

4. Cole J., Littleton J., Little H. Acomposate, but not naltrexone, inhibits conditioned abstinence behavior associated with repeated ethanol administration and exposure to a plusmaze // *Psychopharmacology*. — 2000. — Vol. 147. — P. 403–411.
5. Dahchlour A., Quertemont E., De Witte P. Acute ethanol increases taurine but neither glutamate nor GABA in the nucleus accumbens of male rats: a microdialysis study // *Alcohol Alcohol*. — 1994. — Vol. 29. — P. 485–487.
6. Dahchlour A., Quertemont E., De Witte P. Taurine increases in the nucleus accumbens micridialisate after acute ethanol administration to naive and chronically alcoholised rats // *Brain Res*. — 1996. — Vol. 735. — P. 9–19.
7. Dahchlour A., De Witte P. Taurine blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens micridialisate of ethanol-dependent rats // *Pharm. Biochem. Behav.* — 2000. — Vol. 65. — P. 345–350.
8. Iwata H., Matsuda T., Lee E. Effect of ethanol on taurine concentration in the brain // *Experientia*. — 1980. — Vol. 36. — P. 332–333.
9. Kudo Y., Akyoshi E., Akagi H. Identification of two taurine receptor subtypes on the primary afferent terminal of frog spinal cord // *Br. J. Pharmacol.* — 1988. — Vol. 94. — P. 1051–1056.
10. Little H.J. The contribution of electrophysiology to knowledge of the acute and chronic effects of ethanol // *Pharmacol. Ther.* — 1999. — Vol. 84. — P. 333–353.
11. Olive M.F., Mehmert K. Reduced operant ethanol self-administration and in vivo mesolimbic dopamine responses to ethanol in PKC ϵ deficient mice // *Eur. J. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 409. — P. 291–294.
12. Olive M.F. Interactions between taurine and ethanol in central nervous system // *Amino Acids*. — 2002. — Vol. 23, № 4. — P. 345–357.
13. Pandey S.C. Neuronal signaling systems and ethanol dependence // *Mol. Neurobiol.* — 1998. — Vol. 17. — P. 1–15.
14. Pietrzak B., Czarnecka E. Effect of the combined administration of ethanol and acamprosate on rabbit EEG // *Pharmacol Rep*. — 2005. — Vol. 57, № 1. — P. 61–69.
15. Quinn M.R., Harris C. Taurine allosterically inhibits binding of [35S]-t-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) to rat brain synaptic membranes // *Neuropharmacology* — 1995. — Vol. 34. — P. 1607–1613.
16. Quinn M.R., Harris C. Taurine allosterically inhibits binding of [35S]-t-butylbicyclophosphorothionate (TBPS) to rat brain synaptic membranes // *Neuropharmacology* — 1995. — Vol. 34. — P. 1607–1613.
17. Quertemont E., Grant K.A. Discriminative stimulus effects of ethanol: lack of interaction with taurine // *Behav Pharmacol.* — 2004. — Vol. 15, № 7. — P. 495–501.
18. Smith A., Watson C.J., Frantz K.J. Differential increase in taurine levels by low-dose ethanol in the dorsal and ventral striatum revealed by microdialysis with on-line capillary electrophoresis // *Alcohol Clin Exp Res*. — 2004. — Vol. 28, № 7. — P. 1028–1038.
19. Tamai I., Senmaru M. Na (+)- and Cl (-)- dependent transport of taurine at the blood-brain barrier // *Biochem. Pharmacol.* — 1995. — Vol. 50. — P. 1783–1793.
20. Witte P., Littleton J., Parot P., Koob G. Neuroprotective and abstinence-promoting effects of acamprosate: elucidating the mechanism of action // *CNS Drugs*. — 2005. — Vol. 19, № 6. — P. 517–537.
21. Ward R.J., Colantuoni C. Acetaldehyde-induced changes in the monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens // *Neuropharmacology*. — 1997. — Vol. 36. — P. 225–232.
22. Ward R., Marshall E., De Witte P. Homeostasis of taurine and glutamate plasma levels after acute and chronic ethanol administration in man // *Neu. Res. Comm.* — 1999. — Vol. 24. — P. 41–49.
23. Wu J.Y., Liao C.C., Lin C.J. Taurine receptor in the mammalian brain // *Prog. Clin. Biol. Res.* — 1990. — Vol. 351. — P. 147–156.
24. Wu J.Y. Neurotoxic effect of acamprosate, n-acetylhomotaurine in cultured neurons // *J. Biomed. Sci.* — 2001. — Vol. 8. — P. 96–103.
25. Yang H.T., Chen Y.H., Chiu W.C., Huang S.Y. Effects of consecutive high-dose alcohol administration on the utilization of sulfur-containing amino acids by rats // *J Nutr Biochem*. — 2006. — Vol. 17, № 1. — P. 45–50.
26. Zalewska-Kaszubaska J., Cwiek W., Dyr W., Czarnecka E. Changes in the beta-endorphin plasma level after repeated treatment with acamprosate in rats selectively bred for high and low alcohol preference // *Neurosci Lett*. — 2005. — Vol. 388, № 1. — P. 45–48.

