

УДК 611.018.4"45"

© Лузин В.И., Северина-Смирнова А.С., 2012

УЛЬТРАСТРУКТУРА БИОМИНЕРАЛОВ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТОВ КАЛЬЦИЯ И ИМПЛАНТАЦИИ В БОЛЬШЕБЕРЦОВУЮ КОСТЬ БИОГЕННОГО ГИДРОКСИЛАПАТИТА

Лузин В.И., Северина-Смирнова А.С.

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»

Общеизвестно, что переломы костей являются фактором риска для развития системного остеопенического синдрома – то есть на перелом отдельной кости реагирует костная система в целом, а не только поврежденный сегмент скелета [1-3]. В предшествующих исследованиях было показано, что нанесение сквозного дырчатого дефекта в проксимальных отделах диафиза сопровождается угнетением темпов роста костей скелета, дисбалансом их химического состава, а также снижением прочности [4-5]. В то же время практически отсутствуют сведения об особенностях морфогенеза нижних челюстей в условиях травматического повреждения одного из отделов скелета, при пластике костного дефекта различными материалами, а также при применении для оптимизации процессов репаративной регенерации различных фармакологических препаратов. Поскольку нижняя челюсть имеет достаточно сложное онтогенетическое происхождение и находится в уникальных, в сравнении с остальными отделами скелета, биомеханических условиях, исследование особенностей ее морфогенеза в условиях травматического повреждения костей представляется весьма актуальным.

Цель настоящего исследования - исследование ультраструктуры биоминералов нижней челюсти белых крыс при нанесении дефекта большеберцовых костей, заполнении его биогенным гидроксилapatитным материалом ОК-015, а также обосновать возможности коррекции выявленных отклонений биологически активной добавкой на основе фосфата кальция «Биомин».

Связь работы с научными программами, планами, темами. Статья является фрагментом межкафедральной научно-исследовательской работы Луганского государственного медицинского университета «Морфогенез костей скелета при заполнении костных дефектов гидроксилapatитными материалами различного состава» (государственный регистрационный № 0109U004621).

Материал и методы исследования. Исследования проведены на 210 белых крысах-самцах с исходной массой тела 135-145 г, распределенных на пять групп: 1-ая группа - интактные животные, 2-ая группа – животные, которым были сформированы сквозные костные дефекты на границе проксимального метафиза и диафиза большеберцовой кости (ББК) диаметром 2,2 мм [6]. Поскольку передне-задний размер ББК в этой области состав-

ляет у крыс данного возраста в среднем 3,5-3,6 мм, целостность костного органа и функциональная нагрузка на него сохраняются. В 3-ей группе в нанесенный дефект имплантировали блоки биогенного гидроксилapatита диаметром 2,2 мм, содержащего стеклофазу (материал ОК-015). Крысам 4-й группы наносили дефект большеберцовой кости (аналогично 2-й группе) и внутрижелудочно через зонд вводили кальций содержащую биологически активную добавку отечественного производства «Биомин». Наконец, в 5-й группе в дефект большеберцовой кости имплантировали ОК-015 и также внутрижелудочно через зонд вводили кальцийсодержащую биологически активную добавку отечественного производства «Биомин» в терапевтической дозировке. Все манипуляции на животных выполняли в соответствии с правилами европейской конвенции защиты позвоночных животных, использующихся в экспериментальных и других научных целях [7].

По истечении сроков эксперимента (7, 15, 30, 90 и 180 дней) животных декапитировали под эфирным наркозом, выделяли нижние челюсти и исследовали методом рентгеноструктурного анализа [4]. Выделяли костное вещество тела нижней челюсти, а также резец, от которого при помощи бормашины отделяли эмаль и цемент. Исследование порошка костного вещества и дентина резца, полученного в агатовой ступке, проводили 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 [1, 5]. На полученных дифрактограммах исследовали наиболее выраженные дифракционные пики, по угловому положению которых рассчитывали размеры блоков когерентного рассеивания по уравнению Селякова-Шерера и рассчитывали коэффициент микротекстурирования по методу соотношения рефлексов [4, 8].

Все полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием стандартных прикладных программ [3].

