

## Ультраструктура костного мінерала при пластичних дефектах біогенним гідроксилапатитом, легированим селеном

В.К.Івченко, В.І.Лузін, Д.В.Івченко, А.Н.Скоробогатов

Луганський державний медичний університет, кафедра травматології і ортопедії (заведуючий — професор В.К.Івченко), кафедра анатомії людини (заведуючий — професор В.Г.Ковешников)  
Луганськ, Україна

В експерименті за даними рентгеноструктурного аналізу встановлено, що легування біогенного гідроксилапатитного матеріалу ОК-015 селеном супроводжується активізацією процесів його біологічної резорбції. Найбільш переважальною є концентрація селена в імплантуєму матеріалі в межах 0,30-0,50%. Сделано припущення, що наявність іонів селена в області формуючогося регенерата оптимізує процеси репаративної регенерації кістки.

**Ключові слова:** костний дефект, гідроксилапатит, костний мінерал, кристалічна решітка селен.

### Введення

При заміщенні костних дефектів різної етіології широко використовуються матеріали на основі гідроксилапатита (ГОА), що містять у своєму складі іони різних металів [2]. Достатньо детально досліджено гистологічне строення кістково-керамічного регенерата, формуючогося в даних умовах, його хімічний і тканинний склад, існують окремі дані про структуру кристалічної решітки формуючогося мінерала [2, 3]. Однак ультраструктура кристалічної решітки мінерала, формуючогося при пластичних дефектах ГОА, легированим різними металами, до сих пор не досліджувалася.

Метою роботи стало дослідження ультраструктури кристалічної решітки мінерального компонента регенерата, який формується при пластичних метафізальних дефектах трубчастих кісток вітчизняним матеріалом на основі біогенного гідроксилапатита «Остеоапатит керамічний» — ОК-015, що містить у своєму складі селен в концентрації 0,15, 0,30 і 0,50 об'ємних відсотків.

Робота є фрагментом міжкафедральної НІР Луганського державного медичного університету «Особливості росту, строення і регенерації трубчастих кісток при пластичних дефектах матеріалами на основі гідроксилапатита» (державний реєстраційний номер 0103U006651).

### Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено на 210 білих крысах-самцях з вихідною масою 135-145 г, розподілених на 5 груп. В 1 групі крысам під ефірним наркозом стандартним стоматологічним бором наносили на границю між проксимальним метафізом і діафізом великих кісток сквозний дірчатий дефект діаметром 2,2 мм. Оскільки передзадній розмір великої кістки в цій області становить не менше 3 мм, маніпуляція не супроводжувалася порушенням цілості кісткового органу і створювалися умови для збереження функціональної навантаженості [5]. В 2 групі дефект заповнювали блоком відповідного діаметра з матеріалу ОК-015, а в 3-5 групах — ОК-015, легированного селеном в концентрації відповідно 0,15%, 0,3% і 0,5%.

Всі маніпуляції на тваринах виконували в відповідності з правилами Європейської конвенції захисту хребтових тварин, що використовуються в експериментальних і інших наукових цілях [11]. Терміни експерименту становили 7, 15, 30, 60, 90 і 180 днів.

Для дослідження ультраструктури мінерального компонента кістки використовували метод рентгеноструктурного аналізу [8]. Кістковий порошок великої кістки досліджували на апараті ДРОН-2,0 з гониометричної приставкою ГУР-5, використовували К $\alpha$  випромінювання міді з довжиною хвилі 0,1542 нм. Напруга і

сила тока на рентгеновской трубке составляли соответственно 30 кВ и 10 мА. Дифрагированные рентгеновские лучи регистрировали в угловом диапазоне от 3 до 37 со скоростью записи 10 мм в минуту.

На полученных дифрактограммах изучали кристаллографические характеристики гидроксилпатита — основного кальцийсодержащего минерала кости. Для гидроксилпатита исследовали наиболее выраженный дифракционный пик, расположенный в угловом диапазоне 30-34°, определяли его амплитуду [8]; по угловому положению дифракционных пиков

рассчитывали межплоскостные расстояния в кристаллах гидроксилпатита [6].

