

УДК 615:591.471.42"46"
© Лузин В.И., Кочубей А.А., 2011

УЛЬТРАСТРУКТУРА БИМИНЕРАЛА КОСТНОГО ВЕЩЕСТВА И МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ТКАНЕЙ ЗУБОВ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ БЕЛЫХ КРЫС РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТИМОГЕНА

Лузин В.И., Кочубей А.А.

ГУ «Луганский государственный медицинский университет»

Лузин В.И., Кочубей А.А. Ультраструктура биоминерала костного вещества и минерализованных тканей зубов нижней челюсти белых крыс различного возраста после применения тимогена // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, №1. – С. 74-77.

В эксперименте на 180 белых крысах трех возрастных групп исследовали ультраструктуру биоминералов нижней челюсти после тимэктомии. Установили, что условия тимэктомии сопровождаются оптимизацией ультраструктуры биоминералов, как костного вещества, так и зубов нижней челюсти. Это проявлялось в уменьшении размеров кристаллитов, а также увеличении коэффициента микротекстурирования, нарастающих по мере увеличения срока эксперимента. Выраженность отклонений зависела от возраста подопытных животных.

Ключевые слова: крысы, онтогенез, нижняя челюсть, ультраструктура биоминерала, тимоген.

Лузин В.И., Кочубей О.О. Ультраструктура біомінералу кісткової речовини і мінералізованих тканин зубів нижньої щелепи білих щурів різного віку після застосування тимогену // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, №1. – С. 74-77.

В експерименті на 180 білих щурах трьох вікових груп досліджували ультраструктуру біомінералів нижньої щелепи після тимектомії. Встановили, що тимектомія супроводжується оптимізацією ультраструктури біомінералу, як кісткової речовини, так і зубів нижньої щелепи. Це проявлялося у зменшенні розмірів кристалітів та збільшенні коефіцієнту микротекстурування, зростаючих в міру збільшення терміну експерименту. Виразність відхилень залежала від віку піддослідних тварин.

Ключові слова: щури, онтогенез, нижня щелепа, ультраструктура біомінералу, тимоген.

Luzin V.I., Kochubey A.A. Age features of mandible biominerals ultrastructure in white rats at influence of thymectomy // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, №1. – С. 74-77.

In experiment on 180 white rats of three age-grades investigated a biominerals ultrastructure of a mandible at administration of thymogenum. Found that thymectomy is accompanied by an optimization of the biomineral ultrastructure as the bone substance and teeth of the lower jaw. This manifested itself in decreasing of sizes of crystallites and increasing of a microtexturation coefficient, increasing with increasing period of the experiment. The severity of the deviations depended on the age of experimental animals.

Key words: rats, ontogenesis, mandible, biomineral ultrastructure, thymigenum.

В последние годы ухудшение экологической обстановки, усиление стрессорных влияний, возрастание урбанизации сопровождается увеличением количества разнообразных иммунореактивных состояний у населения [4]. Имеется значительное количество сведений о состоянии различных органов и систем организма в этих условиях, в том числе и костной, которые требуют иммунологической коррекции [3, 13]. Однако информация о состоянии скелета, а особенно челюстно-лицевых структур в условиях стимуляции клеточного звена иммунной системы до сих пор до конца не систематизирована.

Цель данного исследования: изучить ультраструктуру биологических минералов костного вещества и зубов нижней челюсти белых крыс различного возраста после применения тимогена. Исследование является фрагментом научно-исследовательской работы кафедры анатомии человека Луганского государственного медицинского университета «Морфогенез органов эндокринной, иммунной и костной систем под воздействием экологических факторов» (№ государственной регистрации 0110U005043).

Материал и методы исследования. Эксперимент был проведен на 180 белых крысах трех возрастных групп: неполовозрелых (исходной массой 35-40 г), половозрелых (130-140 г) и пе-

риода выраженных старческих изменений (310-320 г).

Стимуляцию иммунной системы производили с помощью иммуностимулятора тимогена, лекарственного препарата, часто применяемого в клинической практике в настоящее время.

