

УДК [612.359:612.398.192:616.718.5/6-001.5]-092.9

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ СМЕСИ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОСУДИСТЫХ КОМПОНЕНТОВ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ЛИНИИ СВА ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРЕЛОМА КОСТЕЙ ГОЛЕНИ

¹Очеретина Р.Ю., ¹Стогов М.В., ²Мкртчян О.З., ³Высокогорский В.Е.

¹Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, e-mail: rufoch@mail.ru;

²Омский государственный педагогический университет Минобрнауки РФ, Омск;

³Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Омск, e-mail: vve-bio@mail.ru

В работе исследовано действие смеси аминокислот (L-аргинин, L-метионин, L-лейцин, L-изолейцин в равных весовых соотношениях) в качестве добавки к рациону у экспериментальных групп мышей после перелома костей голени на различных этапах восстановительного периода. Изучены морфометрические показатели сосудистых компонентов (центральные вены, междольковые артерии и вены, синусоидные капилляры, желчные протоки) мышей разных экспериментальных групп: 1 – контроль, 2 – после перелома голени, 3 – после перелома голени на фоне обедненного белком питания, 4 – после перелома голени на фоне обедненного белком питания с применением смеси аминокислот. Использование в качестве добавки аминокислотной смеси приводило к меньшему увеличению диаметра центральных вен и синусоидных капилляров печеночной доли, а диаметр междольковых артерий был сужен в меньшей степени, чем у других экспериментальных групп. Таким образом, применение аминокислотной смеси в качестве добавки к корму в посттравматическом периоде имело позитивное значение.

Ключевые слова: перелом костей голени, сосуды печени, морфометрия, аминокислотная смесь

THE EFFECT OF AMINO ACID MIXTURE ON THE MORPHOMETRIC PARAMETERS OF VASCULAR COMPONENTS IN CBA MICE LIVER AFTER AN EXPERIMENTAL LEG BONE FRACTURE

¹Ocheretina R.I., ¹Stogov M.V., ²Mkrtchan O.Z., ³Vysokogorskii V.E.

¹Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, e-mail: rufoch@mail.ru;

²The Omsk State Pedagogical University of the RF Ministry of Education and Science, Omsk;

³The Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, e-mail: vve-bio@mail.ru

The work deals with studying the effect of the mixture of amino acids (L-arginine, L-methionine, L-leucine, L-isoleucine in equal weight ratios) as dietary supplements in experimental groups of mice after leg bone fractures at the different stages of restorative period. The morphometric parameters of vascular components (central veins, interlobular arteries and veins, sinusoidal capillaries, biliary ducts) studied in the mice of different experimental groups: 1 – control, 2 – after fracture of the leg, 3 – after fracture of the leg through protein-impooverished food, 4 – after fracture of the leg through protein-impooverished food when the amino acid mixture used. The use of the amino acid mixture as a supplement led to the less decrease in the diameter of central veins and sinusoidal capillaries of the liver lobule, and the diameter of interlobular arteries was less narrowed than in the other experimental groups. Thus, the use of the amino acid mixture as a food supplement in the posttraumatic period was of positive importance.

Keywords: leg bone fracture, liver vessels, morphometry, amino acid mixture

Травматические повреждения опорно-двигательного аппарата сопровождаются изменениями системы кровообращения [3], наблюдаются расстройства микроциркуляции в печени, что проявляется существенными изменениями морфометрических показателей сосудов печеночного ацинуса до 28 суток наблюдений [5]. Длительный срок нарушений микроциркуляции в печени вызывает необходимость поиска средств, стимулирующих восстановление структуры и функции печени после перелома костей.

На основании данных о биологической, анаболической активности отдельных аминокислот [2, 4, 8, 9, 10] предложена композиция из четырех аминокислот для лече-

ния переломов костей в посттравматическом периоде [6].

Цель исследования – охарактеризовать морфометрические параметры сосудов печеночного ацинуса в посттравматический период при использовании в качестве пищевой добавки композиции четырех аминокислот (L-аргинин, L-метионин, L-лейцин, L-изолейцин)

Материалы и методы исследования

В эксперименте использованы 66 самцов мышей линии СВА 2 месяцев постнатального развития. Животные были разделены на 4 группы: контрольная (интактные мыши 2 и 3 месяцев, $n = 12$) и 1, 2 и 3 экспериментальные ($n = 18$).

Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с требованиями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [1]. Проведение исследований разрешено этическим комитетом учреждения.