Помимо этого вычисляли размеры блоков когерентного рассеивания (кристаллитов) по формуле Селякова-Шерера [7], рассчитывали коэффициент микротекстурирования по методу соотношения рефлексов [9] и определяли параметры кристаллической решетки гидроксилпатита с учетом гексагональной сингонии кристаллов [1, 8].

Полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета Statistica 5.11 for Windows.

Таблица 1

**Кристаллографическая характеристика костного минерала, формирующегося в области костного дефекта,  $M \pm m$**

Группа	Срок (дни)	Параметры кристаллической решетки костного минерала, %					
		Размер элементарной ячейки вдоль оси а, $10^{-10}$ М	Размер элементарной ячейки вдоль оси с, $10^{-10}$ М	Соотношение с/а, $10^2$	Размер блоков когерентного рассеивания, нМ	Коэффициент микротекстурирования, у.е.	
ОК-015	-	9,367±0,002	6,825±0,002	73,10±0,02	24,37±0,81	0,5647±0,0049	
	7	9,389±0,003	6,845±0,003	72,90±0,03	35,64±0,75	0,3999±0,0095	
	15	9,378±0,003	6,830±0,002	72,83±0,03	39,31±0,73	0,4275±0,0133	
	Дефект	30	9,382±0,001	6,830±0,002	72,81±0,03	46,80±1,35	0,4169±0,0190
		60	9,382±0,003	6,832±0,001	72,82±0,03	46,47±1,18	0,4812±0,0184
		90	9,382±0,003	6,838±0,002	72,89±0,03	50,34±0,81	0,4529±0,0065
		180	9,387±0,003	6,842±0,003	72,89±0,02	50,43±1,15	0,4686±0,0072
Материал ОК-015	7	9,371±0,004*	6,823±0,004*	72,86±0,03	26,09±0,45*	0,3675±0,0084*	
	15	9,395±0,002*	6,842±0,002*	72,83±0,02	46,83±1,34*	0,4205±0,0175	
	30	9,385±0,002	6,844±0,004*	72,92±0,05	46,40±0,98	0,4169±0,0091*	
	60	9,393±0,005	6,844±0,003*	72,85±0,06	47,51±1,24	0,4164±0,0142*	
	90	9,389±0,002	6,844±0,002	72,90±0,02	48,83±0,87	0,4194±0,0063*	
	180	9,382±0,002	6,842±0,004	72,92±0,02	48,52±1,08	0,4387±0,0274	
ОК-015 + Se 0,15%	7	9,377±0,002*	6,828±0,002*	72,82±0,64*	28,43±0,64*#	0,4086±0,0150#	
	15	9,391±0,003*	6,839±0,002*	72,83±0,03	42,36±0,55*#	0,4261±0,0167	
	30	9,390±0,002*	6,839±0,002*	72,83±0,02	44,16±0,88	0,4468±0,0083#	
	60	9,389±0,002	6,841±0,002*	72,87±0,04	46,19±1,37	0,4488±0,0110	
	90	9,391±0,002*	6,846±0,002*	72,90±0,02	49,21±0,92	0,4175±0,0123*	
	180	9,386±0,004	6,842±0,004	72,89±0,03	48,95±1,31	0,4724±0,0244	
ОК-015 + Se 0,30%	7	9,382±0,003	6,831±0,003*	72,81±0,03	30,80±1,23*#	0,4094±0,0260	
	15	9,388±0,002*#	6,839±0,002*	72,85±0,02	40,00±1,73#	0,4328±0,0334	
	30	9,386±0,003	6,836±0,003	72,84±0,03	46,06±0,92	0,4535±0,0053#	
	60	9,383±0,004	6,835±0,003	72,84±0,03	45,21±1,31	0,4637±0,0100#	
	90	9,389±0,002	6,841±0,003	72,86±0,03	50,37±0,96	0,4436±0,0136	
	180	9,386±0,003	6,844±0,003	72,91±0,02	50,00±0,99	0,4629±0,0093	
ОК-015 + Se 0,50%	7	9,380±0,002*	6,830±0,003*	72,81±0,04	29,97±0,93*#	0,4111±0,0152#	
	15	9,385±0,004#	6,834±0,003	72,82±0,02	37,86±1,21#	0,4300±0,0129	
	30	9,379±0,002	6,833±0,002	72,85±0,02	46,02±0,71	0,4779±0,0095#	
	60	9,382±0,003	6,831±0,001#	72,81±0,02	45,49±1,15	0,4637±0,0142#	
	90	9,389±0,002	6,843±0,001	72,89±0,01	48,87±1,03	0,4272±0,01210	
	180	9,391±0,003	6,843±0,003	72,86±0,02	49,57±0,77	0,4404±0,0096	

