

УДК 611.71:616.71-089.843  
© Лузин В.И., Бережной Е.П., 2009

## МАКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ ПРИ ПЛАСТИКЕ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ КЕРАМИЧЕСКИМ ГИДРОКСИЛАПАТИТОМ И ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННЫМ КОСТНЫМ МАТРИКСОМ Лузин В.И., Бережной Е.П.

*Луганский государственный медицинский университет*

**Лузин В.И., Бережной Е.П.** Макроэлементный состав большеберцовой кости при пластике костных дефектов керамическим гидроксиллапатитом и деминерализованным костным матриксом // Украинский морфологический альманах. – 2009. – Том 7, №3. – С. 49-52.

В эксперименте на 210 белых крысах выявлены основные закономерности динамики содержания остеотропных макроэлементов в большеберцовой кости при имплантации в нее керамического гидроксиллапатита, деминерализованного костного матрикса и их сочетания. Доказано, что комбинированная имплантация керамического гидроксиллапатита и деминерализованного костного матрикса сопровождается наиболее активными процессами их биологической деградации.

**Ключевые слова:** крысы, костный дефект, пластика, остеотропные макроэлементы, керамический гидроксиллапатит, деминерализованный костный матрикс.

**Лузин В.И., Бережной Е.П.** Макроэлементный состав большеберцовой кости при пластике костных дефектов керамическим гидроксиллапатитом и деминерализованным костным матриксом // Украинский морфологический альманах. – 2009. – Том 7, №3. – С. 49-52.

В експерименті на 210 білих щурах визначені провідні закономірності динаміки вмісту остеотропних макроелементів у великогомілкової кістки при імплантації до неї керамічного гідроксиллапатиту, демінералізованого кісткового матриксу та їх комбінації. Доведено, що комбіноване застосування керамічного гідроксиллапатиту, демінералізованого кісткового матриксу супроводжується найбільш активними процесами їх біологічної резорбції.

**Ключові слова:** щури, кістковий дефект, пластика, остеотропні макроелементи, керамічний гідроксиллапатит, демінералізований кістковий матрикс.

**Luzin V.I., Berzhenoy E.P.** Macroelement composition of the tibial bone at plastic of bone defects by ceramic hydroxylapatite and demineralized bone matrix // Украинский морфологический альманах. – 2009. – Том 7, №3. – С. 49-52.

Researched the basic patterns of dynamics of the maintenance bone macroelements in a tibial bone are taped at implantation in it ceramic hydroxyapatite, demineralized bone matrix and their combination. It is proved, that the combined implantation ceramic hydroxyapatite and demineralized bone matrix is accompanied by the most awake processes of their biological degradation.

**Key words:** rats, bone defect, plastic, bone macroelements, ceramic hydroxyapatite, demineralized bone matrix.

**Введение.** Заживление костных дефектов вызывает как в организме, так и в поврежденном костном органе сложные изменения, зависящие от общих и местных условий. Особенности метаболических реакций костной системы, как в нормальных условиях, так и после травмы, а особенно реакции, протекающие в зоне процессов репаративной регенерации и возможности их оптимизации изучены достаточно подробно и продолжают изучаться в настоящее время. Однако, в доступной литературе практически отсутствуют сведения о том, как изменяется химический состав костного вещества при имплантации в костный орган различных костно-пластических материалов. **Цель данного исследования:** изучить в эксперименте макроэлементный состав большеберцовых костей у белых крыс репродуктивного возраста при имплантации в их проксимальную часть диафиза керамического гидроксиллапатита и деминерализованного костного матрикса. Работа является фрагментом межкафедральной научно-исследовательской работы Луганского государственного университета “Морфогенез костей

скелета при заполнении костных дефектов гидроксиллапатитными материалами различного состава” (государственный регистрационный № 0109U004621).