Расчёт дозировки вводимого препарата производили с учётом рекомендаций Ю.Р. и Р.С. Рыболовлевых [11], которые при использовании лекарственных веществ в эксперименте на животных, рекомендуют учитывать константу биологической активности при дозировании веществ в работе с млекопитающими. Использование данной рекомендации основано на особенностях видовых различий, зависящих от основного обмена, массы тела, площади поверхности тела, интенсивности сердечной деятельности и температуры животных. Формула расчёта дозировки лекарственных препаратов для крысы имеет следующий вид:

$$\text{Доза для крысы} = \frac{r * \text{Доза человека}}{R}$$

где r - коэффициент видовой выносливости для крысы =3,62,

R - коэффициент видовой выносливости для человека =0,57.

Тимоген представляет собой синтетический

дипептид Glu-Trp, являющийся аналогом иммунореактивной фракции, выделенной из тимусного препарата тималина [5, 12]. В эксперименте был использован тимоген производства ОАО «Днепрофарм» Украина П/96/158/6. Тимоген оказывает иммуносpezifическое действие и усиливает неспецифическую резистентность организма. Действие препарата реализуется на уровне предшественников Т-лимфоцитов и включает специфическое связывание пептида с мембраной лимфоцита, увеличение внутриклеточного содержания ферментов в лимфоцитах тимуса и селезенки на ранних стадиях активации. Тимоген применяется в клинической практике для стимуляции репаративных процессов после тяжёлых травм. Препарат вводился животным внутрибрюшинно в дозе 1 мкг/кг массы тела, в течение десяти дней. Выбранная доза тимогена соответствовала дозировке, применяемой в клинической практике [2, 6]. Контролем служили крысы, которым вводили физиологический раствор в эквивалентных объёмах.

Все манипуляции на животных выполняли в соответствии с правилами Европейской конвенции защиты позвоночных животных, использующихся в экспериментальных и других научных целях [14].

По истечении сроков эксперимента (7, 15, 30, 90 и 180 дней) выделяли и очищали от мягких тканей нижние челюсти, после чего раздвигали костное вещество и зубы, растирали их в порошок в агатовой ступке и исследовали методом рентгеноструктурного анализа [9]. Исследования 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 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 1 мин. На полученных дифрактограммах 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 [9]. Вычисляли размеры блоков когерентного рассеивания (кристаллитов) по формуле Селякова-Шерера [8], рассчитывали коэффициент микротекстурирования по методу соотношения рефлексов [1] и определяли параметры кристаллической решетки гидроксилпатита с учетом гексагональной сингонии кристаллов [8, 10].

Все полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием стандартных прикладных программ [7].

Результаты и их обсуждение. Оценка полученных результатов проводилась при обязательном сопоставлении с показателями животных контрольной группы.

У неполовозрелых крыс контрольной группы (внутрибрюшинное введение физиологического раствора) в ходе наблюдения с 7 по 180 день размеры элементарных ячеек костного биоминерала вдоль оси *a* увеличивались с $9,360 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М до $9,383 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М, а размеры вдоль оси *c* – с $6,825 \pm 0,001 \cdot 10^{-10}$ М до $6,844 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М. Соотношение размеров элементарных ячеек *c/a* при этом вариировало в пределах 72,91-72,94 (10^2). Размеры блоков когерентного рассеивания в ходе наблюдения увеличивались с $36,20 \pm 0,60$ нМ до $41,14 \pm 0,88$ нМ, так же, как и коэффициент микротекстурирования – с $0,3151 \pm 0,0093$ у.е. до $0,3931 \pm 0,0111$.

Аналогичным образом, размеры элементарных ячеек биоминерала минерализованных тканей зубов вдоль оси *a* в ходе наблюдения увеличивались с $9,347 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М до $9,361 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М, а вдоль оси *c* – с $6,808 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М до $6,817 \pm 0,004 \cdot 10^{-10}$ М. Соотношение размеров элементарных ячеек *c/a* оставалось стабильным, а размеры кристаллитов незначительно увеличивались – с $26,47 \pm 0,21$ нМ до $28,54 \pm 0,25$ нМ. Увеличивалось и значение коэффициента микротекстурирования – с $0,4839 \pm 0,0166$ у.е. до $0,5471 \pm 0,0095$ у.е.