Примечания: \* — достоверное отличие от группы с незаполненным дефектом ( $p < 0,05$ ); # — достоверное отличие от группы с имплантацией ОК-015 без легирования селеном ( $p < 0,05$ ).

## Результаты исследования и их обсуждение

Для того чтобы иметь возможность объективно оценить изменения, возникающие при перестройке имплантата, в первую очередь рентгеноструктурному анализу были подвергнуты образцы материала ОК-015 (табл. 1-3).

Для материала ОК-015 размер элементарных ячеек гидроксилapatита вдоль оси *c* составил  $6,825 \pm 0,002$  ( $\times 10^{-10}$  М), вдоль оси *a* —  $9,367 \pm 0,002$  ( $\times 10^{-10}$  М), а соотношение *c/a* —  $73,10 \pm 0,02$  у.е. ( $10^2$ ). Эти показатели несколько отличаются от типичных для гидроксилapatита, что может быть связанным с наличием в составе ОК-015 до 6,6% SiO<sub>2</sub> (согласно технической документации), который, вступая во взаимодействие с гидроксилapatитом, изменяет его кристаллографические параметры.

Размер блоков когерентного рассеивания для материала ОК-015 составил  $24,37 \pm 0,81$  нМ, а коэффициент микротекстурирования (однородность ориентации кристаллов в кристаллической решетке), рассчитанный по методу соотношения рефлексов, —  $0,5647 \pm 0,0049$  у.е. (табл. 1).

Поскольку кристаллическое строение интактного костного вещества неоднократно описано как в литературных источниках, так и в наших предыдущих исследованиях, исходя из цели исследования, исследования в группе интактных животных не проводились [3, 10].

В 1 группе на 7 день эксперимента размеры элементарных ячеек вдоль осей *c* и *a* составили соответственно  $6,845 \pm 0,003$  ( $\times 10^{-10}$  М) и  $9,389 \pm 0,003$  ( $\times 10^{-10}$  М), что несколько больше, чем в интактной кости [3]. Это является следствием дестабилизации элементарных ячеек и объясняется тем, что в области дефекта наряду с активными процессами образования костного вещества протекает и резорбция костных отломков, которые остались после операции.

На 15 день наблюдения размеры элементарных ячеек вдоль осей *c* и *a* составили соответственно уже  $6,830 \pm 0,003$  ( $\times 10^{-10}$  М) и  $9,378 \pm 0,003$  ( $\times 10^{-10}$  М), что меньше, чем в интактной кости и является проявлением активного формирования элементарных ячеек вновь образованного костного минерала. В дальнейшем размеры элементарных ячеек костного минерала постепенно увеличивались и к 90 и 180 дням соответствовали показателям интактного костного вещества у одновозрастных половозрелых крыс.

