

УДК: 611-018:616:718.5-092.6."46"

© Глущенко Р.Н., 2012

## УЛЬТРАСТРУКТУРА МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ БЕЛЫХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ НАНЕСЕНИИ В НЕЙ МЕТАДИАФИЗАРНОГО ДЕФЕКТА

Глущенко Р.Н.

ГЗ "Луганский государственный медицинский университет"

**Глущенко Р. Н.** Ультраструктура минерального компонента большеберцовой кости белых крыс разного возраста при нанесении в ней метадиафизарного дефекта // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 165-168.

Нанесение дырчатого дефекта в метадиафизарной области большеберцовой кости крыс сопровождается изменением ультраструктуры минерального компонента. Кверцетин оптимизирует процессы формирования биоминерала регенерата. Выявленность выявленных отклонений зависит от возраста подопытных животных

**Ключевые слова:** большеберцовая кость, ультраструктура биоминерала, кверцетин, дефект.

**Глущенко Р.М.** Ультраструктура мінерального компоненту великогомілкової кістки білих щурів на різних етапах постнатального онтогенезу при нанесенні метадіафізарного дефекту // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 165-168.

Нанесення дірчатого дефекту у метадіафізарній ділянці великогомілкової кістки щурів супроводжується змінами ультраструктури її мінерального компоненту. Кверцетин оптимізує процеси формування біомінерала регенерата. Визначеність зареєстрованих відхилень залежить від віку піддослідних тварин.

**Ключові слова:** великогомілкова кістка, ультраструктура біомінералу, кверцетин, дефект.

**Glushenko R. N.** Tibial bone biomineral ultrastructure in white rats at different stages of postnatal development after metadiaphyseal defect // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 165-168.

Piercing defect on the metadiaphyseal area of the tibial shaft in rats promotes its mechanical strength. Quercetine corrects this condition. The duration and extent of the changes depended on the age of the animals.

**Key words:** tibia, biomineral ultrastructure, quercetine, defect.

Установлено, что при нанесении сквозного дырчатого дефекта в метадиафизарной области длинных трубчатых костей наряду с интенсивными процессами формирования регенерата изменяются темпы роста, минеральная насыщенность и прочность всех остальных костей скелета [2-4, 6, 7, 13]. Также, доказана эффективность применения биофлавоноида кверцетина как для оптимизации процессов репаративной регенерации, так и для сглаживания системных реакций скелета в этих условиях [6, 7, 15, 16]. Однако, сведений о том, как изменяется ультраструктура минерального компонента регенерата в этих условиях у животных различного возраста нет.

**Цель** данной работы: исследовать ультраструктуру минерального компонента регенерата большеберцовых костей белых крыс различного возраста при нанесении в них сквозного дырчатого дефекта при сохранении функциональной нагрузки, а также обосновать возможности коррекции выявленных отклонений биофлавоноидом кверцетином.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Статья является фрагментом межкафедральной научно-исследовательской работы Луганского государственного медицинского университета "Особенности роста, строения и регенерации трубчатых костей при пластике костных дефектов материалами на основе гидроксилалюмината" (государственный регистрационный номер - 0103U006651).

**Материалы и методы исследования.**

Эксперимент был проведен на 252 беспородных белых крысах, распределенных на 3 возрастных группы: неполовозрелых (с исходной массой 40-45 г), половозрелых (130-140 г) и периода выраженных старческих изменений (300-315 г). В качестве контроля использовали интактных животных (1-ая группа). Остальным крысам под эфирным масочным наркозом стандартным стоматологическим бором диаметром 2 мм наносили сквозной дефект на границе проксимального метафиза и диафиза большеберцовых костей. Поскольку переднезадний размер большеберцовой кости в этой области составляет не менее 3 мм, манипуляция не сопровождалась нарушением целостности костного органа и создавались условия для сохранения функциональной нагрузки (2-ая группа) [8]. Часть животных внутрижелудочно через зонд получала кверцетин ежедневно в дозировке аналогичной 3 г для человека (3-я группа) [12].

