

ID: 2017-12-6-A-16782

Оригинальная статья

Фастова О.Н., Лузин В.И.

Ультраструктура регенерата, формирующегося после нанесения дефекта в большеберцовых костях на фоне 60-суточного введения тартразина

ГУ ЛНР Луганский ГМУ им. Святого Луки, кафедра анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии

Fastova O.N., Luzin V.I.

Ultrastructure of regenerated bone tissue in the defect of tibia under conditions of 60-day tartrazine intake

St. Luke State Medical University of Lugansk, Department of human anatomy, operative surgery and topographic anatomy

Резюме

Цель: исследовать ультраструктуру кристаллической решетки регенерата большеберцовых костей (ББК) у половозрелых белых крыс, формирующегося на фоне 60-суточного употребления в пищу тартразина в различных концентрациях. Материал и методы. Эксперимент проведен на 140 крысах, распределенных на 4 группы: 1-я – контроль, 2-я – крысы, которым наносили дефект диаметром 2,0 мм в обеих ББК, 3-4-я – крысы, которым в течение 60 суток внутривентрикулярно вводился тартазин в дозе 750 мг/кг/сутки и 1500 мг/кг/сутки, после чего наносился дефект ББК. Рентгеноструктурное исследование проводили на аппарате ДРОН-2,0 с гониометрической приставкой ГУР-5. Результаты. После введения тартразина в дозе 750 мг/кг/сутки коэффициент микротекстурирования регенерата был меньше значений 4-й группы на 3, 10, 15, 24 и 45 сутки после нанесения дефекта на 3,49, 6,24, 6,50, 8,19 и 6,33%, а размеры кристаллитов с 15 по 45 сутки – больше на 14,14, 8,40 и 3,45%. При дозе тартразина 1500 мг/кг/сутки формирование регенерата замедлялось более значительно: коэффициент микротекстурирования был меньше значений 4-й группы во все сроки на 4,49, 7,36, 7,95, 8,53 и 7,55%, а размеры кристаллитов с 10 по 45 сутки – больше на 5,30, 20,36, 11,47 и 9,16%. Заключение. Внутривентрикулярное введение тартразина в течение 60-ти суток сопровождается замедлением формирования кристаллической решетки костного регенерата, а выраженность изменений зависит от дозы тартразина.

Ключевые слова: кость, регенерация, тартазин

Abstract

Aims. The study is aimed at testing of ultrastructural features of crystal lattice in regenerated bone tissue in mature rats under conditions of 60-day tartrazine intake in various concentrations. Materials and methods. The experiment involved 140 rats distributed into 4 groups: the 1st group for the controls, the 2nd group comprised the animals with modeled fracture as a 2.0 mm perforation in both tibiae; the groups 3 and 4 received intragastric tartrazine in dosage of 750 and 1500 mg per kg of body weight daily for 60 days followed by fracture modeling. X-ray analysis was performed by means of DRON-2 x-ray device with goniometric attachment GUR-5. Results. After tartrazine administration in dosage of 750 mg, microtexture coefficient was lower than of the 4th group by the 3rd, 10th, 15th, 24th and 45th days of observation by 3.49, 6.24, 6.50, 8.19 and 6.33% respectively and crystallites dimensions increased in the period from the 15th to the 45th days by 14.14, 8.40 and 3.45% respectively. Under dosage of 1500 mg, regeneration slowed down more: microtexture coefficient was lower than that of the 4th group in all observation terms by 4.49%, 7.36, 7.95, 8.53 and 7.55% respectively and crystallites dimensions increased in the period from the 15th to the 45th days by 5.30, 20.36, 11.47 and 9.16% respectively. Conclusions. 60-day tartrazine intake results in slowing of crystal lattice formation depending on tartrazine dosage.

