УДК 57.012.4:611.71:616.379-008.64-092.9”465.02”

А.В. Івченко

Луганський державний медичний університет

УЛЬТРАСТРУКТУРА МІНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА КІСТКИ, ЩО ФОРМУЄТЬСЯ В МІСЦІ ДЕФЕКТУ НА ТЛІ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДІАБЕТУ У ЩУРІВ ПЕРІОДУ СТАРЕЧИХ ЗМІН

На 105 білих щурах старечого віку визначена ультраструктура мінерального компонента кістки, що формується в місці дефекту в умовах експериментального діабету. Для ініціації цукрового діабету щурам вводили стрептозотоцин. На 17-й день від початку експерименту наносили дефект проксимального метафізу великогомілкової кістки. У досліджуваних щурів на тлі стрептозотоцинового діабету спостерігалось уповільнення формування кристалічної решітки кісткового мінералу регенерату. Динаміка фазового складу біомінералу регенерату свідчить, що його утворення на тлі стрептозотоцинового діабету значно уповільнюється.

Ключові слова: *щури старечого віку, стрептозотоциновий діабет, дефект великогомілкової кістки, рентгеноструктурний аналіз.*

Доведено, що у хворих на цукровий діабет (ЦД) швидкість загоєння переломів кісток зменшується внаслідок гальмування процесів формування кісткового регенерату [1]. Деякі автори висловлюють припущення, що крім тканинного складу кісткового регенерату в умовах ЦД порушується й ультраструктура новоствореного кісткового біомінералу [2]. Проте детальних досліджень ультраструктури мінерального компонента кісткового регенерату, що формується на тлі ЦД, не проводилось [3].

Метою дослідження було вивчити ультраструктуру мінерального компонента кістки, що формується в місці дефекту на тлі стрептозотоцинового діабету у щурів старечого віку.

Матеріал і методи. З метою вивчення перебігу особливостей репаративної регенерації кісткової тканини в умовах діабету проведений експеримент на 105 білих щурах-самцях. Початкова маса щурів складала (311,57± 6,01) г. Усі щури були розподілені на три групи по 35 тварин у кожній. Першу (контрольну К) групу склали інтактні тварини; другу (Д) – щури, яким наносили дірчастий дефект у ділянці проксимального метафізу великогомілкової кістки (ВГК), дефект без діабету; третю (ДД) – щури, яким на тлі стрептозотоцинового діабету наносили дірчастий дефект у ділянці проксимального метафізу ВГК. Роботу з тваринами здійснювали у відповідності до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом із біоетики (Київ, 2001) та «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Для ініціації ЦД щурам вводили стрептозотоцин (2-дезоксиметил-нітрозомочевина глюкозопіранозу). На 17-й день від початку експерименту проведено операцію з нанесення дефекту ВГК. Моделювання кісткового дефекту в ділянці проксимального метаепіфізу ВГК лабораторних щурів при збереженні функціонального навантаження на кінцівку здійснювали за методикою В.І. Лузина з співавт. [4]. Щурів розміщували в клітки відповідно групам і утримували в умовах віварію. Утримання і харчування тварин здійснювали згідно з «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» від 06.04.73 р. і доповненням від

© *А.В. Івченко, 2012*

04.12.78 р. до Наказу МЗ СРСР № 163 від 10.03.66 р. «О суточных нормах кормления животных и процедур» [5]. Вірогідного розходження в темпах приросту маси тіла тварин усіх піддослідних груп протягом усього періоду спостереження не відзначалося. Щурів виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом через 7, 15, 30, 60 та 90 діб після операції. Визначали масу тварини, потім препарували та скелетували ВГК, які зважували на аналітичних вагах ВЛА-200 з точністю до 0,1 мг. Для дослідження ультраструктури мінерального компонента кістки використовували метод рентгеноструктурного аналізу [6–8]. Дослідження виконано на базі УкрНДІ вуглезбагачення (м. Луганськ) з використанням апарата ДРОН-2,0 з гоніометричною приставкою ГУР-5 та Кα-випромінювання міді з довжиною хвилі 0,1542 нм. Напруга і сила струму на рентгенівській трубці складали відповідно 30 кВ і 10 мА. Дифраговані рентгенівські промені реєстрували в кутовому діапазоні від 3 до 37 ° зі швидкістю запису 10 мм/хв. На отриманих дифрактограмах вивчали кристалографічні характеристики гідроксиапатиту – основного кальційутримуючого мінералу кістки. Для гідроксиапатиту досліджували найбільш виражений дифракційний пік, розташований в кутовому діапазоні 30–34 °, визначали його амплітуду [8, 9]; по кутовому положенню дифракційних піків розраховували міжплощинні відстані в кристалах гідроксиапатиту. Обчислювали розміри блоків когерентного розсіювання (кристалітів) за формулою Селякова–Шерера [7], розраховували коефіцієнт мікротекстурування за методом співвідношення рефлексів [10] і визначали параметри кристалічних грат гідроксиапатиту з урахуванням гексагональної сингонії кристалів. Крім цього, на отриманих дифрактограмах досліджували вміст у мінералі карбонату кальцію (кальциту), аморфного фосфату кальцію (вітлокіту) і кристалічного фосфату кальцію (апатиту) [11, 12].