Поступила 20.02.2006

УДК 611-018. 43

НАНОСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИНЕРАЛЬНОГО МАТРИКСА КОСТНОЙ ТКАНИ

Т. Г. Кузнецова

Гомельский государственный медицинский университет

Был исследован неорганический компонент поверхности костных трабекул позвонка человека. Методом атомно-силовой микроскопии установлены размеры и трехмерная ор-

ганизация нативных минеральных структур. АСМ-изображения показали 2 морфологических типа: пластинчатые минералы и веретеновидные кристаллы, ассоциированные с коллагеновыми фибриллами.

Ключевые слова: костная ткань, минеральный матрикс, атомно-силовая микроскопия

NANOSTRUCTURAL ORGANIZATION OF BONE MINERAL MATRIX

T.G. Kuznetsova

Gomel State Medical University

The inorganic phase of trabecular surface of human vertebra was investigated. The size and three-dimensional shape of native protein-free mineralites were observed with atomic force microscopy. AFM-images reveal two morphological types: mineral plates and needle-shaped crystals, associated with collagen fibrils.

Key words: bone tissue, mineral matrix, atomic force microscopy.

Введение

Костная ткань — это сложный биокompозит, состоящий из органического и неорганического материала, иерархически организованного от нанометрового до макроскопического уровня. Основу костного матрикса образуют коллагеновые фибриллы и аморфное вещество, которые подвергаются процессу минерализации. В пластинчатой костной ткани более 65% общей массы приходится на внутри- и межфибрилярные минеральные отложения, которые сформированы кристаллами гидроксиапатита. Тонкая пространственная организация, размеры и гетерогенность этих минеральных элементов преимущественно и определяют биомеханические свойства костей. В первую очередь, это касается губчатого вещества, и в частности, позвонков, поскольку огромная площадь их трабекулярной поверхности обеспечивает высокую скорость физиологической регенерации и чаще, чем компактное вещество оказывается объектом патологических изменений.

Несмотря на то, что кальцифицированные структуры в составе пластинчатой костной ткани исследовались различными методами, картирование их естественной трехмерной архитектоники остается нерешенной проблемой. Это связано, в первую очередь, с исключительно малыми размерами и коллагеновых фибрилл, и минеральных частиц.

В последнее десятилетие новый нанотехнологический метод — атомно-силовая микроскопия (АСМ) — стал доступен для получения трехмерных изображений биологических объектов с очень высоким разрешением.

Цель представленной работы — исследование минерального компонента губчатого вещества позвонка человека с использованием методов атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 3 аутопсийных образца губчатого вещества передне-боковых зон поясничных позвонков человека, предоставленные отделом морфологии Научно-исследовательского центра биомедицинских технологий (Москва). Для удаления органических компонентов костные фрагменты выдерживали в 2,5% растворе гипохлорита натрия. После этого образцы промывались дистиллированной водой и высушивались при комнатной температуре.

Атомно-силовая микроскопия поверхности костных трабекул проводилась на приборе НТ-206 (ОДО «Микротест машины», Беларусь) с использованием стандартного кремниевого кантилевера. Изображения были получены в статическом и динамическом режимах, на воздухе, при комнатной температуре. При обработке результатов, включая и измерения, использовали АСМ-изображения топографии, фазового контраста и амплитуды, а также графики профилометрии.

Результаты и обсуждение

Поверхность трабекул губчатого вещества позвонков составлена округлыми пластинами неправильной формы (рис. 1). В среднем их ширина составляет 5–6 мкм, длина — 6–8 мкм, высота — 100–120 нм. Пластины покрыты более мелкими минеральными структурами, прилегающими друг

к другу. Форма и размеры этих мелких пластинок значительно варьируют. Встречаются варианты овальной, ромбической, треугольной и веретеновидной формы. Наибо-

лее характерными оказались два варианта, различающиеся особенностями морфологии и пространственной ориентации минеральных отложений.