Результаты и обсуждение. У интактных животных с 7 по 180 день наблюдения размер элементарной ячейки костного биоминерала вдоль оси a увеличивался с $9,380 \pm 0,001 \cdot 10^{-10}$ М до $9,390 \pm 0,004 \cdot 10^{-10}$ М, а размер элементарной

ячейки вдоль оси c – с $6,840 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М до $6,850 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М. При этом соотношение размеров c/a практически не изменялось и колебалось в пределах $72,94-73,04 \cdot 10^{-2}$, что свидетельствует о равновесии между процессами кристаллизации и резорбции неорганического матрикса кости у животных репродуктивного возраста.

Размеры блоков когерентного рассеивания у интактных крыс в ходе наблюдения возрастали с нМ $40,77 \pm 0,64$ до $43,94 \pm 0,53$ нМ, а коэффициент микротекстурирования увеличивался с $0,39 \pm 0,005$ у.е. до $0,43 \pm 0,001$ у.е.

В условиях нанесения дефектов большеберцовых костей у крыс репродуктивного возраста размеры элементарных ячеек биоминерала губчатого вещества кости нижней челюсти вдоль осей a и c превосходили аналогичные показатели одновозрастных интактных животных в период с 7 по 30 дни эксперимента соответственно на 0,12%, 0,22% и 0,15% и 0,16%, 0,27% и 0,15%. Что касается коэффициента микротекстурирования, то его значения были меньше контрольных во все установленные сроки эксперимента соответственно на 7,45% ($p > 0,05$), 16,45%, 12,08%, 12,30%.

Таким образом, у животных репродуктивного возраста в условиях эксперимента изменения ультраструктуры костного минерала губчатого вещества нижней челюсти проявлялись с 7 дня наблюдения и нарастали к 30 дню, после чего постепенно сглаживались. При этом и к 180 дню эксперимента определялось достоверное уменьшение коэффициента микротекстурирования по сравнению с контрольной группой на 2,20%.

Имплантиция в дефект большеберцовой кости блока из материала ОК-015 также сопровождалось изменениями ультраструктуры губчатого вещества кости нижней челюсти, но выраженность их отличалась от 2-й группы.

Размеры элементарных ячеек вдоль оси a превосходили показатели интактных крыс в период с 7 по 60 дни эксперимента соответственно на 0,14% ($p < 0,05$), 0,24% ($p < 0,05$), 0,25% и 0,04%; размеры вдоль оси c – на 0,21% ($p < 0,05$), 0,29% ($p < 0,05$), 0,33% и 0,14%, а размеры кристаллитов – на 9,42%, 15,97% ($p < 0,05$), 20,63% и 7,2% ($p < 0,05$). Коэффициент микротекстурирования был достоверно меньше контрольных показателей в период с 7 по 30 дни – на 9,10%, 8,50% и 8,65%.

Достоверные отличия от показателей 2-й группы проявлялись в более поздних сроках эксперимента (к 60 и 90 дню). Размеры элементарных ячеек вдоль оси a были меньше контрольных на 0,08% и 0,04%; размеры вдоль оси c – на 0,17% ($p < 0,05$) и 0,06%. Коэффициент микротекстурирования был достоверно больше на 7,35% лишь к 60 дню эксперимента.

Применение «Биомина» на фоне нанесения дефекта большеберцовой кости у животных репродуктивного возраста также сглаживало

явления дестабилизации ультраструктуры биоминерала кости нижней челюсти, поскольку достоверные отклонения от показателей интактных животных сохранялись лишь до 60 дня эксперимента.

В условиях применения «Биомина» у репродуктивных животных размеры элементарных ячеек вдоль оси a превосходили показатели интактных крыс в период с 7 по 30 дни эксперимента соответственно на 0,15% ($p < 0,05$), 0,23% ($p < 0,05$) и 0,10%, размеры вдоль оси c – на 0,20% ($p < 0,05$), 0,12% ($p < 0,05$) и 0,14%, а размеры кристаллитов – на 11,00% ($p < 0,05$), 11,30% и 9,79% ($p < 0,05$). Коэффициент микротекстурирования в этой возрастной группе лишь к 60 дню был достоверно меньше контрольных показателей – на 8,67%.