Результати та їх обговорення. При нанесенні дефекту (група Д) на 7-й та 15-й день ультраструктура біомінералу регенерату характеризувалась ознаками активної біорезорбції кісткових уламків і материнської кістки. Це проявлялось у збільшенні розмірів елементарних комірок та їх конгломератів – кристалітів (табл. 1).

З 30-ї доби ультраструктура мінералу регенерату характеризувалася ознаками утворення нового мінералу, що проявлялось в малих розмірах комірок і кристалітів, які в подальшому поступово збільшувались та поступово наближувались до величин, характерних для інтактної кістки. Коефіцієнт мік-

Таблиця 1. Кристалографічні характеристики кісткового мінералу проксимальної метадіафізарної ділянки великогомілкової кістки щурів старечого віку в залежності від виду впливу (M±m)

Група	Строки, день	Розмір елемент. комірок вздовж осі *a*, 10^{-10} М	Розмір елемент. комірок вздовж осі *c*, 10^{-10} М	Співвідношення *c/a*, 10^2	Розмір блоків когер. розсіювання, нМ	Коефіцієнт мікротекстурування, ум. од.
Д (дефект без діабету)	7-й	9,447±0,003	6,895±0,003	72,98±0,04	43,83±0,79	0,3259±0,0070
	15-й	9,441±0,004	6,890±0,003	72,98±0,06	43,26±0,85	0,3181±0,0086
	30-й	9,421±0,002	6,878±0,004	73,01±0,04	37,90±0,65	0,3850±0,0120
	60-й	9,426±0,005	6,886±0,003	73,05±0,02	40,12±0,55	0,3653±0,0099
	90-й	9,441±0,003	6,892±0,002	73,03±0,03	42,12±0,77	0,3499±0,0098
ДД (дефект з діабетом)	7-й	9,453±0,002	6,902±0,002	73,01±0,04	44,74±0,81	0,2912±0,0042#
	15-й	9,432±0,005#	6,900±0,003	73,00±0,04	46,00±0,71#	0,2888±0,0076#
	30-й	9,434±0,005#	6,902±0,00#	73,16±0,04#	41,53±0,49#	0,3033±0,0119#
	60-й	9,436±0,004	6,896±0,002#	73,08±0,03	40,97±0,96	0,3270±0,0112#
	90-й	9,440±0,003	6,905±0,002#	73,15±0,03#	43,81±0,64	0,3384±0,0071

Примітка. # $p<0,05$; вірогідне розходження з групою Д.

ротекстурування був найменшим на 15-й день і також поступово збільшувався.

У тому випадку, коли дефект ВГК наносили на тлі стрептозотоцинового діабету (група ДД), спостерігалось уповільнення формування кристалічної решітки кісткового мінералу регенерату в порівнянні з показниками тварин групи Д.

Розміри елементарних комірок вздовж осі *a* були більшими за контрольні з 15-го по 60-й день експерименту відповідно на 0,11; 0,14 та 0,11 % ($p>0,05$), а розміри елементарних комірок вздовж осі *c* – з 30-го по 90-й день відповідно на 0,34; 0,15 та 0,15 %. В результаті співвідношення *c/a* також було більшим за контрольне на 30-й та 90-й день експерименту відповідно на 0,20 та 0,16 %. Це є проявом уповільнення резорбції мінералу кісткових уламків у ранні терміни експерименту та уповільнення формування і росту новостворених елементарних комірок біомінералу регенерату пізніше.

Це припущення підтверджується динамікою як коефіцієнта мікротекстурування, так і розмірів кристалітів. Коефіцієнт мікротекстурування був меншим за контрольний (група Д) з 7-го по 60-й день експерименту відповідно на 10,67 і 8,22 %, 21,22 і 10,51 %. Розміри блоків когерентного розсіювання переважали контрольні на 15-й та 30-й день експерименту відповідно на 6,33 и 9,57 %.