**Материал и методы исследования.** Исследования были проведены на 210 белых крысах-самцах с исходной массой тела 130-150 г, распределенных на пять групп: 1-я (К) – это группа интактных животных, 2-я (А) – животные, которым формировали сквозные костные дефекты на границе проксимального метафиза и диафиза большеберцовой кости (ББК) диаметром 2,2 мм [4], в 3-й группе (А) дефект заполняли порошкообразным керамическим гидроксиллапатитом (КГОА) с размером частиц менее 63 мкм (производства НПП КЕРГАП, Украина), в 4-й (В) – измельченным деминерализованным костным матриксом (ДКМ) и в 5-й (С) – комбинацией КГОА с измельченным ДКМ в соотношении 2:1. 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, 60, 90 и 180 дней) крыс забивали путем декапитации под эфирным наркозом. У животных освобождали от мягких тканей скелета большеберцовые кости, выделяли фрагмент, соответствующий зоне нанесенного дефекта и имплантации и озоляли его в муфельной печи при температуре 450-500°C в течение 12 часов [5]. Полученную золу растирали в фарфоровой ступке и хранили в герметичных микропробирках. Для дальнейшего исследования 10 мг золы растворяли в 2 мл 0,1 Н химически чистой соляной кислоты и доводили до 25 мл бидистиллированной водой. В полученном растворе определяли содержание натрия, калия, кальция и магния на атомно-абсорбционном фотометре типа "Сатурн"-2 в режиме эмиссии в воздушно-пропановом пламени [1, 6], а также содержание фосфора колориметрически по Бригсу на электрофотоколориметре КФК-3 [2].

Все использованные измерения и параметры приведены в соответствие с международной системой единиц. Полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием прикладного пакета STATISTICA 5.11 for Windows.

**Результаты и их обсуждение.** Интерпретацию полученных результатов проводили при обязательном сравнении с аналогичными показателями у одновозрастных интактных животных (табл.).

За период наблюдения (с 7 по 180 день) в минеральном компоненте метадиафизарной области большеберцовой кости у крыс 1-й группы содержание кальция увеличилось с  $20,30 \pm 0,42\%$  до  $24,13 \pm 0,21\%$ , фосфора – с  $19,43 \pm 0,65\%$  до  $20,06 \pm 0,19\%$ , а кальций-фосфорный коэффициент с  $1,05 \pm 0,04$  до  $1,20 \pm 0,01$ . Содержание магния в золе большеберцовой кости также увеличивалось – с  $3,33 \pm 0,04\%$  до  $4,03 \pm 0,09\%$ , доли гидрофильных элементов (натрия и калия) уменьшались соответственно с  $1,71 \pm 0,03\%$  до  $1,21 \pm 0,01\%$  и с  $1,09 \pm 0,03\%$  до  $0,73 \pm 0,04\%$ .

Такая динамика макроэлементного состава большеберцовой кости свидетельствует о продолжающихся в скелете процессах роста и об увеличении степени кристаллизации костного минерала.

При нанесении незаполненного костного дефекта (2-я группа) содержание кальция в минерале регенерата к 7 дню наблюдения было меньше, чем у интактных животных, на 25,33%. По мере увеличения сроков с момента нанесения дефекта содержание кальция в костной золе постепенно увеличивалось: к 15 дню оно было меньше контроля на 20,07%. к 30 дню – на 13,03%, к 60 дню – на 13,76%, а к

90 дню – на 3,10%. Процентное содержание фосфора в период с 7 по 30 дни изменялось аналогично и было меньше показателей 1-й группы соответственно на 28,97%, 26,38% и 6,77% ( $p > 0,05$ ). Это приводило к тому, что соотношение кальций/фосфор в период с 30 по 90 дни уменьшалось на 7,05% ( $p > 0,05$ ), 16,80% и 3,62% соответственно.

Такая динамика содержания кальция и фосфора свидетельствует о том, что в формирующемся костном минерале регенерата преобладают аморфные составляющие. Это подтверждается как нашими исследованиями фазового состава регенерата [3], так и динамикой содержания в кости остальных остеотропных микроэлементов.

Доля магния в области нанесенного дефекта превосходила аналогичные значения 1-й группы в период с 7 по 90 дни эксперимента, но достоверными отклонения были лишь к 15 дню, когда превышение над контролем составило 7,20%. При этом содержание натрия и калия превосходило контрольные значения в период с 7 по 60 дни соответственно на 7,50%, 19,33%, 8,62% ( $p > 0,05$ ) и 14,71% ( $p > 0,05$ ) и на 13,16%, 31,54%, 19,44% и 27,13%.