Размеры блоков когерентного рассеивания на 7 день наблюдения составляли  $35,64 \pm 0,75$  нМ, что, по данным литературы, меньше, чем у интактных животных. В последующем раз-

меры кристаллитов постепенно возрастали и к 180 дню наблюдения соответствовали справочным значениям для интактных одновозрастных крыс. Такая динамика является проявлением активного роста кристаллитов новообразованного костного минерала и свидетельствует об увеличении его общей обменной поверхности в ранние периоды наблюдения в сравнении с интактной костью (табл. 1).

Следует отметить, что хотя параметры элементарных ячеек гидроксилapatита у подопытных животных достаточно часто статистически достоверно отличались от контрольных, амплитуда отклонений составляла, как правило, лишь 0,3-0,4%. Это объясняется тем, что как раз параметры элементарной ячейки из всей совокупности исследуемых кристаллографических показателей являются наиболее стабильными и их величина определяет вид минерала. Статистическая достоверность отличий при этом проявлялась за счет достаточно высокой точности измерений и достаточного количества наблюдений.

Значение коэффициента микротекстурирования в 1 группе на 7 день составило  $0,3999 \pm 0,0095$  у.е. Это меньше, чем в интактной кости, и обусловлено полиморфностью элементов, что находятся в области дефекта (обломки кости, соединительная ткань, новообразованная костная ткань и др.) и создают препятствия для формирования однородной кристаллической решетки костного минерала.

С увеличением сроков наблюдения коэффициент микротекстурирования начинал возрастать. Это объясняется тем, что дефект заполняется грубоволокнистой костной тканью с высокой степенью однородности. Позднее грубоволокнистая костная ткань замещается пластинчатой, начинаются процессы ремоделиации, в результате чего кристаллы костного минерала выстраиваются вдоль линий силового напряжения. В результате значения коэффициента микротекстурирования к 90 и 180 дням несколько понижаются.

При имплантации в область дефекта материала ОК-015 (2 группа) размеры элементарных ячеек костного минерала регенерата вдоль осей *c* и *a* были меньше контрольных (1 группа) на 0,19% и 0,25% соответственно. Это связано с тем, что в регенерате в этот период находится значительное количество материала ОК-015, размеры элементарных ячеек которого меньше показателей костного минерала (табл. 1).

В дальнейшем наблюдалась тенденция к увеличению размеров элементарных ячеек. Так, размеры вдоль оси *a* в период с 15 по 90 день эк-

сперимента превосходили показатели 1 группы соответственно на 0,18%; 0,03%; 0,13% и 0,08%, а размеры вдоль оси *c* — на 0,17%; 0,19%; 0,17% и 0,09%. Поскольку изменения размеров ячеек были однонаправленными, соотношение *c/a* достоверно не изменялось. Все это является свидетельством дестабилизации элементарных ячеек (вероятно, в первую очередь имплантированного материала), их разрушения и резорбции, а также создания условий для активного роста ячеек новообразованного костного минерала в период до 90 дня наблюдения.

Размеры блоков когерентного рассеивания в образцах 2 группы к 7 дню эксперимента были меньше контрольных на 26,79% ( $p < 0,05$ ). Это является проявлением, с одной стороны, активного формирования кристаллов костного ГОА, а с другой — наличием в регенерате недеградировавших частиц ОК-015, размеры кристаллов которого намного меньше, чем у костного ГОА. На 15 день размеры кристаллитов уже превосходили показатели 1 группы на 19,14%. Это является свидетельством интенсивной резорбции имплантированного материала, которая ведет к увеличению степени аморфности ОК-015. В дальнейшем достоверные отклонения не наблюдались, что является свидетельством интенсивного течения процессов ремоделиации новообразованной костной ткани в регенерате на фоне уменьшения скорости биологической резорбции ОК-015.

Коэффициент микротекстурирования во 2 группе достоверно уменьшался в сравнении со значениями 1 группы на 8,89% на 7 день, на 14,12% на 30 день, на 13,47% на 60 день и на 7,40% на 90 день эксперимента. Таким образом, с увеличением сроков эксперимента его значения несколько повышались, хотя и оставались меньше контрольных. Такая динамика связана с тем, что нерезорбированные частицы ОК-015 создают препятствия для формирования упорядоченной кристаллической решетки костного минерала. После 60 дня, с увеличением степени резорбции частиц имплантата, отклонения значений коэффициента микротекстурирования несколько нивелируются.