Аналіз фазового складу біомінералу ВГК показав, що у інтактних тварин старечого віку в ході спостереження вміст аморфних фаз кісткового мінералу в метадіафізарній ділянці ВГК поступово зростав – кальциту з (12,73±0,22) до (13,90±0,17) %, вітлокіту з (15,10±0,47) до (16,59±0,26) %, а вміст гідроксиапатиту зменшувався з (72,17±0,42) до (69,51±0,40) % (табл. 2). Це пояснюється збільшенням ступеня аморфності кісткового мінералу внаслідок розвитку сенільного остеопорозу. Фазовий склад біомінералу регенерату, що формується в ділянці дефекту ВГК, характеризувався збільшенням ступеня аморфності з 7-го по 30-й день спостереження.

Відсотковий вміст кальциту в контрольній групі переважав показники групи Д у ці терміни відповідно на 32,21; 29,07 та 11,47 %, а вміст вітлокіту – на 17,40; 23,90 та 13,13 %. Разом з тим відсотковий вміст гідроксиапатиту був меншим за контрольний відповідно на 9,52; 10,38 та 5,10 %.

Таблиця 2. Фазовий склад кісткового мінералу проксимальної метадіафізарної ділянки великогомілкової кістки щурів періоду старечих змін в залежності від виду впливу (M±m)

Група	Строки, дні	Склад в мінеральному компоненті, %		
		кальцит	гідроксиапатит	вітлокіт
Контрольна	7-й	12,73±0,22	72,17±0,42	15,10±0,47
	15-й	12,87±0,34	71,65±0,53	15,47±0,83
	30-й	13,49±0,24	70,77±0,42	15,74±0,42
	60-й	13,57±0,34	69,94±0,35	16,49±0,35
	90-й	13,90±0,17	69,51±0,40	16,59±0,26
Д (дефект без діабету)	7-й	16,83±0,42*	65,44±0,61*	17,73±0,29*
	15-й	16,61±0,43*	64,22±0,71*	19,16±0,43*
	30-й	15,03±0,50*	67,16±0,64*	17,81±0,44*
	60-й	14,24±0,35	70,04±0,67	15,71±0,35
	90-й	14,39±0,34	69,95±0,67	15,94±0,26
ДД (дефект з діабетом)	7-й	16,87±0,28*	64,50±0,27*	18,62±0,27*#
	15-й	16,52±0,16*	64,44±0,21*	19,04±0,16*
	30-й	18,22±0,39*#	62,50±0,67*#	19,29±0,71*
	60-й	17,73±0,71*#	65,14±0,83*#	17,13±0,35#
	90-й	16,00±0,26*#	66,39±0,42*#	17,61±0,26*#

Примітка. $p<0,05$; * вірогідне розходження з групою інтактних тварин; # розходження з групою Д.

Отже, отримані результати можна пояснити тим, що в старечому віці в інтактних тварин розвивається вікозалежний остеопороз, що веде до збільшення аморфності кісткового мінералу ВГК. У тому випадку, коли дефект ВГК у щурів старечого віку наносили на тлі стрептозотоцинового діабету, вміст кальциту в біомінералі регенерату перевищував показники тварин групи Д на 7, 30, 60 та 90-й день експерименту відповідно на 5,05; 8,30 ($p>0,05$); 9,03 та 10,48 %.

Вміст кальциту був більшим за показники щурів групи Д з 30-го по 90-й день відповідно на 21,18; 24,50 та 11,19 %, а вміст гідроксиапатиту меншим за них відповідно на 6,94; 7,01 та 4,71 %.

Динаміка фазового складу біомінералу регенерату в щурів групи ДД також підтверджує висновок про те, що його утворення на тлі стрептозотоцинового діабету значно уповільнюється.

Висновки

1. У щурів періоду старечих змін на тлі стрептозотоцинового діабету спостерігалось уповільнення формування кристалічної решітки кісткового мінералу регенерату.

2. Має місце уповільнення резорбції мінералу кісткових уламків у ранні терміни експерименту та уповільнення формування і росту новостворених елементарних комірок біомінералу регенерату пізніше.

3. Динаміка фазового складу біомінералу регенерату свідчить, що його утворення на тлі стрептозотоцинового діабету значно уповільнюється.

Список літератури

1. *Корж Н. А*. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Системные факторы, влияющие на заживление перелома / Н. А. Корж, Н. В. Дедух, О. А. Никольченко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 2. – С. 93–99.