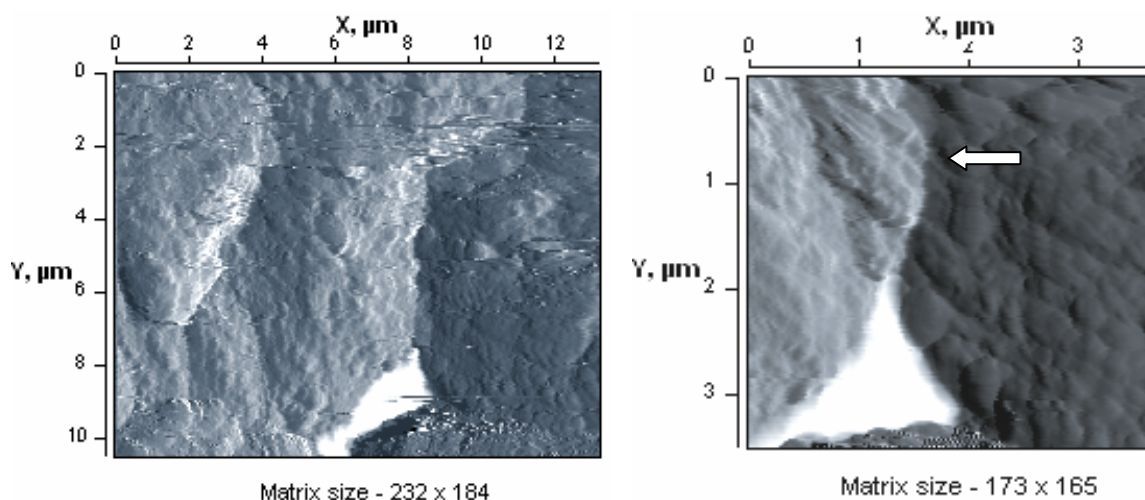


Рис. 1. Поверхность костной трабекулы (стрелка указывает пучок минерализованных фибрилл)

Первый вариант представлен чешуевидными пластинками неправильной формы, которые стыкуются или налегают друг на друга (рис. 2). Их размеры показывают следующие средние значения: ширина — 35–70 нм, длина — 170–220 нм, толщина — 3–8 нм. Однако на малых полях сканирования хорошо видно, что между ними встречаются минеральные композиты значительно меньших размеров. Рисунок 2 демонстрирует область (указана стрелкой),

где в составе отдельных пластинок различимы более мелкие составляющие компоненты в виде округлых минеральных частиц диаметром 14–15 нм и толщиной 1–2 нм, объединения которых и приводят, по видимому, к формированию пластинок следующих размерных классов. Закономерной ориентации в расположении чешуевидных пластинок не выявлено, однако встречаются участки с их локальной упорядоченностью.