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 и 90 дней) животных декапитировали под эфирным наркозом, выделяли и скелетировали большеберцовые кости и исследовали фрагмент, соответствующий области нанесенного дефекта, методом рентгеноструктурного анализа [9]. Исследования проводили на аппарате ДРОН-2,0 с

гониметрической приставкой ГУР-5, использовали К $\alpha$  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 [9]; по угловому положению дифракционных пиков рассчитывали межплоскостные расстояния в кристаллах гидроксилapatита [10]. Вычисляли размеры блоков когерентного рассеивания (кристаллитов) по формуле Селякова-Шерера [9], рассчитывали коэффициент микротекстурирования по методу соотношения рефлексов [1] и определяли параметры кристаллической решетки гидроксилapatита с учетом гексагональной сингонии кристаллов [9, 11].

Полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием прикладного пакета Statistica 5.11 for Windows [5].

**Результаты и их обсуждение.** У неполовозрелых интактных животных размеры элементарных ячеек костного биоминерала вдоль оси *a* за период с 7 по 90 день наблюдения увеличились с  $9,365 \pm 0,001$  ( $10^{-10}$ ) М до  $9,371 \pm 0,004$  ( $10^{-10}$ ) М, а размеры вдоль оси *c* – с  $6,824 \pm 0,003$  ( $10^{-10}$ ) М до  $6,832 \pm 0,001$  ( $10^{-10}$ ) М. При этом соотношение размеров *c/a* в ходе наблюдения также увеличилось с  $72,86 \pm 0,03$  ( $10^2$ ) до  $72,91 \pm 0,03$  ( $10^2$ ).

Наряду с этим размеры блоков когерентного рассеивания за период наблюдения увеличились с  $38,14 \pm 0,62$  нМ до  $40,74 \pm 1,33$  нМ, а коэффициент микротекстурирования, характеризующий однородность ориентации кристаллов в кристаллической решетке – с  $0,3288 \pm 0,0119$  до  $0,378 \pm 0,0204$ .

Все это свидетельствует о высокой степени активности процессов кристаллизации и роста элементарных ячеек и кристаллов костного биоминерала у неполовозрелых интактных животных.

У интактных половозрелых крыс размеры элементарных ячеек костного биоминерала вдоль оси *a* за период с 7 по 90 день наблюдения увеличились с  $9,378 \pm 0,003$  ( $10^{-10}$ ) М до  $9,384 \pm 0,003$  ( $10^{-10}$ ) М, а размеры вдоль оси *c* – с  $6,843 \pm 0,002$  ( $10^{-10}$ ) М до  $6,846 \pm 0,002$  ( $10^{-10}$ ) М. При этом соотношение размеров элементарных ячеек *c/a* колебалось в пределах 72,96-72,97, что свидетельствует о равновесии между процессами кристаллизации и резорбции костного биоминерала.

Размеры кристаллитов костного биоминерала у половозрелых интактных крыс в ходе наблюдения увеличивались с  $43,11 \pm 0,71$  нМ до  $45,08 \pm 0,81$  нМ, а коэффициент микротекстурирования возрастал с  $0,3954 \pm 0,0129$  до  $0,4015 \pm 0,0078$ . Это свидетельствует о том, что в репродуктивный возрастной период еще про-

должается упорядочивание кристаллической решетки костного биоминерала.

В период инволютивных изменений у интактных крыс в ходе наблюдения размеры элементарных ячеек биоминерала ББК продолжали увеличиваться: размер вдоль оси *a* – с  $9,393 \pm 0,004$  ( $10^{-10}$ ) М до  $9,399 \pm 0,003$  ( $10^{-10}$ ) М, а размер вдоль оси *c* – с  $6,860 \pm 0,002$  ( $10^{-10}$ ) М до  $6,872 \pm 0,002$  ( $10^{-10}$ ) М. При этом соотношение размеров элементарных ячеек *c/a* с 7 по 90 день наблюдения увеличивалось с  $73,03 \pm 0,01$  ( $10^2$ ) до  $73,11 \pm 0,04$  ( $10^2$ ), что свидетельствует о дестабилизации элементарных ячеек костного минерала и склонности их к разрушению.

