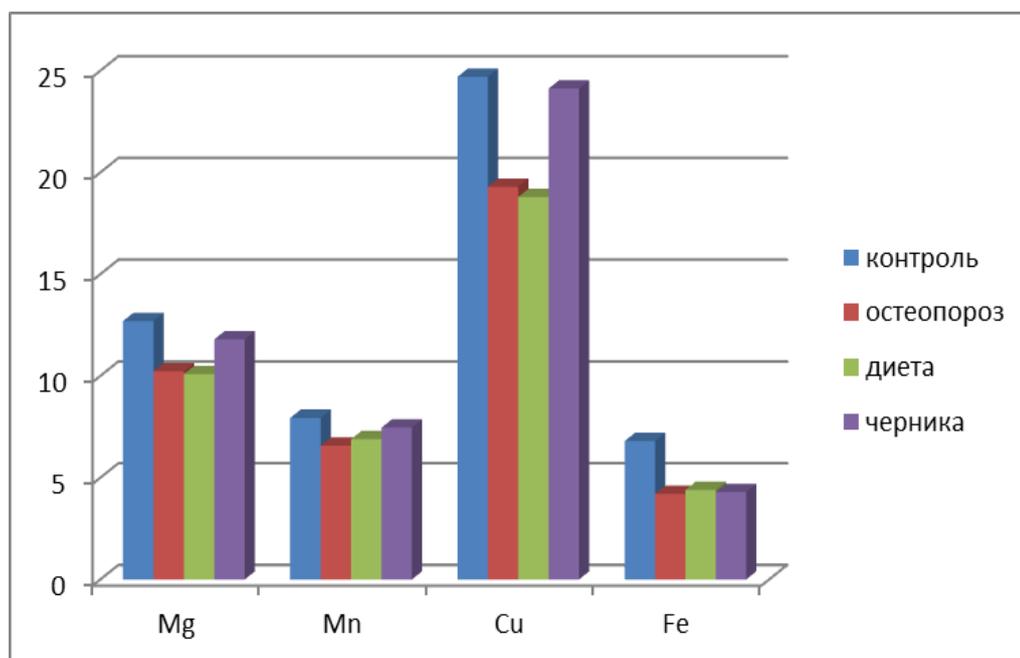


Рисунок 7. Микроэлементный состав поясничных позвонков животных контрольной и экспериментальной серии.

Значительное улучшение минеральной составляющей костной ткани приводит к улучшению прочностных параметров (рис. 8). Так показатель микротвердости костной ткани возрастает до $143,65 \pm 0,24$ кгс/мм², оставаясь меньше контрольных параметров всего лишь на 5,27% ($p \geq 0,05$). Параметры прочности поясничного позвонка возрастают, что более справедливо для прочности на разрыв, которая практически не изменяется и составляет $3,7 \pm 0,04$ кгс/мм². Данный параметр имеет прямую зависимость от эластичной составляющей костной ткани и нормализация микроэлементного гомеостаза может способствовать протектированию коллагена от воздействия гидрокортизона. Прочность на сжатие, которая имеет прямую

корреляцию с минеральной составляющей снижена в сравнении с контролем на 6,03% ($p \leq 0,05$) и составляет $10,45 \pm 0,28$ кгс/мм². При этом мы наблюдаем значительную разницу с показателями животных, находящихся на диете с высоким содержанием кальция.

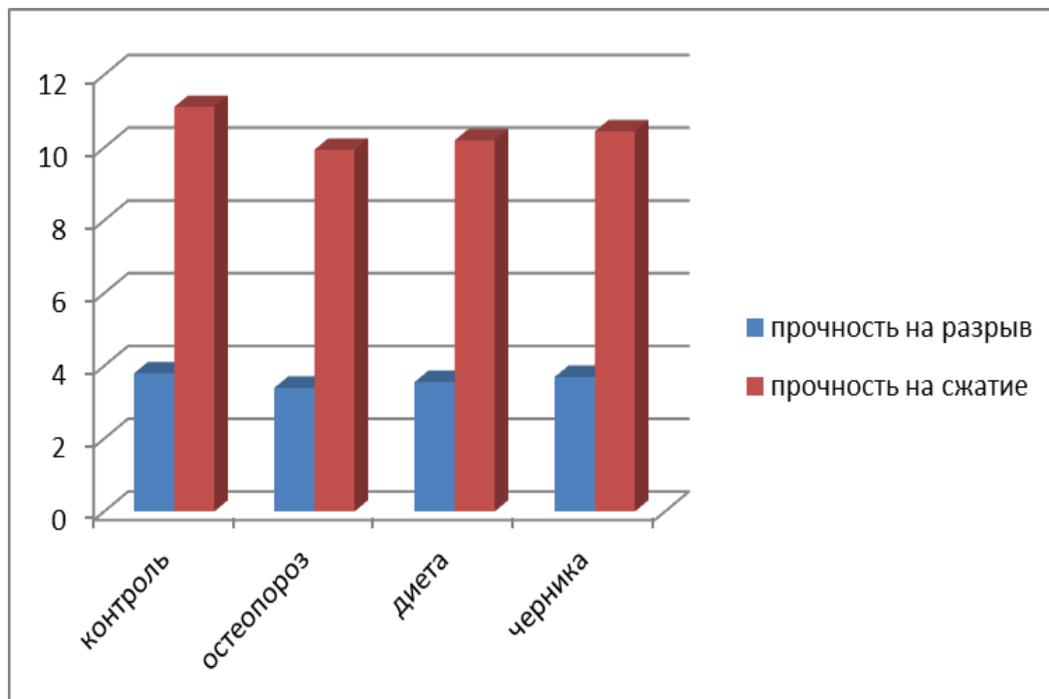


Рисунок 8. Параметры прочности поясничных позвонков животных контрольной и экспериментальной серии.

Таким образом, введение в диету пасты из плодов черники приводит к профилактике развития остеопороза, что может быть обусловлено усилением всасывания кальция в кишечнике и его транспорта в костную ткань, нормализацией микроэлементного метаболизма кости, что в свою очередь способствует нормализации межклеточной кооперации и улучшению кристаллообразования