У репродуктивных животных контрольной группы (после внутрибрюшинного введения физиологического раствора) в ходе наблюдения размеры элементарных ячеек биологического минерала костного вещества нижней челюсти вдоль оси *a* увеличивались с $9,378 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М до $9,383 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М, а размеры вдоль оси *c* – с $6,842 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М до $6,851 \pm 0,001 \cdot 10^{-10}$ М. В результате соотношение размеров элементарных ячеек костного гидроксилпатита *c/a* постепенно увеличивалось с $72,95 \pm 0,03$ (10^2) до $73,01 \pm 0,03$ (10^2).

Это свидетельствует о продолжающемся в данном возрасте росте элементарных ячеек костного минерала и стабилизации их симметрии.

Размеры блоков когерентного рассеивания также продолжали в ходе наблюдения увеличиваться – с $40,81 \pm 0,60$ нМ до $44,26 \pm 0,36$ нМ, а коэффициент микротекстурирования – с $0,3896 \pm 0,0061$ у.е. до $0,4293 \pm 0,0043$ у.е. Это также свидетельствует о дальнейшем росте размеров кристаллитов и дальнейшей стабилизации кристаллической решетки костного биоминерала.

В биоминерале минерализованных тканей резцов нижней челюсти половозрелых крыс контрольной группы наблюдались аналогичные процессы. Размеры элементарных ячеек фторапатита вдоль оси *a* увеличивались с 7 по 180 день наблюдения с $9,363 \pm 0,004 \cdot 10^{-10}$ М до $9,371 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М, а размеры вдоль оси *c* – с $6,817 \pm 0,004 \cdot 10^{-10}$ М до $6,823 \pm 0,005 \cdot 10^{-10}$ М. Соотношение размеров элементарных ячеек *c/a* с 7 по 90 день наблюдения увеличивалось с $72,81 \pm 0,04$ (10^2) до $72,90 \pm 0,05$ (10^2), а к 180 дню уменьшалось до $72,81 \pm 0,04$ (10^2). Это является свидетельством дестабилизации кристаллической решетки биоминерала зубов и, вероятно,

одним из первых признаков проявления возрастного генерализованного пародонтоза.

У крыс старческого возраста, которым внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (контрольная группа), размеры элементарных ячеек костного гидроксилапатита вдоль оси *a* в ходе наблюдения увеличивались с $9,393 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М до $9,403 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М, а вдоль оси *c* – с $6,862 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М до $6,879 \pm 0,001 \cdot 10^{-10}$ М. Соотношение *c/a* также постепенно увеличивалось в ходе наблюдения с $73,05 \pm 0,04$ (10^2) до $73,16 \pm 0,02$ (10^2), а размеры кристаллитов – с $41,97 \pm 0,61$ нМ до $52,09 \pm 0,71$ нМ. При этом коэффициент микротекстурирования с 7 по 180 день наблюдения уменьшался с $0,4047 \pm 0,0038$ у.е. до $0,3412 \pm 0,0041$ у.е.

Это свидетельствует об уменьшении общей обменной поверхности костного биоминерала и дестабилизации его кристаллической решетки вследствие развития явлений сенильного остеопороза.

Биологический минерал зубов нижней челюсти крыс старческого возраста, получавших брюшинно физиологический раствор, характеризовался следующими особенностями. Размеры элементарных ячеек вдоль оси *a* в ходе наблюдения увеличивались с $9,380 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М до $9,384 \pm 0,004 \cdot 10^{-10}$ М, а вдоль оси *c* – с $6,826 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М до $6,842 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М, а соотношение размеров *c/a* колебалось в пределах 72,76–72,91 (10^2). Размеры кристаллитов увеличивались в ходе наблюдения с $34,16 \pm 0,49$ нМ до $36,99 \pm 0,31$ нМ, а коэффициент микротекстурирования уменьшался с 7 по 180 день с $0,5653 \pm 0,0033$ у.е. до $0,4973 \pm 0,23$ у.е.

Эти данные свидетельствуют об уменьшении общей обменной поверхности биоминерала зубов нижней челюсти и дестабилизации его кристаллической решетки вследствие развития явлений сенильного пародонтоза.