Keywords: bone, regeneration, tartrazine

Введение

В настоящее время в пищевой промышленности широко используется тартазин (Tartrazine, E 102) – желтый синтетический краситель [1]. В экспериментальных исследованиях было выявлено гепатотоксическое и нефротоксическое действие тартразина после его употребления в пищу в течение 90 суток [2]. Имеются также сведения и том, что употребление тартразина в течение 60 суток сопровождается и увеличением степени аморфности костного биоминерала у крыс [3]. Вместе с тем, сведения о регенерации костей скелета после длительного употребления тартразина в пищу в доступной литературе нам найти не удалось.

Цель: исследовать ультраструктуру кристаллической решетки регенерата большеберцовых костей у половозрелых белых крыс, формирующегося на фоне 60-суточного употребления в пищу тартразина в различных концентрациях.

Материал и методы

Исследование было проведено на 140 белых беспородных крысах-самцах репродуктивного периода онтогенеза с исходной массой тела 200–210 г. Все манипуляции над подопытными животными проводились в соответствии с правилами, установленными «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) [4].

Животные были распределены на 4 группы: 1-ю группу составили контрольные животные, которым в течение 60-ти суток внутривентрикулярно вводился 1 мл 0,9% изотонического раствора натрия хлорида (группа К), 2-ю группу – крысы, которым в срок, соответствующий окончанию введения тартразина в 3-4-й группах наносили сквозной дефект диаметром 2,0 мм в проксимальном метафизе обеих большеберцовых костей (Д) [5]. 3-я и 4-я группы – крысы, которым в течение 60-ти суток при помощи желудочного зонда вводился 1 мл тартразина в дозе 750 мг/кг/сутки и 1500 мг/кг/сутки массы тела соответственно (производитель РОНА

DYECHEM PVT LTD), после чего наносили дефект большеберцовой кости (ТД1 и ТД2). Расчёт дозы вводимых препаратов производили с учётом рекомендаций Ю.Р. и Р.С. Рыболовлевых [6].

По окончании эксперимента (через 3, 10, 15, 24 и 45 суток после окончания введения тартразина, что соответствует традиционно выделяемым стадиям процесса репаративной регенерации кости) животных декапитировали под эфирным наркозом, скелетировали большеберцовые кости, отделяли область проксимального метафиза и исследовали методом рентгеноструктурного анализа [7]. Костный порошок, полученный в агатовой ступке, исследовали на аппарате ДРОН-2,0 с гониометрической приставкой ГУР-5. Использовали $K\alpha$ излучение меди с длиной волны 0,1542 нм; напряжение и сила анодного тока составляли соответственно 30 кВ и 20 А. Дифрагированные рентгеновские лучи регистрировали в угловом диапазоне от 2 до 37° со скоростью записи 1° в 1 минуту. На полученных дифрактограммах исследовали наиболее выраженные дифракционные пики, по угловому положению которых рассчитывали параметры элементарных ячеек костного биоминерала, размеры блоков когерентного рассеивания по уравнению Селякова–Шерера и коэффициент микротекстурирования по методу соотношения рефлексов.

Полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием стандартных прикладных программ [8].

Результаты

У животных, которым наносили сквозной дырчатый дефект диаметром 2,0 мм в области проксимального метафиза большеберцовой кости динамика изменения ультраструктуры вновь формирующегося костного биоминерала регенерата носила выраженный двухфазный характер.

Первая фаза характеризовалась признаками дестабилизации и разрушения кристаллической решетки костного биоминерала, что связано с преобладанием процессов резорбции костных отломков. При этом на 3 и 10 сутки наблюдения размеры элементарных ячеек костного биоминерала вдоль оси *a* и размеры блоков когерентного рассеивания были больше аналогичных показателей контрольной группы на 0,15 и 0,13%, и на 12,08 и 10,45%. В этих условиях коэффициент микротекстурирования костного минерала с 3 по 15 сутки наблюдения был меньше значений группы К на 10,46, 9,01 и 3,12%.