Наряду с этим за период наблюдения размеры блоков когерентного рассеивания увеличились с  $50,14 \pm 0,84$  нМ до  $52,62 \pm 0,96$  нМ, что свидетельствует об уменьшении общей обменной поверхности костного биоминерала. При этом коэффициент микротекстурирования с 7 по 90 день наблюдения уменьшился с  $0,3538 \pm 0,0076$  до  $0,3193 \pm 0,0082$ , что свидетельствует о постепенной дестабилизации кристаллической решетки костного биоминерала и наличии в ней деформаций.

В том случае, когда неполовозрелым крысам наносили сквозной дырчатый дефект на границе проксимального метафиза и диафиза ББК в области нанесенного дефекта размеры элементарных ячеек костного биоминерала вдоль оси *c* были меньше значений группы интактных животных с 7 по 30 день эксперимента на 0,50%, 0,46% и 0,23%, а размеры вдоль оси *a* на 7 и 15 день – на 0,35% и 0,35%. Соотношение размеров *c/a* на 7 день эксперимента также было меньше контрольного на 0,15%.

Такие показатели свидетельствуют об активном формировании и росте элементарных ячеек вновь образованного костного минерала, которые постепенно замедляются и после 30 дня выравниваются по интенсивности с аналогичными процессами у интактных животных.

Размеры кристаллитов в этих условиях на 7 и 15 день эксперимента были меньше контрольных показателей на 19,40% и 19,10%, что свидетельствует о высокой обменной поверхности вновь формирующегося костного биоминерала.

Коэффициент микротекстурирования при этом на 7 и 15 день был меньше значений группы интактных животных на 15,18% и 11,83%, а на 30 и 90 день превосходил их на 11,16% и 7,51%. Это объясняется тем фактом, что в ранние сроки после нанесения дефекта еще сохраняются фрагменты нерезорбированных костных отломков, которые создают препятствия для формирования упорядоченной кристаллической решетки. Позднее область дефекта заполнена грубоволокнистой костной тканью с высокой степенью упорядоченности ее кристаллической решетки, которая по мере перестройки постепенно уменьшается.

В том случае, когда дефект в ББК наносили животным репродуктивного возрастного перио-

да, на 7 день после операции размеры элементарных ячеек костного биоминерала вдоль оси *a* были больше значений 1-й группы на 0,12%, а коэффициент микротекстурирования – меньше на 13,17%.

Это объясняется наличием в области нанесенного дефекта еще не резорбированных фрагментов поврежденной кости, которые, во-первых, интенсивно разрушаются, а во-вторых, создают препятствия для формирования упорядоченной кристаллической решетки костного биоминерала. Также, из этого следует, что процессы формирования новообразованного костного минерала у половозрелых животных идут медленнее, чем у неполовозрелых.

В дальнейшем размеры элементарных ячеек вдоль оси *c* были меньше значений 1-й группы с 15 по 90 день эксперимента соответственно на 0,24%, 0,32% и 0,10%, а соотношением размеров *c/a* на 15 и 30 день – на 0,19% и 0,27%. При этом размеры кристаллитов на 15 и 30 день были меньше контрольных на 11,62% и 7,71%. Наконец, коэффициент микротекстурирования на 30 и 90 день эксперимента был больше контрольного на 9,42% и 6,52%.

Эти данные подтверждают наличие высокой обменной поверхности у вновь образованного минерала у половозрелых крыс. Также из этого следует, что на 90 день эксперимента процессы преобразования формирующегося костного минерала еще до конца не завершены.

Нанесение дефекта ББК животным периода инволютивных изменений сопровождалось следующими особенностями формирования костного биоминерала. Размеры элементарных ячеек вдоль осей *a* и *c* на 7 день эксперимента были больше контрольных показателей на 0,17% и 0,14%. Это свидетельствует о наличии в области дефекта ББК еще больше количества разрушающихся костных отломков, чем у половозрелых крыс.