Достоверных отличий от показателей 2-й группы не было выявлено, однако следует отметить, что в отличие от 2-й группы к 30 дню от показателей интактных животных отличались лишь размер блоков когерентного рассеивания и коэффициент микротекстурирования – на 6,67% и 2,96%, а к 90 дню достоверные отличия от интактных животных вообще не определялись.

Наконец, применение «Биомина» на фоне имплантации в дефект большеберцовой кости биогенного гидроксилатапата ОК-015 провоцировало интенсификацию процессов биорезорбции имплантата и репаративную регенерацию в области дефекта большеберцовой кости в ранние сроки эксперимента и нивелировались в более поздних сроках, как по отношению к контрольной группе интактных животных, так и по отношению к 3-й группе.

Размеры элементарных ячеек вдоль оси a превосходили показатели 3-й группы животных на 7 день эксперимента на 0,05% ($p < 0,05$), на 15 и 30 дни показатели были меньше на 0,02% и 0,11%. Размеры вдоль оси c в период с 7 по 30 дни были меньше на 0,04% ($p < 0,05$), 0,11% ($p < 0,05$) и 0,16%. Размеры кристаллитов были меньше (к 15 и 30 дню) – на 3,38% ($p < 0,05$) и 7,53% ($p < 0,05$). Коэффициент микротекстурирования был достоверно больше контрольных показателей 15 дня на 4,95%.

У интактных животных с 7 по 180 дни наблюдения размеры элементарных ячеек биоминерала дентина резца вдоль оси a увеличивались с $9,36 \pm 0,004 \cdot 10^{-10}$ М до $9,37 \pm 0,004 \cdot 10^{-10}$ М, а размеры элементарных ячеек вдоль оси c – с $6,82 \pm 0,004 \cdot 10^{-10}$ М до $6,83 \pm 0,005 \cdot 10^{-10}$ М. При этом соотношение размеров c/a практически не изменялось и колебалось в пределах $72,81-72,86 \cdot 10^{-2}$.

Размеры блоков когерентного рассеивания у интактных крыс в ходе наблюдения возрастали с $28,86 \pm 0,36$ нМ до $32,64 \pm 0,42$ нМ, а коэффициент микротекстурирования увеличивался с $0,56 \pm 0,001$ у.е. до $0,57 \pm 0,004$ у.е.

В условиях нанесения дефектов больше-

берцовых костей у крыс репродуктивного возраста размеры элементарных ячеек биоминерала дентина вдоль оси *c* превосходили аналогичные показатели одновозрастных интактных животных к 90 дню эксперимента на 0,15%. Что касается коэффициента микротекстурирования, то его значения были меньше контрольных в период с 30 по 180 день соответственно на 1,47% ($p > 0,05$), 2,25%, 2,488%, 4,18%.

Таким образом, у животных репродуктивного возраста в условиях эксперимента изменения ультраструктуры биоминерала дентина резца нижней челюсти проявлялись с 30 дня наблюдения и нарастали к 90 дню, после чего постепенно сглаживались. При этом и к 180 дню эксперимента определялось достоверное уменьшение коэффициента микротекстурирования по сравнению с контрольной группой на 4,18%.

Имплантация в дефект большеберцовой кости блока из материала ОК-015 также сопровождалась изменениями ультраструктуры дентина, но выраженность их отличалась от 2-й группы.

Размеры элементарных ячеек вдоль оси *c* превосходили аналогичные показатели интактных одновозрастных животных с 30 по 90 день эксперимента – на 0,14% ($p < 0,05$), 0,17% ($p < 0,05$) и 0,17%, а размеры кристаллитов – на 4,94%, 7,85% ($p < 0,05$) и 6,39% ($p < 0,05$). Коэффициент микротекстурирования был достоверно меньше контрольных показателей в период с 30 по 90 дни – на 3,72%, 3,75% и 1,47%.

Достоверные отличия от показателей 2-й группы проявлялись в более поздние сроки эксперимента – коэффициент микротекстурирования был достоверно больше контрольного к 90 дню эксперимента на 1,03%.