Вторая фаза формирования регенерата характеризовалась преобладанием процессов роста вновь образованных элементарных ячеек костного биоминерала и стабилизацией его кристаллической решетки. При этом размеры блоков когерентного рассеивания с 15 по 45 сутки наблюдения были меньше аналогичных значений группы К соответственно на 0,12, 0,13 и 0,10%, и на 9,00, 8,04 и 3,74%, а размеры элементарных ячеек вдоль оси *c* на 15 и 24 сутки – на 0,24 и 0,17%. В этих условиях коэффициент микротекстурирования костного биоминерала был больше значений контрольной группы на 24 и 45 сутки наблюдения на 3,24 и 3,49%.

Полученные результаты по направленности в целом соответствуют описанной в литературе и наших предшествующих исследованиях динамике ультраструктуры биоминерала формирующегося в области костного дефекта [7].

В том случае, когда дефекты большеберцовых костей наносили подопытным животным, которые предварительно в течение 60 суток получали тартразин в дозе 750 мг/кг/сутки было отмечено замедление формирования кристаллической решетки биоминерала регенерата, выраженное в ходе всего наблюдения.

При этом коэффициент микротекстурирования биоминерала регенерата в ходе всего периода наблюдения был меньше значений группы Д соответственно на 3,49, 6,24, 6,50, 8,19 и 6,33%. В то же время, размеры элементарных ячеек биоминерала регенерата вдоль оси *c* были больше значений группы Д с 10 по 45 сутки наблюдения соответственно на 0,20, 0,27, 0,24 и 0,14%, размеры элементарных ячеек вдоль оси *a* с 15 по 45 сутки – на 0,31, 0,14 и 0,10%, а размеры кристаллитов с 15 по 45 сутки – на 14,14, 8,40 и 3,45%.

Таким образом, нанесение дефекта в большеберцовых костях на фоне предварительного 60-суточного введения тартразина в дозе 750 мг/кг/сутки сопровождается замедлением формирования кристаллической решетки биоминерала регенерата, признаки которого выражены с 3 по 45 сутки наблюдения, а максимальные отклонения, как правило, регистрируются на 15 сутки после нанесения дефекта.

В том случае, когда дефекты большеберцовых костей наносили подопытным животным, которые предварительно в течение 60 суток получали тартразин в дозе 1500 мг/кг/сутки было отмечено усугубление замедления формирования кристаллической решетки биоминерала регенерата, выраженное в ходе всего наблюдения.

При этом, в группе ТД2 размеры элементарных ячеек биоминерала регенерата вдоль оси *c* были больше аналогичных значений группы Д с 3 по 45 день наблюдения на 0,15, 0,24, 0,30, 0,28 и 0,17%, а коэффициент микротекстурирования – меньше на 4,49, 7,36, 7,95, 8,53 и 7,55%. Также, с 10 по 45 сутки наблюдения размеры элементарных ячеек биоминерала регенерата вдоль оси *a* и размеры кристаллитов были больше значений группы Д соответственно на 0,13, 0,33, 0,18 и 0,17%, и на 5,29, 20,36, 11,46 и 9,16%.

Таким образом, нанесение дефекта в большеберцовых костях на фоне предварительного 60-суточного введения тартразина в дозе 1500 мг/кг/сутки сопровождается замедлением формирования кристаллической решетки биоминерала регенерата, признаки которого выражены с 3 по 45 сутки наблюдения, а максимальные отклонения для большинства исследуемых показателей регистрируются на 15 сутки после нанесения дефекта. Отклонения коэффициента микротекстурирования достигают максимума на 24 сутки; вероятно, это связано с тем, что процессы кристаллизации костного биоминерала осуществляются несколько позднее, чем процессы нуклеации и роста элементарных ячеек.