В том случае, когда в область костного дефекта имплантировались керамический гидроксилapatит и деминерализованный костный матрикс, динамика макроэлементного состава костного минерала была сходна с таковой во 2-й группе, но были выявлены некоторые количественные отклонения.

В 3-й группе (имплантация КГОА) содержание кальция в костной золе было больше значений 2-й группы в период с 7 по 60 дни – соответственно на 40,72%, 42,88%, 26,67% и 23,79%. При этом доля фосфора была больше контроля (2-я группа) в период с 7 по 30 дни – на 28,47%, 38,98% и 7,03% ( $p > 0,05$ ). В результате соотношение кальций/фосфор было больше аналогичных значений 2-й группы к 7, 30 и 60 дням соответственно на 8,91% ( $p > 0,05$ ), 18,33% и 26,14%. По-видимому, это объясняется тем, что в области дефекта находится значительное количество имплантированного КГОА, в большей степени кристаллизованного, нежели костный минерал [3]. По мере биологической резорбции имплантата отклонения от 2-й группы постепенно нивелируются.

Это предположение подтверждается и тем, что к 7 и 15 дням эксперимента процентное содержание магния в костной золе образцов 3-й группы было меньше показателей группы с незаполненным дефектом на 6,12% ( $p > 0,05$ ) и 6,32%, содержание натрия – на 18,60% и 9,15% ( $p > 0,05$ ), а содержание калия – на 8,14% ( $p > 0,05$ ) и 6,12% ( $p > 0,05$ ).

Таблица. Макроэлементный состав большеберцовой кости половозрелых белых крыс при заполнении дефекта различными материалами ( $X \pm Sx$ )

Группа	Сроки	Содержание в минеральном компоненте, %					Соотношение кальций/фосфор
		кальция	фосфора	натрия	калия	магния	
Конт-роль	7 дней	20,30±0,42	19,43±0,65	1,71±0,03	1,09±0,03	3,33±0,04	1,05±0,04
	15 дней	20,71±0,55	19,71±0,52	1,70±0,03	1,06±0,03	3,37±0,04	1,06±0,03
	30 дней	20,94±0,26	19,84±0,56	1,66±0,04	1,03±0,03	3,43±0,05	1,06±0,04
	60 дней	22,63±0,62	20,14±0,51	1,46±0,08	0,92±0,07	3,63±0,12	1,13±0,04
	90 дней	23,97±0,10	19,96±0,21	1,31±0,03	0,81±0,04	3,64±0,16	1,20±0,01
	180 дней	24,13±0,21	20,06±0,19	1,21±0,01	0,73±0,04	4,03±0,09	1,20±0,01
Дефект	7 дней	15,16±0,42*	13,80±0,43*	1,84±0,04*	1,23±0,04*	3,50±0,10	1,11±0,05
	15 дней	16,56±0,62*	14,51±0,58*	2,03±0,06*	1,40±0,06*	3,61±0,05*	1,16±0,08
	30 дней	16,21±0,81*	18,50±0,72	1,80±0,05	1,23±0,04*	3,54±0,04	0,99±0,03
	60 дней	19,51±0,78*	21,04±0,77	1,67±0,05	1,17±0,03*	3,81±0,08	0,94±0,06*
	90 дней	23,23±0,29*	20,06±0,21	1,39±0,04	0,86±0,04	3,84±0,09	1,16±0,01
	180 дней	24,00±0,20	20,00±0,18	1,24±0,02	0,76±0,04	4,06±0,09	1,20±0,01
Кергап	7 дней	21,33±0,56^	17,73±0,48^	1,50±0,02*^	1,13±0,04	3,29±0,05	1,20±0,02*
	15 дней	23,66±0,89*^	20,17±0,87^	1,84±0,06	1,31±0,03	3,39±0,04^	1,18±0,03*
	30 дней	23,07±0,36*^	19,80±0,34	1,76±0,05	1,15±0,05	3,63±0,05*	1,17±0,03^
	60 дней	24,16±0,20^	20,50±0,47	1,71±0,05*	1,20±0,03*	3,96±0,06*	1,18±0,03^
	90 дней	23,89±0,34	20,17±0,32	1,33±0,04	0,83±0,03	3,86±0,04	1,19±0,03
	180 дней	24,47±0,18	19,77±0,21	1,17±0,03	0,71±0,04	3,97±0,07	1,24±0,02
ДКМ	7 дней	13,46±0,38*^	14,16±0,33*	1,99±0,05*	1,41±0,05*^	3,62±0,07	0,95±0,02^
	15 дней	15,94±0,94*	16,21±1,00*	2,16±0,05*	1,54±0,04*	3,71±0,03*	1,02±0,12
	30 дней	18,77±1,01	18,39±0,52	1,84±0,06*	1,29±0,02*	3,61±0,04*	1,02±0,04
	60 дней	20,50±1,43	20,84±0,96	1,61±0,05	1,10±0,03*	3,77±0,07	1,00±0,09
	90 дней	24,39±0,25^	19,67±0,15	1,36±0,05	0,84±0,04	3,77±0,07	1,24±0,02^
	180 дней	24,29±0,25	19,82±0,19	1,23±0,03	0,76±0,04	4,11±0,06	1,23±0,02
Кергап + ДКМ	7 дней	21,17±0,92^	17,44±0,61^	1,83±0,06#	1,26±0,05*	3,61±0,07*#	1,21±0,04*
	15 дней	19,26±0,35^#	19,44±0,36^	2,10±0,05*#	1,45±0,06*	3,74±0,04*#	2,10±0,05*^
	30 дней	22,46±0,54*^#	19,23±0,15	1,86±0,06*	1,30±0,03*#	3,67±0,04*	1,17±0,03*^
	60 дней	21,46±0,30#	20,30±0,43	1,54±0,04#	1,10±0,03*	3,71±0,06#	1,06±0,02#
	90 дней	24,23±0,21^	19,90±0,22	1,36±0,04	0,86±0,02	3,71±0,04#	1,21±0,02
	180 дней	24,40±0,25	19,63±0,20	1,17±0,03	0,69±0,03	4,14±0,06	1,24±0,02