В дальнейшем, на 30 день размеры элементарных ячеек вдоль осей *a* и *c* были меньше аналогичных значений 1-й группы на 0,08% и 0,22%. Также размеры кристаллитов были меньше контрольных на 15 и 30 день эксперимента на 8,52% и 7,32%. Однако, такую динамику нельзя назвать позитивной, поскольку коэффициент микротекстурирования был меньше контрольных значений во все установленные сроки эксперимента соответственно на 8,41%, 13,88%, 17,08% и 9,67%.

Можно предположить, что процессы формирования костного минерала в области дефекта провоцируют ускорение процессов старения костной ткани и развития сенильного остеопороза.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в после нанесения дефекта ББК формирование костного минерала протекает весьма длительно (в зависимости от возраста животных), что требует поиска медикаментозной возможности оптимизации этих процессов. С этой целью

нами был использован биофлавоноид отечественного производства кверцетин.

Установили, что у неполовозрелых крыс, которым после нанесения дефекта в ББК внутрижелудочно вводили кверцетин в терапевтической дозировке размеры элементарных ячеек костного биоминерала вдоль оси *c* были меньше значений 1-й группы с 7 по 30 день эксперимента соответственно на 0,26%, 0,45% и 0,19%, а размеры вдоль оси *a* на 7 и 15 день – на 0,22% и 0,29%. При этом соотношение размеров элементарных ячеек *c/a* на 15 и 30 день было меньше контрольного на 0,16% и 0,13%. Также, размеры кристаллитов и коэффициент микротекстурирования были меньше, чем у интактных животных на 7 и 15 день соответственно на 16,27% и 18,63%, и на 15,25% и 10,48%. На 90 достоверные отличия исследуемых показателей от группы интактных животных не были выявлены.

Сравнение с 2-й группой (нанесение дефекта без применения кверцетина) показало, что на 7 день эксперимента размеры элементарных ячеек вдоль осей *a*, *c* и их соотношение были больше контрольных соответственно на 0,13%, 0,25% и 0,11%. Это свидетельствует о том, что в условиях применения кверцетина элементарные ячейки костного биоминерала формируются и растут быстрее, чем во 2-й группе.

Данное утверждение подтверждается и тем, что коэффициент микротекстурирования на 30 день был меньше значений 2-й группы на 5,97%. Это свидетельствует о том, что процессы перестройки грубоволокнистой костной ткани в условиях применения кверцетина более продвинуты во времени.

Введение кверцетина в условиях нанесения дефекта в ББК половозрелым животным, на 7 день эксперимента размеры элементарных ячеек вдоль оси *a* были больше значений интактных животных на 0,10%, а коэффициент микротекстурирования был меньше их на 13,72%.

В дальнейшем, с 15 по 90 день эксперимента размеры элементарных ячеек вдоль оси *c* и соотношение размеров *c/a* были меньше значений интактных животных соответственно на 0,27%, 0,23% и 0,08%, и на 0,22%, 0,25% и 0,08%. Размеры блоков когерентного рассеивания были меньше контрольных на 15 и 30 день эксперимента на 10, 56% и 7,13%, а коэффициент микротекстурирования был больше на 30 и 90 день на 12,30% и 5,15%.

Сравнение с 2-й группой показало, что лишь размеры элементарных ячеек костного минерала вдоль оси *c* были больше контрольных на 30 день на 0,10%. С одной стороны это свидетельствует о незначительном ускорении процессов формирования костного минерала в сравнении со 2-й группой, а с другой о том, что применение кверцетина у половозрелых крыс значительно менее эффективно, чем у неполовозрелых.

В том случае, когда кверцетин вводили на

фоне дефекта в ББК у животных периода инволютивных изменений, размеры элементарных ячеек вдоль оси а были на 7 день больше значений интактных животных на 0,15%. Также, размеры кристаллитов были меньше контрольных на 15 и 30 день на 9,73% и 6,68%, а коэффициент микротекстурирования с 7 по 30 день – на 8,32%, 14,39% и 12,33%.