Обсуждение

Полученные результаты можно, предположительно, объяснить следующим образом. Доказано, что применение тартразина, сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов и снижением активности антиоксидантной системы в почках [8]. Это приводит к увеличению образования свободных радикалов и вызывает повреждения биологических мембран, белков, хроматина ядер клеток и нарушение стабильности специфических ионных каналов и рецепторов. Однако, помимо этого, тартразин содержит в своей структуре «пиридиновый азот», обладающий сильным комплексообразующим действием [9]. В результате, тартразин выступает как хелатообразующий агент с молекулами меди, цинка и марганца [10]. Известно, что

вышеперечисленные микроэлементы выступают кофакторами различных ферментов и энергетических циклов. Следовательно, их недостаток может негативно сказываться на процессах минерализации как при физиологической, так и при репаративной регенерации костей скелета.

Заключение

Таким образом, нанесение сквозного дырчатого дефекта диаметром 2,0 мм в области проксимального метафиза большеберцовой кости сопровождается изменениями ультраструктуры формирующегося биоминерала регенерата, которая носит двухфазный характер. Первая фаза, с 3 по 15 сутки после нанесения дефекта, характеризуется признаками дестабилизации и разрушения кристаллической решетки костного биоминерала (увеличение размеров элементарных ячеек и кристаллитов, снижение однородности ориентации кристаллитов в кристаллической решетке), что связано с преобладанием процессов резорбции костных отломков. Вторая фаза, с 15 по 45 сутки после нанесения дефекта, характеризуется преобладанием процессов роста вновь образованных элементарных ячеек костного биоминерала и стабилизацией его кристаллической решетки (уменьшение размеров элементарных ячеек и кристаллитов, повышение коэффициента микротекстурирования).

В том случае, когда дефекты большеберцовых костей наносили животным, которые предварительно в течение 60 суток получали внутривнутрижелудочно тартразин отмечается замедление формирования кристаллической решетки биоминерала регенерата, выраженность которого зависит от дозы тартразина. При введении тартразина в дозе 1500 мг/кг/сутки выраженность выявленных отклонений была выше, чем при использовании тартразина в дозе 750 мг/кг/сутки.

Для большинства исследуемых показателей максимальные отклонения регистрируются на 15 сутки после нанесения дефекта. При этом отклонения коэффициента микротекстурирования достигают максимума на 24 сутки; что может быть связано с тем, что процессы кристаллизации костного биоминерала осуществляются несколько позднее, чем процессы нуклеации и роста элементарных ячеек.

Конфликт интересов

Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет имени Святого Луки» и является фрагментом научно-исследовательской работы «Морфогенез различных органов и систем организма при нанесении дефекта в большеберцовых костях после 60-дневного введения бензоата натрия либо тартразина» (№ государственной регистрации 0113U005755).

Литература

1. Булдаков А.С. Пищевые добавки: Справочник. СПб.: «Ут» 1996: 240.
2. Лукьянцева Г.В., Лузин В.И. Фазовый состав биоминерала тазовой кости у белых крыс после 60-дневного внутривнутрижелудочного введения тартразина в различных концентрациях. Украинський морфологічний альманах 2013; 11 (3): 85–87.
3. Лузин В.И., Верескун Р.В., Мирошниченко П.В. Возрастная динамика ультраструктуры костного биоминерала у белых крыс. Современная медицина: актуальные вопросы 2013; 9 (23): 152–158.
4. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Киев: Морион 2000: 320.
5. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности. Доклады АН СССР 1979; 247 (6): 1513–1516.
6. Лузин В.И., Ивченко Д.В., Панкратьев А.А. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных. Український медичний альманах 2005; 8 (2): 162.
7. Головачева В.А. Влияние пищевых красителей на развитие болезней почек у детей (клинико-экспериментальное исследование). Бюллетень медицинских Интернет-конференций 2012; 2 (1): 7–14.
8. Piper PW. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. Free Radic. Biol. Med. 1999; 27: 1219–1227.
9. Visweswaran B, Krishnamoorthy G. Oxidative Stress by Tartrazine in the Testis of Wistar Rats. Journal of Pharmacy and Biological Sciences 2012; 2 (3): 44–49.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. Strasbourg 1986: 52.
11. Elhkim MO, Heraud F, Bemrah N. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. Regul. Toxicol. Pharmacol 2007; 47 (3): 308–316.