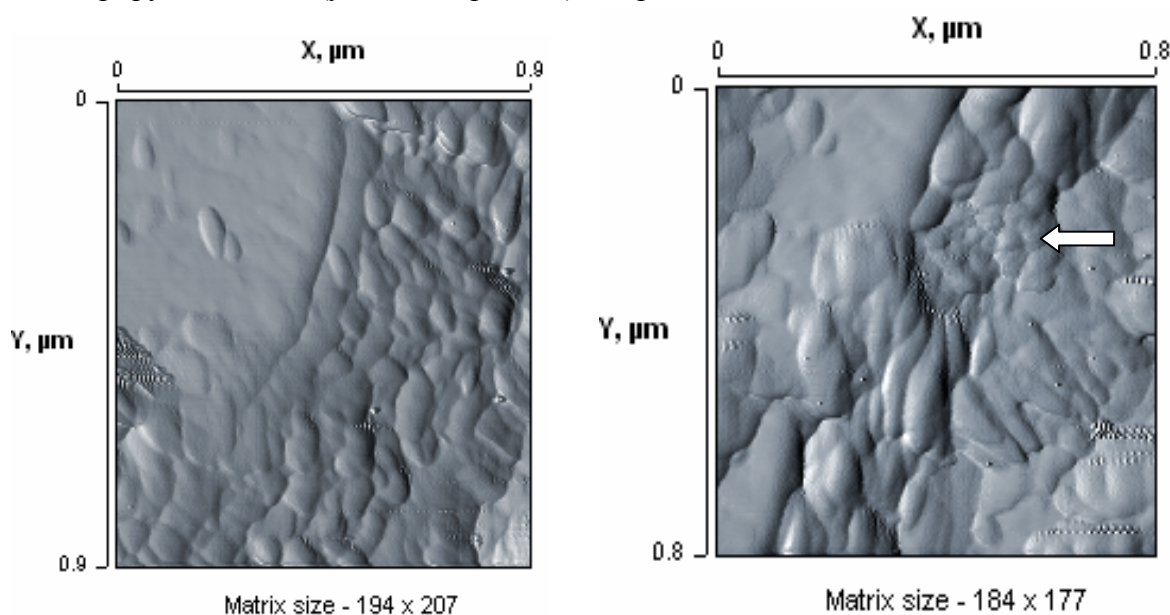


Рис. 2. Пластинчатые минеральные объединения в составе костного матрикса

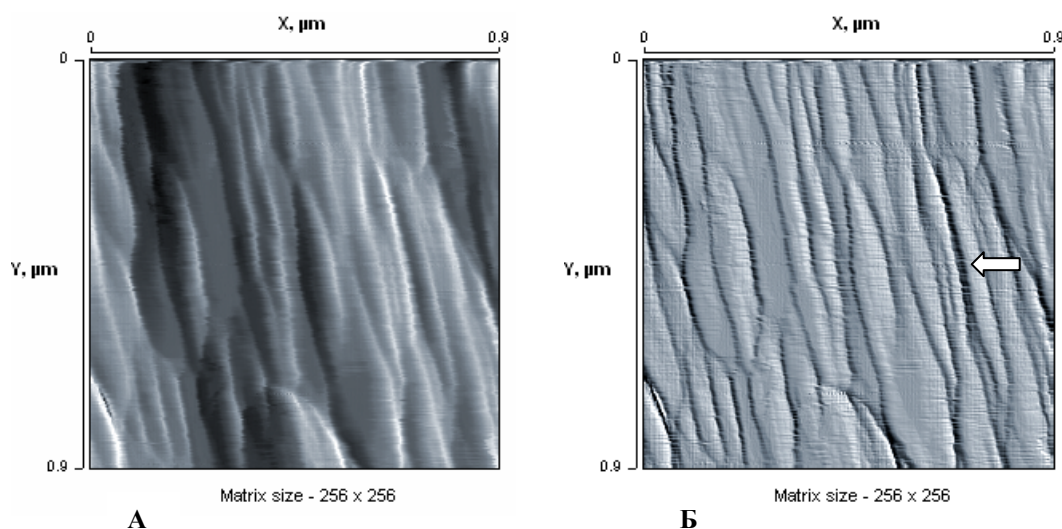


Рис. 3. Веретеновидные минеральные кристаллы, ассоциированные с коллагеновыми фибриллами. А — АСМ-изображения топографии, Б — АСМ-изображения амплитуды

На рисунке 3 представлены АСМ-изображения второго варианта организации минерального компонента. В этом случае на трабекулярной поверхности регистрируются кластеры вытянутых веретеновидных кристаллов, ориентированных параллельно друг другу. На отдельных участках они формируют короткие плоские пучки шириной 0,4–0,8 мкм и длиной 1–2 мкм, имеющие ромбовидную форму. На рисунке 3 показана более тонкая структурная организация этих участков. Отчетливо прослеживаются длинные веретеновидные или цилиндрические минеральные композиты размером 200–500×15–50×10–20 нм, ориентированные параллельно друг другу. На больших площадях сканирования в этих зонах регистрируются ряды длинных, параллельно лежащих волокон с диаметром 50–100 нм, которые представляют собой минеральный каркас коллагеновых фибрилл (указаны стрелкой на рис. 1).

Хорошо известно, что основу неорганического матрикса кости и других минерализованных тканей составляют кристаллы гидроксиапатита. Различные параметры этих минеральных структур, включая морфологию, размеры и пространственную ориентацию [2, 4, 5, 9, 10, 11], определяют механические свойства кости. Однако изучение наноструктурной организации минеральных отложений в нативной костной ткани человека является сложной методо-

логической проблемой в связи с их крайне малыми размерами, а также твердостью, обусловленной их неорганической природой, что затрудняет применение рутинных методов трансмиссионной микроскопии. Это объясняет довольно узкий круг публикаций по обсуждаемому вопросу.