Примечание: \* - обозначает достоверное отличие с группой интактных животных ( $p < 0,05$ );

^ - обозначает достоверное отличие с группой животных, которым пластика дефекта не производилась ( $p < 0,05$ );

# - обозначает достоверное отличие с группой животных, которым производилась пластика дефекта керамическим гидроксилатапитом ( $p < 0,05$ ).

Имплантация в большеберцовую кость ДКМ (4-я группа) сопровождалась снижением содержания кальция в костном минерале к 7 дню эксперимента на 11,22% и преобладанием его же над значениями 2-й группы к 60 и 90 дням на 5,05% ( $p > 0,05$ ) и 4,98%. Поскольку содержание фосфора, так же, как и содержание магния, при этом достоверно не отличалось от показателей 2-й группы, кальций-фосфорное соотношение к 7 дню уменьшалось на 14,00%, а к 60 и 90 дням превосходило значения 2-й группы на 6,82% ( $p > 0,05$ ) и 7,07%. Процентное содержание натрия и калия в этой ситуации было больше контрольных значений (2-я группа) к 7 и 15 дням – соответственно на 7,75% и 6,34% ( $p > 0,05$ ) и на 15,12% и 10,20% ( $p > 0,05$ ).

Выявленные в ранние сроки наблюдения отличия от группы с незаполненным дефек-

том объяснимы наличием в зоне имплантации фрагментов ДКМ, которые не подверглись биодеградации. В более поздние сроки (60 и 90 дни) отклонения от показателей 2-й группы, по-видимому, объясняются остеоиндуктивными особенностями ДКМ.

В 5-й группе (имплантация КГОА в комбинации с ДКМ) динамика содержания макроэлементов в целом была сходной с изменениями в 3-й группе (имплантация КГОА), но имели место количественные отличия. При сравнении с 3-й группой было установлено, что содержание кальция в костном минерале к 15 и 60 дням было меньше на 18,60% и 11,18%; содержание фосфора при этом достоверно не изменялось. В результате соотношение кальций-фосфор к 15 и 60 дням было меньше значений 3-й группы соответственно на 16,03% и 10,40%. Такие из-

менения свидетельствуют о том, что в присутствии ДКМ биологическая резорбция КГОА происходит более активно.