Применение «Биомина» на фоне нанесения дефекта большеберцовой кости у животных репродуктивного возраста сглаживало явления дестабилизации ультраструктуры биоминерала зубов, поскольку достоверные отличия от показателей 2-й группы выявлялись лишь к 90 дню эксперимента (размеры кристаллитов были меньше на 3,38%).

Применение «Биомина» на фоне имплантации в дефект большеберцовой кости биогенного гидроксилатапата ОК-015 провоцировало интенсификацию процессов биорезорбции имплантата и репаративную регенерацию в области дефекта большеберцовой кости в ранние сроки эксперимента и нивелировались в более поздних сроках, как по отношению к контрольной группе интактных животных, так и по отношению к 3-й группе – что и отражалось в ультраструктуре зубов. Достоверные отличия определялись на 30 день эксперимента по отношению к интактной группе животных: размеры элементарных ячеек вдоль оси *c* превосходили показатели интактных на 0,13%. Размеры кристаллитов превосходили показатели 3-й группы животных и были меньше (60 и 90 дни) – на 5,15% ($p < 0,05$) и 4,34% ($p < 0,05$).

Заключение. Полученные результаты позволяют утверждать, что нанесение незаполненного дефекта диаметром 2,2 мм на границе проксимального метафиза и диафиза большеберцовых костей сопровождается дисбалансом ультраструктуры биологических минералов костного вещества и дентина резца нижней челюсти. Амплитуда отклонений при этом зависела от активности процессов репаративной регенерации. Имплантация в область нанесенного дефекта биогенного гидроксилатапата ОК-015 сопровождается аналогичными отклонениями, более выраженными в ранние сроки, которые к поздним срокам наблюдения полностью нивелируются. Применение биологически активной добавки «Биомин» как в условиях незаполненного дефекта, так и при заполнении его материалом ОК015 в значительной степени сглаживает выявленные отклонения с 30 дня эксперимента.

Во всех случаях выявленные отклонения были выражены в костном биоминерале сильнее, чем в биоминерале дентина.

Перспективы дальнейших исследований. Для подтверждения полученных результатов в дальнейшем будет проведено биомеханическое исследование нижней челюсти в условиях нашего эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение: Монография / Акад. мед. Наук Украины; Под ред. Н.А.Коржа, В.В.Поворожняка, Н.В. Дедух, И.А.Зупанца. – Х.: Золотые страницы, 2002. – 648 с.
2. **Виноградова Т.П.** Регенерация и пересадка костей / **Т.П. Виноградова, Г.И. Лаврищева.** – М.: Медицина. 1974. – 248 с.
3. Bone mineral changes during tibial fracture healing / **Н.С. Cattermole, J.E. Cook, J.N. Fordham,** [et al.] // Clin. Orthop. – 1997. – Vol.339. – P.190-196.
4. Минеральная насыщенность различных отделов скелета при имплантации в большеберцовую кость „Остеоапатита керамического – 015” / В.И. Лузин, И.Г. Новоскольцева, В.В. Стрий, [и др.] // Український морфологічний альманах. – 2007. – Том 5, №2. – С.114-115.
5. Особенности роста и формирования костей скелета при имплантации в большеберцовую кость «Остеоапатита керамического»-015, легированного марганцем / **В.К. Ивченко, В.И. Лузин, А.А. Лубенец, Д.В. Ивченко** // Український морфологічний альманах. – 2007. – Том 5, №2. – С.114-115.
6. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В.И. Лузин,

Д.В. Ивченко, А.А. Панкратьев, [и др.] // Украинский медицинский альманах. – 2005. – Том 8, №2 (додаток). – С. 162.

7. 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.

8. **Азаров Л.В.** Метод порошка в рентгенографии / **Л.В.Азаров, М.И.Бургер** / - М.: Изд-во иностранной литературы, 1961. - 363 с.

9. **Миркин Л.И.** Рентгеноструктурный анализ. Индексирование рентгенограмм: справочное руководство / **Миркин Л.И.** – М.: Наука,

1981. – 496 с.