Полученные в данной работе результаты позволяют установить форму, размеры и распределение апатитовых отложений в нативном неорганическом матриксе позвонка человека. Размеры и форма минеральных пластинок оказались близки к показателям, полученным методом АСМ для позвонков быка [3, 6], а также к размерам изолированных зрелых кристаллов из грубоволокнистой костной ткани, изученных методами трансмиссионной, высоковольтной и сканирующей электронной микроскопии [11].

Наименьшие минеральные частицы, которые формируют эти пластинки (рис. 2), по своим размерам близки к дезагрегированным минералам, исследованным методом ТЭМ с применением криофрактографии [1], и лишь ненамного превышают параметры диспергированных кристаллов компактной кости телят, измеренные на АСМ-изображениях [12].

Наши наблюдения достаточно хорошо согласуются с моделью копланарного объединения призматических кристаллов гидроксиапатита с размерами 14×8×4 нм (со-

ответствующих по форме природным) в пластинчатые структуры с линейными параметрами $29\text{--}33 \times 18\text{--}21 \times 3\text{--}4$ нм [1]. Представленное в этой работе АСМ-исследование демонстрирует возникновение следующих иерархических уровней роста минеральных отложений ($50 \times 200 \times 10$ нм). Эти параметры близки к результатам, зарегистрированным в других работах [3, 6, 11]. Очевидно, что происходит увеличение толщины минеральных пластин до $10\text{--}30$ нм, которое нельзя объяснить исключительно копланарным принципом роста минералов. Следует отметить, что погрешности АСМ предполагают незначительное увеличение плоскостных параметров, но при некотором занижении высоты объектов. Поэтому зарегистрированная толщина предполагает наложение и/или объединение двух или более копланарных пластин. Подобный механизм формирования и роста минеральных объединений приводит к образованию первого варианта минеральных частиц. Его описание преобладает в литературе и представляется в виде стыкующихся пластинок неправильной формы или чешуек. Анализ полученных в представленной работе АСМ-изображений позволяет предположить, что такие объединения кристаллов соответствуют минерализованному аморфному веществу на сформированных участках костной поверхности.

Проведенное исследование демонстрирует, что на определенном уровне структурной организации могут появляться и объединения второго морфологического варианта — в виде веретеновидных частиц. Их строгая параллельная ориентация, размеры и анализ взаимного расположения, включая и формирование пучков, позволяют заключить, что эти минеральные компоненты ассоциированы с коллагеновыми фибриллами.

Работы Landis [7, 8], выполненные на минерализованном сухожилии с использованием высоковольтной ЭМ — томографии и трехмерной реконструкции, подтверждают предложенную ранее модель [13], согласно которой распределение внутрифибриллярных апатитов описывается как серия параллельных слоев плоских кристаллов, разделенных слоями коллагена. Поскольку толщина отдельных кристаллов значительно меньше диаметра

коллагеновых фибрилл, приводимого в литературе ($50\text{--}80$ нм), можно предположить, что длинные цилиндрические образования, указанные стрелкой на рисунке 3, могут представлять слои внутрифибриллярных минеральных отложений. Это, однако, плохо согласуется с предположением о спиральной закрученности апатитовых слоев [1].

На рисунке 3 также представлены уплощенные веретеновидные кристаллы. По своему максимальному диаметру и характерному расположению они, вероятнее всего, связаны с поверхностью коллагеновых фибрилл, в которых процесс минерализации еще не завершен. В отличие от пластинчатой формы минеральных отложений, которая описывается в подавляющем большинстве работ, второй тип упоминается лишь в единичных работах [2, 11] как «эллипсоидные цилиндры» или «веретеновидные кристаллы».

Заключение

Таким образом, минеральные копланарные объединения в составе матрикса компактной костной ткани формируют структуры различной формы в зависимости от их локализации. Эти различия могут быть связаны с особенностями геометрии пространственного роста и перестройки костных трабекул. Мы полагаем, что минерализация аморфного вещества приводит к образованию пластинчатых структур, а кристаллы, ассоциированные с поверхностью минерализующихся коллагеновых фибрилл, объединяются в виде уплощенных, заостренных на концах цилиндров, что сохраняет возможность определенного искривления в ходе минерализующихся коллагеновых фибрилл. Морфологические особенности различных популяций минеральных структур уже на наноструктурном уровне создают возможность реорганизации тонкой архитектоники костной ткани в соответствии с механическими нагрузками и другими факторами, влияющими на механизмы физиологической регенерации кости.