Имплантация ОК-015, легированного селеном в различных концентрациях (3-5 группы), в сравнении с 1 группой сопровождалась изменениями фазового состава биоминерала регенерата, аналогичными по направленности показателям 2 группы (ОК-015 без легирования селеном).

Сравнение полученных результатов со значениями 2 группы выявило, что в 3 группе (ОК-015, легированный селеном в концентрации

0,15%) размеры элементарных ячеек костно-керамического регенерата достоверно не изменялись. В 4 группе размер ячейки вдоль оси *a* был меньше контрольных значений (2 группа) лишь к 15 дню — на 0,08% ( $p < 0,05$ ), а в 5 группе — к 15 и 60 дням — соответственно на 0,11% ( $p < 0,05$ ) и 0,13% ( $p < 0,05$ ). Размеры элементарных ячеек вдоль оси *c* в 4 группе (концентрация селена в имплантате 0,30%) были меньше значений 2 группы к 30 и 60 дням соответственно на 0,11% и 0,12%. В том случае, когда имплантированный материал содержал селен в концентрации 0,50%, размеры элементарных ячеек вдоль оси *c* были меньше значений 2 группы в период с 15 по 60 день соответственно на 0,12%; 0,15% и 0,18% ( $p < 0,05$ ). Такие изменения можно расценивать как ускорение темпов биологической резорбции имплантата при присутствии в нем селена в концентрациях 0,30% и 0,50%.

Размеры блоков когерентного рассеивания костного регенерата в присутствии в имплантате селена к 7 дню наблюдения были больше показателей 2 группы: на 8,95% в 3 группе, на 18,03% в 4 группе и на 14,87% в 5 группе ( $p < 0,05$  во всех случаях). К 15 дню размеры кристаллитов уже были меньше значений группы с имплантацией материала без легирования селеном соответственно на 9,55% в 3 группе, на 13,59% в 4 группе и на 19,17% в 5 группе. Такие изменения также подтверждают предположение об ускорении темпов биологической резорбции имплантата при присутствии в нем селена. Причем, наиболее предпочтительной является концентрация селена в имплантате 0,30% и 0,50%.

В условиях присутствия в имплантатах селена коэффициент микротекстурирования изменялся следующим образом: его значения были больше показателей без легирования к 7, 30 и 60 дням соответственно в 3 группе на 11,18% ( $p < 0,05$ ), 7,16% и 7,79% ( $p < 0,05$ ), в 4 группе — на 11,40%, 8,77% ( $p < 0,05$ ) и 11,36% ( $p < 0,05$ ) и в 5 группе — на 11,86% ( $p < 0,05$ ), 14,62% ( $p < 0,05$ ) и 11,36% ( $p < 0,05$ ). Это свидетельствует о том, что в присутствии селена в имплантате препятствий для формирования упорядоченной кристаллической решетки образуется меньше, а следовательно, подтверждает тот факт, что в условиях эксперимента ускоряются процессы биодеградации имплантируемого материала ОК-015.

## Выводы

Наличие селена в имплантируемом материале ОК-015 сопровождается оптимизацией ультраструктуры кристаллической решетки формирующегося регенерата. Выявленные

изменения следует рассматривать как ускорение процессов биорезорбции имплантированного материала ОК-015 и формирования регенерата в присутствии ионов селена. Наиболее предпочтительной является концентрация селена в имплантируемом материале в пределах 0,30-0,50%.

Перспективы дальнейших исследований: для подтверждения выявленных закономерностей и предположений будет проведено исследование гистологического строения регенерата, формирующегося при пластике костных дефектов биогенным гидроксилapatитом, легированным селеном.