10. **Михеев В.И.** Рентгенометрический определитель минералов / **Михеев В.И.** – М.: Госгеолтехиздат., 1957. – 868 с.

11. **Подрушник Е.П.** Ультраструктура минерального компонента и прочность костной ткани позвонков у людей различного возраста / **Е.П.Подрушник, А.И. Новохацкий** // Ортопед. травматол. - 1983. - №8. - С.15-18.

12. **Лапач С.Н.** Основные принципы применения статистических методов в клинических испытаниях / **С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич.** – Киев: Морион, 2002. – 160 с.

Лужин В.И., Северина-Смирнова А.С. Ультраструктура биоминералов нижней челюсти белых крыс при пероральном применении препаратов кальция и имплантации в большеберцовую кость биогенного гидроксилапатита // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, №2. – С. 99-102.

Установили, что нанесение незаполненного дефекта диаметром 2,2 мм на границе проксимального метафиза и диафиза большеберцовых костей сопровождается дисбалансом ультраструктуры биологических минералов костного вещества и дентина резца нижней челюсти. Амплитуда отклонений при этом зависела от активности процессов репаративной регенерации. Имплантация в область нанесенного дефекта биогенного гидроксилапатита ОК-015 сопровождается аналогичными отклонениями, более выраженными в ранние сроки, которые к поздним срокам наблюдения полностью нивелируются. Применение биологически активной добавки «Биомирин» как в условиях незаполненного дефекта, так и при заполнении его материалом ОК015 в значительной степени сглаживает выявленные отклонения с 30 дня эксперимента. Во всех случаях выявленные отклонения были выражены в костном биоминерале сильнее, чем в биоминерале дентина.

Ключевые слова: крысы, нижняя челюсть, биоминерал, костный дефект, гидроксилапатит.

Лужин В.И., Северина-Смирнова А.С. Ультраструктура біомінералів нижньої щелепи білих щурів при пероральному застосуванні препаратів кальцію і імплантації до великогомілкової кістки біогенного гідроксилапатиту // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, №2. – С. 99-102.

Встановили, що нанесення незаповненого дефекту діаметром 2,2 мм на межі проксимального метафіза і діафіза великогомілкової кістки супроводжується дисбалансом ультраструктури біологічних мінералів кісткової речовини і дентину різця нижньої щелепи. Амплітуда відхилень при цьому залежала від активності процесів репаративної регенерації. Імплантація в область нанесеного дефекту біогенного гідроксилапатиту ОК-015 супроводжується аналогічними відхиленнями, більш вираженими в ранні терміни, які пізніше повністю нівелюються. Застосування біологічно активної добавки «Біомирин» як в умовах незаповненого дефекту, так і при заповненні його матеріалом ОК015 в значній мірі згладжує виявлені відхилення з 30 дня експерименту. У всіх випадках виявлені відхилення були виражені в кістковому біомінералі сильніше, ніж в біомінералі дентину.

Ключові слова: щури, нижня щелепа, біомінерал, кістковий дефект, гідроксилапатит.

Luzin V.I., Severina-Smirnova A.S. Mandible biomineral ultrastructure in white rats at peroral application of drugs of calcium and implantation in a tibial bone biogenic hydroxyapatite // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, №2. – С. 99-102.

Found that application of an unfilled defect diameter of 2.2 mm at the boundary of the proximal metaphysis and diaphysis of the tibial bone is accompanied by an imbalance of bone mineral ultrastructure of biological material and the dentin incisor of the mandible. The amplitude of the deviations in this case depended on the activity of the processes of reparative regeneration. Implantation into the area caused by nutrient deficiency hydroxyapatite ОК-015 is accompanied by similar variations are more pronounced in the early stages, which dates to the late observations completely leveled. The use of dietary supplements, "Biomin" as in the unfilled defect and filling his material ОК015 significantly smoothes the identified deviations from 30 days of the experiment. In all cases, the identified deviations were expressed in bone biominerals stronger than in biominerals dentine.

Key words: rats, mandible, biomineral, bone defect, hydroxyapatite.

Надійшла 25.01.2012 р.
Рецензент: проф. С.А.Кащенко