2. Bone regeneration in cranioplasty and clinical complications in rabbits with alloxan-induced diabetes / E. M. Vieira, C. S. Ueno, V.N. Valva [et al.] // Braz. Oral Res. – 2008. – Vol. 22 (2). – P. 184–191.

3. Аналіз первинної інвалідності при переломах кісток кінцівок та їх наслідків за матеріалами травматологічного МСЕК м. Києва / Г. В. Гайко, А. В. Калашніков, А. А. Курило [та ін.] // Матер. пленуму асоціації ортопедів-травматологів України. – Київ–Вінниця, 2004. – С. 7.

4. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В. И. Лузин, Д. В. Ивченко, А. А. Панкратьев [и др.] // Укр. мед. альманах. – 2005. – № 2, додаток. – С. 162.

5. *Лакин Г. Ф*. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М. : Высш. шк., 1980. – 293 с.

6. Структурные изменения костного минерала при деминерализации / С. Н. Данильченко, К. Мозеке, Л. Ф. Суходуб, Б. Сулкио-Клефф // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2000. – № 3. – С. 35–39.

7. *Миркин Л. И*. Рентгеноструктурный анализ. Индицирование рентгенограмм (Справочное руководство) / Л. И. Миркин. – М. : Наука, 1981. – 496 с.

8. *Подрушняк Е. П*. Ультраструктура минерального компонента и прочность костной ткани позвонков у людей различного возраста / Е. П. Подрушняк, А. И. Новохацкий // Ортопедия, травматология и протезирование. – 1983. – № 8. – С. 15–18.

9. Л*узин В. И*. Ультраструктура костного минерала, формирующегося при нанесении сквозного дырчатого дефекта большеберцовой кости у белых крыс различного возраста / В. И. Лузин, В. Н. Прочан, Р. Н. Глущенко // Галицьк. лікарськ. вісник. – 2010. – Т. 17, вип. 2 (2). – С. 70–73

10. *Пономарев В. В*. Рентгеноструктурные методы исследования в инженерной геологии / В. В. Пономарев. – М. : Недра, 1981. – 194 с.

11. *Лузин В. И*. Применение рентгеноструктурного анализа для исследования фазового состава костного минерала / В. И. Лузин // Укр. морфол. альманах. – 2005. – Т. 3, № 4. – С. 61–64.

12. Фазовый состав минерала, формирующегося при заполнении костных дефектов керамическим гидроксиапатитом и деминерализованным костным матриксом / В. И. Лузин, Е. П. Бережной, С. Л. Кучеренко [и др.] // Укр. морфол. альманах. – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 56–58.

А.В. Ивченко

УЛЬТРАСТРУКТУРА МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА КОСТИ, ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ В МЕСТЕ ДЕФЕКТА НА ФОНЕ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА У КРЫС ПЕРИОДА СТАРЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ

На 105 крысах периода старческих изменений определена ультраструктура минерального компонента кости, формирующейся на месте дефекта в условиях экспериментального диабета. Для инициации сахарного диабета крысам вводили стрептозотоцин. На 17-й день от начала эксперимента наносили дефект проксимального метафиза большеберцовой кости. У подопытных крыс на фоне стрептозотоцинового диабета наблюдалось замедление формирования кристаллической решётки костного минерала регенерата. Динамика фазового состава биоминерала регенерата свидетельствует, что его образование на фоне стрептозотоцинового диабета значительно замедляется.

Ключевые слова: *крысы периода старческих изменений, стрептозотоциновый диабет, дефект большеберцовой кости, рентгеноструктурный анализ.*

A.V. Ivchenko

UULTRASTRUCTURE OF THE MINERAL BONE COMPONENT, ORIGINATING ON DEFECT AREA ON THE BACKGROUND OF STREPTOZOTOCIN DIABETES IN RATS OF ELDERLY CHANGES PERIOD

The ultrastructure of mineral bone component originating in defect area in conditions of experimental diabetes was determined on 105 mature rats. Streptozotocin was injected to initiate diabetes mellitus. Proximal tibia metaphysis defect was conducted on the 17th day of the experiment. The retardation in formation of crystallic lattice of bone mineral regenerate has been observed among rats of elderly period on the background of streptozotocin diabetes. Biomineral regenerate phase contents dynamics testifies that its formation on the background of streptozotocin diabetes is considerably retarded.

Key words: *rats of elderly changes period, streptozotocin diabetes, shin-bone defect, roentgen structural analysis.*

Поступила 15.06.12