У животных экспериментальных групп моделировали перелом костей голени (ПГ) путем механического воздействия под диэтиловым наркозом (патент РФ № 2456927) [7]. Мыши интактные и 1-й группы в восстановительном периоде после перелома костей голени находились на стандартном рационе питания, сбалансированном по белку (3,3 г/сутки перевариваемого протеина) и углеводам. Мыши 2-й группы в восстановительном периоде после перелома костей голени находились на изокалорийном, обедненном белком рационе (ИКОБР). Мыши 3-й группы в восстановительном периоде после перелома костей голени находились на ИКОБР, но при этом недостаток белка восполняли смесью аминокислот [6].

Животных выводили из эксперимента на 3, 7 и 28-е сутки после травмы по 6 животных в каждой группе. Для гистологического исследования брали образцы левой боковой доли печени. Кусочки фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезжировали в растворах этанола возрастающей концен-

трации и заливали в парафин. Изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм, которые окрашивали гематоксилином – эозином и по Ван-Гизон. Используя объективный микрометр ОМ-ДТ7.216.009ПС и окулярную измерительную линейку, при объективе 40 измеряли диаметр центральных вен, междольковых вен, междольковых артерий, синусоидных капилляров, междольковых желчных протоков.

Для определения значимости различий использовали непараметрический критерий Вилкоксона для независимых выборок. Критический уровень значимости различий результатов (P) принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Диаметр центральных вен у животных 1-й экспериментальной группы (ПГ) был выше данных группы интактных животных на всех этапах исследования (табл. 1). Во 2-й экспериментальной группе (ПГ + ИКОБР) этот показатель был повышен на 7 и 28 сутки после перелома. В 3-й группе (ПГ + ИКОБР + АС) этот показатель не отличался от данных группы интактных животных.

Таблица 1

Диаметр центральных вен у мышей в посттравматическом периоде ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, мкм)

Группа	3-и сутки эксперимента	7-е сутки эксперимента	28-е сутки эксперимента
Интактные животные	33,2 ± 2,4	33,2 ± 2,4	38,6 ± 1,9 [#]
1-я (ПГ)	47,4 ± 2,0 * ^(2,3)	40,8 ± 1,4 * ⁽³⁾	48,7 ± 1,9 * ⁽³⁾
2-я (ПГ + ИКОБР)	36,6 ± 2,2 ⁽¹⁾	40,4 ± 2,2 * ⁽³⁾	48,0 ± 3,0 * ⁽³⁾
3-я (ПГ + ИКОБР + АС)	33,3 ± 2,1 ⁽¹⁾	32,2 ± 2,2 ^(1,2)	36,0 ± 2,7 ^(1,2)

Примечания: * – значимые различия при сравнении с интактными животными при $P < 0,05$; ^(1,2,3) – значимые различия при сравнении с указанной группой животных; # – значимые различия 3-месячных интактных животных с 2-месячными.

Таким образом, диаметр центральных вен печеночной доли у мышей 1-й и 2-й групп оставался повышенным длительное время посттравматического периода. Применение аминокислотной смеси предотвращало увеличение диаметра центральных вен печеночной доли.

Диаметр междольковых вен у животных 2 и 3-й групп на исследуемых этапах восстановительного периода был в пределах значений интактных животных, только в 1-й экспериментальной группе этот показатель был выше нормы через 3-е суток после травмы (табл. 2).

Таблица 2

Диаметр междольковых вен у мышей в посттравматическом периоде ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, мкм)

Группа	3-и сутки эксперимента	7-е сутки эксперимента	28-е сутки эксперимента
Интактные животные	39,6 ± 3,13	39,6 ± 3,13	44,7 ± 1,98 [#]
1-я (ПГ)	46,2 ± 1,77 * ^(2,3)	41,7 ± 2,02	49,1 ± 2,25
2-я (ПГ + ИКОБР)	40,9 ± 2,29 ⁽¹⁾	38,7 ± 1,95	43,9 ± 2,29
3-я (ПГ + ИКОБР + АС)	41,3 ± 2,44 ⁽¹⁾	43,0 ± 2,46	43,0 ± 2,46

Примечание. Обозначения как в табл. 1.

Диаметр междольковых артерий печени у животных 1-й группы на 3-и и 7-е сутки, а у 2-й и 3-й групп на всех сроках наблю-

дения оставался ниже по сравнению с показателями интактных животных (табл. 3). Однако применение аминокислотной смеси

способствовало повышению диаметра междольковых артерий печени через 28 суток, но даже в этот срок их диаметр не соответствовал диаметру интактных животных.