Выводы

Представленные результаты демонстрируют, что использование методов атомно-силовой микроскопии делает возможным изучение естественной наноструктурной организации неорганического компонента костей. Это создает основу для мо-

делирования новых имплантантных материалов, а также открывает новые возможности в исследовании тонких механизмов реорганизации костной ткани как в норме, так и при патологических процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисов-Никольский Ю.И., Жилкин Б.А., Докторов А.А., Матвейчук И.В. Ультраструктурная организация минерального компонента пластинчатой костной ткани у людей зрелого и старческого возраста // Морфология. — 2002. — Т. 122. — № 5. — С. 79–83.
2. Fratzl P., Groschner M., Vogl G., Plenk H., Eschberger J., Fratzl-Zelman N. et al. Mineral crystals in calcified tissues – a comparative study by SAXS. // J. Bone Miner Res. — 1992. — № 7. — P. 329–334.
3. Hassenkam T., Fantner G., Cutroni J.A., Weaver C., Hansma P.K. High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. // Bone. — 2004. — V. 35. — № 1. — P. 4–10.
4. Jaschouz D., Paris O., Roschger P., Hwang H.S., Fratzl P. Pole figure analysis of mineral nanoparticle orientation in individual trabecular of human vertebral bone. // J. Appl. Crystallogr. — 2003. — V. 36. — P. 494–498.
5. Kim H.M., Rey C., Glimcher M.J. Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature. // J. Bone Miner Res. — 1995. — № 10. — P. 1589–1601.
6. Kuangshin T., Hang J.Q., Ortis C. Effect of mineral content on the nanoindentation properties and nanoscale deformation mechanisms of bovine tibial cortical bone. // J. Materials science: Materials in medicine. — 2005. — V. 16 — № 8. — P. 1–12.
7. Landis W.J., Song M.J., Leith A., McEwen L. Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. // J. Struct. Biol. — 1993. — № 110. — P. 39–54.
8. Landis W.J., Hodgens K.J. Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. // J. Struct. Biol. — 1996. — V. 117. — C. 24–35.
9. Lees S., Probst K.S., Ingle V.K., Kjoller K. The loci of mineral in turkey leg tendon as seen by atomic force microscope and electron microscopy. // Calcif. Tissue Int. — 1994. — V. 55. — P. 180–189.
10. Rubin M.A., Jasiuk L., Taylor J., Rubin J., Ganey T., Apkarian R.P. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. // Bone. — 2003. — V. 33. — № 3. — P. 270–282.
11. Su X., Sun K., Cui F.Z. and Landis W.J. Organization of apatite crystals in human woven bone. // Bone. — 2003. — V. 32. — № 2. — P. 150–162.
12. Tong W., Glimcher M.J., Katz J.L., Kuhn L., Eppell S.J. Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy. // Calcif. Tissue Int. — 2003. — V. 75. — P. 592–598.
13. Weiner S.T., Traub W. and Wagner D. Lamellar bone: structure-function relations. // J. Struct. Biol. — 1999. — V. 126. — № 3. — P. 241–255.

Поступила 03.03.2006

УДК 616.36-092.9:615.212

ВЛИЯНИЕ ЛЕЙЦИНА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ

В.М. Шейбак, Р.И. Кравчук, Т.Л. Степура, М.В. Горецкая

Гродненский государственный медицинский университет

Ежедневное пятикратное энтеральное введение незаменимой аминокислоты лейцин в дозе 100 мг/кг массы приводит к стимуляции биосинтетических процессов в печени, которое находит свое подтверждение в изменении ультраструктуры гепатоцитов. Это дает основание полагать, что длительных прием лейцина в условиях депривации энергетических субстратов может оказывать негативное влияние на печень.

Ключевые слова: лейцин, крысы, печень, ультраструктура.

EFFECT OF LEUCINE ON THE MORPHO-GUNCTIONAL STATE OF RAT LIVER

V.M. Sheibak, R.I. Kravchuk, T.L. Stepuro, M.V. Haretskaya

Grodno State Medical University

Enteral administration of essential amino acid leucine (dose 100 mg/kg for five days) results into the stimulation of hepatic biosynthetic processes which correlated with a change in hepato-