Это подтверждается и динамикой содержания в кости гидрофильных макроэлементов. К 7 и 15 дням процентное содержание магния было больше показателей 3-й группы на 10,00% и 10,54%, натрия – на 21,90% и 13,95%, а калия – на 11,39% ( $p>0,05$ ) и 10,87% ( $p>0,05$ ). В дальнейшем содержание магния было меньше значений 3-й группы к 60 и 90 дням – на 6,14% и 3,71%, а доли натрия и калия к 60 дню – на 10,00% и 8,33% ( $p>0,05$ ). Такая динамика изменения гидрофильных макроэлементов кости также свидетельствует о том, что в период до 15 дня наблюдения в 5-й группе процессы биодеградации имплантированных материалов протекают активнее, чем в 3-й группе. Позже, в период с 60 по 90 дни биологическая деградация КГОА в присутствии ДКМ завершается, а в 3-й группе (КГОА без ДКМ) биорезорбция имплантата еще продолжается.

**Заключение.** Нанесение сквозного дефекта диаметром 2,2 мм в проксимальных отделах диафиза большеберцовой кости в условиях сохранения функциональной нагрузки на конечность сопровождается снижением содержания кальция, фосфора и соотношения кальций/фосфор в минеральном компоненте формирующегося регенерата и увеличением содержания магния, калия и натрия. По мере увеличения сроков после нанесения дефекта отклонения постепенно сглаживаются и к 180 дню полностью нивелируются.

Имплантация керамического гидроксилатапатита при сравнении с показателями группы животных с незаполненным дефектом сопровождается увеличением содержания в костном минерале кальция и фосфора и уменьшением содержания магния, калия и натрия. По мере увеличения длительности эксперимента отклонения сглаживаются и после 60 дня нивелируются полностью.

Заполнение дефекта деминерализованным костным матриксом приводит к снижению содержания кальция и кальций-фосфорного соотношения к 7 дню эксперимента и увеличению этих показателей к 60 и 90 дням при сравнении с группой без имплантации. Содержание натрия и калия в этих условиях превосходило показатели 2-й группы к 7 и 15 дням.

Имплантация комбинации керамического гидроксилатапатита и деминерализованного костного матрикса сопровождалась активизацией процессов биодеградации им-

плантированного материала, что проявлялось в снижении сравнительно с 3-й группой содержания кальция и кальций-фосфорного соотношения к 15 и 60 дням эксперимента. Содержание магния, натрия и калия при этом в ранние сроки превосходило показатели 3-й группы, а в период с 60 по дни было уже меньше их.

Полученные результаты позволяют утверждать, что комбинированная имплантация керамического гидроксилатапатита и деминерализованного костного матрикса сопровождается наиболее активными процессами их биологической деградации.

**Перспективы дальнейших исследований.** Для подтверждения выдвинутых предположений будет проведено гистологическое исследование различных отделов большеберцовой кости.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Брицке Э.М. Атомно-абсорбционный спектральный анализ. – М.: Химия. 1982. – 244 с.
2. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. - Минск: Беларусь, - 1976. - С.209 - 211.
3. Лузин В.И., Бережной Е.П., Кучеренко С.А., Глуценко Р.В. Сравнительное исследование ультраструктуры костного и керамического гидроксилатапатита методом рентгеноструктурного анализа // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Том 9, №3. – С. 105-108.
4. Лузин В.И., Ивченко Д.В., Панкратьев А.А., Скоробогатов А.Н., Самойленко А.А. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных // Украинський медичний альманах. – 2005. – Том 8, №2 (додаток). – С. 162.
5. Новиков Ю.В., Аксюк А.В., Ленточников А.М. Применение спектрографии для определения минерального состава костной ткани при гигиенических исследованиях // Гигиена и санитария. - 1969. - №6. - С.72-76.
6. Полуэктов Н.С. Методы анализа по фотометрии пламени. - М.: Химия, 1967. - 307 с.
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.

Надійшла 21.04.2009 р.  
Рецензент: проф. В.К.Івченко