Внутрибрюшинное введение тимогена неполовозрелым крысам сопровождалось изменениями в ультраструктуре биоминерала костного вещества нижней челюсти лишь к 180 дню. К этому сроку размеры элементарных ячеек вдоль осей *a* и *c* были меньше контрольных показателей соответственно на 0,13% и 0,16%, размеры кристаллитов – на 3,42%. При этом коэффициент микротекстурирования мало достоверно ($p > 0,05$) превосходил контрольные значения на 4,23%.

Это свидетельствует об увеличении общей обменной поверхности костного биоминерала и некоторой оптимизации его ультраструктуры.

Введение тимогена неполовозрелым животным сопровождалось также уменьшением в сравнении с контрольным соотношения *c/a* на 0,14%, что свидетельствует об оптимизации условий для нуклеации и роста вновь образованных элементарных ячеек. Также, к 180 дню было выявлено уменьшение размеров блоков когерентного рассеивания – на 3,85%, что свидетельствует об увеличении общей обменной по-

верхности биологического фторапатита.

Внутрибрюшинное введение тимогена половозрелым крысам в дозировке 1 мг на 1 кг массы тела животных сопровождалось изменениями ультраструктуры биоминерала костного вещества нижней челюсти начиная с 30 дня эксперимента. Коэффициент микротекстурирования преобладал над значениями контрольной группы с 30 по 180 дни эксперимента соответственно на 7,48%, 6,22% и 4,17% ($p > 0,05\%$).

Изменения размеров структурных составляющих костного гидроксилапатита определялись лишь к 180 дню: размеры элементарных ячеек вдоль оси *c* были меньше контрольных на 0,10%, а размеры кристаллитов – на 3,42%.

Это свидетельствует об увеличении общей обменной поверхности костного биоминерала и оптимизации его кристаллической решетки.

В ультраструктуре фторапатита минерализованных тканей резцов после применения тимогена изменения были незначительны: лишь размер блоков когерентного рассеивания к 90 и 180 дням был меньше контрольного на 5,24% и 4,62%. Это свидетельствует о преобладании общей обменной поверхности биоминерала зубов на показателями контрольной группы.

Таким образом, внутрибрюшинное введение тимогена половозрелым крысам сопровождается оптимизацией ультраструктуры биоминералов нижней челюсти в поздние сроки эксперимента. Изменения в биоминерале костного вещества нижней челюсти регистрируются раньше – с 30 дня эксперимента и в большей степени связаны у увеличением упорядоченности его кристаллической решетки, а в биоминерале зубов позже – с 90 дня и связаны с уменьшением размеров его структурных компонентов – кристаллитов.

Внутрибрюшинное введение тимогена крысам периода выраженных старческих изменений в дозировке 1 мг/кг массы тела в течение десяти дней также сопровождалось изменениями ультраструктуры биоминералов и костного вещества, и минерализованных тканей зубов нижней челюсти.

Изменения в ультраструктуре костного биоминерала нижней челюсти после десятидневного применения тимогена регистрировались с 15 дня эксперимента. Размеры блоков когерентного рассеивания были меньше аналогичных контрольных показателей к 15, 90 и 180 дням эксперимента соответственно на 2,99%, 3,17% и 3,08% ($p > 0,05$). Коэффициент микротекстурирования превосходил контрольные значений с 15 по 180 дни эксперимента соответственно на 10,63%, 8,38%, 7,24% и 11,50%. Параметры элементарных ячеек костного биоминерала после применения тимогена у крыс старческого возраста достоверно от контрольных не отличались.

В этих условиях достоверные изменения ультраструктуры биоминерала зубов нижней челюсти регистрировались значительно позже. Коэффициент микротекстурирования был

больше контрольных значений к 90 и 180 дням соответственно на 5,28% и 4,88%. Размеры блоков когерентного рассеивания были меньше, чем в контрольной группе лишь к 180 дню – на 3,71%. Размеры элементарных ячеек фторопатита от контрольных показателей достоверно не отличались.