Сравнение с 2-й группой достоверных отличий исследуемых показателей не выявило. Из этого следует, что применение кверцетина на фоне нанесения дефекта в ББК у крыс периода инволютивных изменений не оказывает оптимизирующего влияния на образование биоминерала, формирующегося в области дефекта.

**Заключение.** Проведенные исследования позволяют утверждать, что нанесение сквозного дырчатого дефекта в большеберцовой кости сопровождается формированием биоминерала регенерата, темпы которого зависят от возраста подопытных животных. У неполовозрелых крыс формирование регенерата завершается к 30 дню эксперимента и на 90 день наблюдения выявленные отклонения полностью сглаживаются. У животных репродуктивного и старческого возраста в условиях эксперимента формирование биоминерала регенерата протекает до 90 дня наблюдения, у крыс старческого возраста медленноживотных репродуктивного возраста. Это следует рассматривать как манифестацию первичного возрастзависимого (сенильного) остеопороза.

Внутрижелудочное применение биофлавоноида кверцетина в терапевтической дозировке в значительной степени сглаживает выявленные отклонения. Наиболее эффективно применение кверцетина у неполовозрелых крыс, наименее – у животных периода выраженных старческих изменений.

**Перспективы дальнейших исследований.** Полученные в ходе данного эксперимента будут дополнены результатами гистологического исследования реактивных отделов ББК с дырчатым дефектом на фоне применения кверцетина и при его отсутствии.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Азаров Л.В. Метод порошка в рентгенографии / Л.В.Азаров, М.И.Бургер - М.: Изд.-во иностранной литературы, 1961. - 363 с.
2. Климовицкий В.Г. Возможные пути оптимизации репаративных процессов у пострадавших с переломами длинных костей конечностей (взгляд на проблему) / В.Г. Климовицкий, В.Н. Пастернак, В.М. Оксонец // Ортопедия, травматология и протезирование. - 2006. - № 1. - С.90-99.
3. Корж Н.А. Нарушение регенерации костной ткани при переломах длинных костей (оценка факторов риска) / Н.А. Корж, Л.Д. Горидова, К.К. Романенко // Проблемы остеологии. - 1999. - Т.2, №1.- С. 40.
4. Лаврищева Г.И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации

опорных органов и тканей / Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко - М.: Медицина, 1996. – 208 с.

5. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – Киев: Моррион, 2000. – 320 с.
6. Лузин В.И. Прочностные характеристики плечевой кости белых крыс различного возраста при нанесении дырчатого дефекта большеберцовых костей / В.И. Лузин, В.Н. Прочан // Український медичний альманах. – 2009. – Том 12, №2. – С. 102-106.
7. Лузин В.И. Рост и формирование костей скелета белых крыс при нанесении дырчатого дефекта большеберцовых костей на различных этапах постнатального онтогенеза / В.И. Лузин, В.Н. Прочан // Український морфологічний альманах. – 2008. – Том 6, №4. – С. 69-74.
8. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В.И. Лузин, Д.В. Ивченко, А.А. Панкратьев, и соавт. // Український медичний альманах. – 2005. – Том 8, №2 (додаток). – С. 162.
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. - N8. - С.15-18.
12. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Доклады АН СССР.- 1979.- Т.247, №6,- С.1513-1516.
13. Bostrom M.P. Potential role of bone morfogenetic proteins in fracture healing / M.P. Bostom, N.P. Camacho // Clin. Orthop. - 1998. - Vol. 355. - P. 274-282.
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.
15. Wong R.W. Effect of quercetin on bone formation / R.W. Wong, A.B. Rabie // J. Orthop. Res. – 2008. – Vol. 26 (8). – P. 1061-1066.
16. Wong R.W. Effect of quercetin on preosteoblasts and bone defects / R.W. Wong, A.B. Rabie // Open Orthop. J. – 2008. – Vol.2. – P. 27-32.

Надійшла 02.09.2012 р.  
Рецензент: проф. Ю.Г.Бурмак