Таблица 3

Диаметр междольковых артерий у мышей в посттравматическом периоде ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, мкм)

Группа	3-и сутки эксперимента	7-е сутки эксперимента	28-е сутки эксперимента
Интактные животные	14,6 ± 0,95	14,6 ± 0,95	14,7 ± 1,33
1-я (ПГ)	13,4 ± 0,56 *	13,7 ± 0,72 * ⁽²⁾	14,7 ± 0,66 ^(2,3)
2-я (ПГ + ИКОБР)	13,2 ± 0,47 *	12,0 ± 0,40 * ⁽¹⁾	10,4 ± 0,40 * ^(1,3)
3-я (ПГ + ИКОБР + АС)	13,5 ± 1,00 *	11,9 ± 0,48 *	11,4 ± 0,41* ^(1,2)

Примечание. Обозначения как в табл. 1.

Как показано в табл. 4 диаметр синусоидных капилляров печеночной дольки в 1-й экспериментальной группе животных оставался выше нормы на всех сроках наблюдений. Во 2-й группе (ПГ + ИКОБР) выявлены фазовые изменения этого показателя: он выше на 3-и и 28-е сутки, но ниже на 7-е сутки после

травмы при сравнении с мышами интактной группы. В 3-й группе животных, получавших с пищей аминокислотную смесь на фоне ИКОБР, диаметр синусоидных капилляров печеночной дольки снижен на 3-и и 7-е сутки эксперимента, а на 28 сутки не отличался от данных группы интактных животных.

Таблица 4

Диаметр синусоидных капилляров печеночной дольки мышей в посттравматическом периоде ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, мкм)

Группа	3-и сутки эксперимента	7-е сутки эксперимента	28-е сутки эксперимента
Интактные животные	5,9 ± 0,13	5,9 ± 0,13	5,0 ± 0,13 [#]
1-я (ПГ)	6,9 ± 0,20 * ^(2,3)	6,5 ± 0,16 * ^(2,3)	5,4 ± 0,16 * ⁽³⁾
2-я (ПГ + ИКОБР)	6,1 ± 0,16 * ⁽¹⁾	5,6 ± 0,14 * ⁽¹⁾	6,0 ± 0,13 * ⁽³⁾
3-я (ПГ + ИКОБР + АС)	5,5 ± 0,16 * ⁽¹⁾	5,6 ± 0,18 * ⁽¹⁾	4,9 ± 0,14 ^(1,2)

Примечание. Обозначения как в табл. 1.

Наиболее значительные изменения диаметра междольковых желчных протоков наблюдались у мышей 2-й группы, получавших изокалорийный углеводный, обедненный белком рацион при переломе

костей голени (ПГ + ИКОБР) (табл. 5). Добавление в пищу аминокислотной смеси способствовало нормализации этого показателя на 3-и и 28-е сутки посттравматического периода.

Таблица 5

Диаметр междольковых желчных протоков у мышей в посттравматическом периоде ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, мкм)

Группа	3-и сутки эксперимента	7-е сутки эксперимента	28-е сутки эксперимента
Интактные животные	14,0 ± 0,46	14,0 ± 0,46	13,8 ± 0,61
1-я (ПГ)	12,5 ± 0,40 * ⁽³⁾	14,1 ± 0,47 ^(2,3)	13,7 ± 0,71 ⁽²⁾
2-я (ПГ + ИКОБР)	11,6 ± 0,90 * ⁽³⁾	12,3 ± 0,35 * ⁽¹⁾	10,8 ± 0,59 ⁽¹⁾
3-я (ПГ + ИКОБР + АС)	13,7 ± 0,48 ^(1,2)	12,0 ± 0,49 * ⁽¹⁾	12,7 ± 0,58

Примечание. Обозначения как в табл. 1.

Заключение

Анализ результатов морфометрического исследования позволил выявить особенности реакции сосудов печени на добавку в пищу смеси четырёх аминокислот в пост-

травматический период после перелома костей голени. Обнаруженные увеличения диаметра центральных, междольковых вени и синусоидных капилляров были менее выраженными у мышей, получавших с пищей аминокислотную смесь на фоне

изокалорийного, обедненного белком рациона (3-я группа) при сравнении с мышами, содержащимися на стандартном (1-я группа) и изокалорийном, обедненном белком рационе без добавления аминокислот (2-я группа). Если при переломе костей голени наблюдалось уменьшение диаметра междольковых артерий через 3-е и 7 суток, то при изокалорийном, обедненном белком рационе эти изменения более выражены и длительны (до 28 суток), а применение в этих условиях смеси аминокислот способствовало менее выраженному уменьшению диаметра междольковых артерий.

Таким образом, результаты исследования позволяют заключить, что применение аминокислотной смеси (лейцин, изолейцин, аргинин, метионин в равном весовом соотношении) оказывает протекторное действие на сосуды печени.