### Литература

1. Азаров Л.В., Бургер М.Й. Метод порошка в рентгенографии. — М.: Изд-во иностранной литературы, 1961. — 363 с.
2. Ивченко В.К., Лузин В.И., Ивченко Д.В., Скоробогатов А.Н., Панкратьев А.А. Особенности химического состава регенерата, формирующегося при пластике костных дефектов материалами на основе гидроксиапатита с различным содержанием марганца / Новое в травматологии и ортопедии. Материалы Всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 50-летию НИИ травматологии и ортопедии Донецкого государственного медицинского университета им. М.Горького. — Донецк, 2006. — С. 25-26.
3. Лузин В.И., Бережной Е.П., Кучеренко С.Л., Глушенко Р.В. Сравнительное исследование ультраструктуры костного и керамического гидроксиапатита методом рентгеноструктурного анализа // Таврический медико-биологический вестник. — 2006. — Т. 9, №3. — С. 105-108.
4. Лузин В.И., Ивченко В.К., Ивченко Д.В., Скоробогатов А.Н., Лубенец А.А. Особенности продольного роста длинных трубчатых костей при имплантации в метадиафизарную зону «Остеоапатита керамического — 015» с различным содержанием марганца // Український морфологічний альманах. — 2006. — Т. 4, №2. — С. 108-111.
5. Лузин В.И., Ивченко Д.В., Панкратьев А.А., Скоробогатов А.Н., Самойленко А.А. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных // Український медичний альманах. — 2005. — Т. 8, №2 (додаток). — С. 162.
6. Миркин Л.И. Рентгеноструктурный анализ. Индексирование рентгенограмм. Справочное руководство. — М.: Наука, 1981. — 496 с.
7. Михеев В.И. Рентгенометрический определитель минералов. — М.: Гостеолиздат, 1957. — 868 с.
8. Подрушняк Е.П., Новохацкий А.И. Ультраструктура минерального компонента и прочность костной ткани позвонков у людей различного возраста // Ортопед. травматол. — 1983. — №8. — С. 15-18.
9. Пономарев В.В. Рентгеноструктурные методы исследования в инженерной геологии. — М.: Недра, 1981. — 194 с.
10. Luzin V.I., Ivchenko V.K., Ivchenko A.V., Skorobogatov A.N., Pankratyev A.A. Cechy związkyw chemicznych regeneratu ubytkuw przynasad wypełnionych materiałem opartym na hydroksyapatycie // Ortopedia, Traumatologia, Rehabilitacja. — 2005. — Vol. 7 (Suppl. 1). — P. 69.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasbourg, 1986. — 52 p.

***В.К.Івченко, В.І.Лузін, Д.В.Івченко, А.М.Скоробогатов. Ультраструктура кісткового мінералу при пластиці дефектів біогенним гідроксиапатитом, легуванням селеном. Луганськ, Україна.***

***Ключові слова:*** кістковий дефект, гідроксиапатит, кістковий мінерал, селен.

*В експерименті за даними рентгеноструктурного аналізу встановлено, що легування біогенного гідроксиапатитного матеріалу ОК-015 селеном супроводжується активізацією процесів його біологічної резорбції. Найбільш ефективною концентрацією селену в імплантованому матеріалі є концентрація в межах 0,30-0,50%. Зроблено припущення, що присутність іонів селену в ділянці регенерату, що формується, оптимізує процеси репаративної регенерації кістки.*

***V.K.Ivchenko, V.I.Luzin, D.V.Ivchenko, A.N.Skorobogatov. Ultrastructure crystal analysis of bone regenerate after filling of bone defects with selenium enhanced implants. Lugansk, Ukraine.***

***Key words:*** bone defeat, hydroxylapatite, bone mineral, selenium.

*In the experiment we demonstrated that enhancing of conventional hydroxyapatite with selenium results in more active resorption of ceramic implanted. The most preferred concentration ranges within 0,30-0,50%. Basing on the data obtained we assumed that selenium ions optimize regeneration processes.*

*Надійшла до редакції 30.03.2009 р.*