Таким образом, внутрибрюшинное введение тимогена животным периода инволютивных изменений сопровождается оптимизацией ультраструктуры биоминералов нижней челюсти, что проявляется в увеличении общей обменной поверхности и стабилизации кристаллической решетки, то есть сглаживанием явлений возрастзависимого остеопороза и пародонтоза. В костном биоминерале изменения регистрируются раньше (с 15 дня эксперимента), а в биоминерале зубов – позже (с 90 дня).

Поскольку параметры элементарных ячеек биоминералов в условиях эксперимента у крыс старческого возраста достоверно не изменялись, можно утверждать, что введение тимогена не влияет на процессы нуклеации и роста элементарных ячеек как гидроксил-, так и фторопатита.

Заключение. Таким образом, внутрибрюшинное введение тимогена крысам различного возраста сопровождается оптимизацией ультраструктуры биоминералов нижней челюсти в поздние сроки эксперимента. Изменения в биоминерале костного вещества нижней челюсти, как правило, регистрируются раньше и в большей степени связаны с увеличением упорядоченности его кристаллической решетки, а в биоминерале зубов позже и связаны с уменьшением размеров его структурных компонентов – кристаллитов.

Поскольку параметры элементарных ячеек биоминералов в условиях эксперимента у крыс старческого возраста достоверно не изменялись, можно утверждать, что введение тимогена не влияет на процессы нуклеации и роста элементарных ячеек как гидроксил-, так и фторопатита.

Перспективы дальнейших исследований. Для выяснения механизмов дестабилизации ультраструктуры биоминералов нижней челюсти, в дальнейшем будет проведено исследование их химического состава.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Азаров А.В. Метод порошка в рентгенографии / А.В.Азаров, М.И.Бургер - М.: Изд.-во иностранной литературы, 1961. - 363 с.
2. Белоусов Ю.Б. Клиническая фармакотерапия / Ю.Б. Белоусов, В.С.Моисеев, В.К.Лепяхин // Изд. 2-е, стереотипное. - М.: Универсум паб-лишинг. – 2000. – 539 с.
3. Кащенко С.А. Особенности остеогенеза при действии иммуностимуляторов / С.А. Кащенко // Проблемы остеологии. - 2002. - Т. 5, №1. - С. 59-61.
4. Киреева И.С. Особенности влияния загрязнения окружающей среды на здоровье населения промышленных городов Донецкого региона

/ И.С. Киреева, И.Г. Чудова, В.П. Ермоленко // Довкілля та здоров'я. – 1997. – №3. – С. 33–35.

5. Киселёва Е.П. Сравнительная характеристика двух пептидных иммуномодуляторов / Е.П.Киселёва, Р.П.Огурцов, О.Я. Попова // Иммунология. - 1999. - №2. - С. 23-26.

6. Кресюн В.И. Клинические аспекты иммунофармакологии / В.И. Кресюн, Ю.И. Бажора, С.С. Рыбалова. - Одесса, 1993. – С. 163–165.

7. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – Киев: Морион, 2000. – 320 с.

8. Миркин А.И. Рентгеноструктурный анализ. Индексирование рентгенограмм: справочное руководство / Миркин А.И. – М.: Наука, 1981. – 496 с.

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

10. Подрушняк Е.П. Ультраструктура минерального компонента и прочность костной ткани позвонков у людей различного возраста / Е.П.Подрушняк, А.И. Новохацкий // Ортопед. травматол. - 1983. - N8. - С.15-18.

11. Рыболовлев Ю.Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности / Ю.Р. Рыболовлев, Р.С. Рыболовлев // Журнал АН СССР. - 1979. - Т. 247, №6. - С. 1513-1516.

12. Стимуляция тимогеном (GW)-дипептидом, обладающим иммунокорректирующими свойствами, восстановлением кроветворения у облученных и подвергнутых действию цитостатика мышей / О.В. Семина, Т.Н. Семенец, В.И.Дейгин, А.М.Коротков // Иммунология.- 1997. - №1.- С. 33-35.

13. Фролов В.М. Клінічна імунологія синдрому підвищеної стомленості у мешканців регіону Донбасу: показники клітинної ланки імунітету / В.М. Фролов, Г.М. Драннік // Український медичний альманах. – 2003. - №3. – С. 169–172.

14. 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 12.11.2010 р.

Рецензент: проф. В.Г.Ковешніков