Список литературы

1. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2003. – № 4. – С. 34–36.
2. Мараховский Ю.Х. Аминокислоты как лекарственные средства: от научных достижений к клинической практике // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы 3-й междунар. научной конф. – Минск, 2009. – С. 6–9.
3. Махова А.Н. Структурные изменения в органах при травмах голени с переломом большеберцовой кости в эксперименте / А.Н. Махова, А.К. Махов // Актуальные проблемы морфологии: сб. науч. тр. – Красноярск: КрасГМА, 2004. – С. 176.
4. Морфологические изменения в печени, тимусе, селезенке и тонком кишечнике после введения лейцина / В.М. Шейбак [и др.] // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – № 2. – С. 231–235.
5. Очеретина Р.Ю. Морфометрические параметры сосудов дольки печени у мышей в восстановительном периоде после травмы голени / Р.Ю. Очеретина, О.З. Мкртчян, М.В. Стогов // Морфология. – 2012. – Т.141, № 2. – С. 32–34.
6. Патент 2454227 Российская Федерация. Композиция для восстановления скелетных мышц и кости при скелетной травме / М.В. Стогов, А.Н. Накоскин, С.Н. Лунева / заявл. 05.04.2011; опубл. 27.06.2012, Бюл. № 18.
7. Патент 2456927 Российская Федерация. Способ биологической оценки остеиндуцирующего эффекта белков плазмы крови / М.А. Ковинька, М.В. Стогов, Р.Ю. Очеретина, О.Л. Гребнева; заявл. 13.10.2010; опубл. 27.07.2012, Бюл. № 28.

8. Yoshizawa F. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 313. 2. P. 417–422.

9. Kdolsky R.K., Mohr W., Savidis-Dacho H., Beer R., Puig S., Reihnsner R., Tangi S., Donath K. The influence of oral L-arginine on fracture healing: an animal study // Wien Klin. Wochenschr. 2005. Vol. 117. 19–20. P. 693–701.

10. Kadowaki M. Amino acids as regulators of proteolysis / M. Kadowaki, T. Kanazawa // J. Nutr. – 2003. – Vol. 133, № 6. – P. 2052–2056.

References

1. Evropejskaja konvencija po zashhite pozvonochnyh zhitvnyh, ispol' zuemyh dlja jeksperimental'nyh i drugih nauchnyh celej, Voprosy rekonstruktivnoj i plasticheskoj hirurgii, 2003, no. 4, pp. 34–36.
2. Marahovskij Ju.H., Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija: materialy 3-j mezhdunar. nauchnoj konf, Minsk, 2009, pp. 6–9.
3. Mahova A.N. Mahov A.K., Aktual'nye problemy morfologii: sb. nauch. tr. – Krasnojarsk: KrasGMA, 2004, p. 176.
4. Shejbak V.M., Bjull. jeksperim. biologii i mediciny, 2007, № 2, pp. 231–235.
5. Ocheretina R.Ju, Mkrтчян O.Z., Stogov M.V., Morfologija, 2012, vol.141, no. 2, pp. 32–34.
6. Patent 2454227 Rossijskaja Federacija. Kompozicija dlja vosstanovlenija skeletnyh myshc i kosti pri skeletnoj travme/ M.V. Stogov, A.N. Nakoskin, S.N. Luneva/ zajavl. 05.04.2011; opubl. 27.06.2012, Bjul. no. 18.
7. Patent 2456927 Rossijskaja Federacija. Sposob biologicheskoj ocenki osteoinducirujushhego jeffekta belkov plazmy krovi/ M.A. Kovin'ka, M.V. Stogov, R.Ju. Ocheretina, O.L. Grebneva; zajavl. 13.10.2010; opubl. 27.07.2012, Bjul. no. 28.
8. Yoshizawa F. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 313. 2. pp. 417–422.;
9. Kdolsky R.K., Mohr W., Savidis-Dacho H., Beer R., Puig S., Reihnsner R., Tangi S., Donath K. The influence of oral L-arginine on fracture healing: an animal study // Wien Klin. Wochenschr. 2005. Vol. 117. 19–20. pp.693-701
10. Kadowaki M. Amino acids as regulators of proteolysis / M. Kadowaki, T. Kanazawa // J. Nutr. 2003. Vol. 133, № 6. 33. 2052–2056.

Рецензенты:

Лютикова Т.М., д.б.н., профессор кафедры биологии, ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Омск;

Семченко В.В., д.м.н., профессор кафедры анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии, ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. Столыпина, г. Омск.

Работа поступила в редакцию 16.12.2013.