

УДК 616-089.843

© Стрий В.В., Лузин В.И., 2010

## ФАЗОВЫЙ СОСТАВ МИНЕРАЛА ТАЗОВОЙ КОСТИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ В БОЛЬШЕБЕРЦОВУЮ КОСТЬ ГИДРОКСИЛАПАТИТА, НАСЫЩЕННОГО МЕДЬЮ

Стрий В.В., Лузин В.И. \*

Винницький національний медичний університет ім. Н.П. Пирогова; Луганський державний медичний університет\*

**Стрий В.В., Лузин В.И.** Фазовый состав минералов тазовой кости при имплантации в большеберцовую кость биогенного гидроксилапатита, насыщенного медью // Украинський морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №3. – С.139-141.

В эксперименте на белых крысах репродуктивного возраста установлено, что нанесение сквозного дырчатого дефекта в большеберцовой кости сопровождается увеличением степени аморфности биоминерала тазовой кости, сохраняющимся до 90 дня с момента операции. Имплантация биогенного гидроксилапатитного материала ОК-015 в нанесенный дефект в большеберцовой кости также сопровождается увеличением степени аморфности биоминерала тазовой кости, которое более выражено в ранние сроки наблюдения и полностью сглаживается к 90 дню после оперативного вмешательства. Насыщение имплантата медью нивелирует выявленные отклонения.

**Ключевые слова:** костная система, костный минерал, гидроксилапатит, медь.

**Стрий В.В., Лузин В.И.** Фазовий склад мінералів тазової кістки при імплантації до великогомілкової кістки біогенного гідроксилапатиту, насиченого міддю // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №3. – С. 139-141.

В експерименті на білих щурах репродуктивного віку встановлено, що нанесення наскрізного дірчастого дефекту у великогомілкової кістки супроводжується збільшенням ступеня аморфності біомінерала тазової кістки, що зберігається до 90 дня після операції. Імплантація біогенного гідроксилапатитного матеріалу ОК-015 до дефекту у великогомілкової кістки також супроводжується підвищенням ступеня аморфності кісткового мінералу тазової кістки, яке було більш визначене в ранні терміни спостереження та повністю згладжується на 90 день після оперативного втручання. Насичення імплантату міддю нівелює визначені відхилення.

**Ключові слова:** кісткова система, кістковий мінерал, гідроксилапатит, мідь.

**Stry V.V., Luzin V.I.** Phase content of hipbone mineral under effect of hydroxyapatite implants in tibia, saturated with copper // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №3. – С. 139-141.

In the experiment on thoroughbred adult rats we proved that through defect leads to increase of amorphous mineral share in hipbone. The ratio between the two phases remains unchanged up to 90<sup>th</sup> day of the experiment. Implantation of hydroxyapatite into the defect has no immediate effect on amorphous mineral formation but by the 90<sup>th</sup> day of the experiment its share reduces considerably and returns to baseline values. Saturation the hydroxyapatite by copper levels the revealed deviations.

**Key words:** bone system, bone mineral, hydroxyapatite, copper.

Доказано, что при травматическом повреждении одной из костей скелета развивается системный остеопенический синдром – то есть на перелом отдельной кости реагирует костная система в целом, а не только поврежденный сегмент скелета [9, 12]. Имеются также единичные сведения о реакции костного скелета на травматическое повреждение одного из его отделов в тех случаях, когда производится пластика дефекта различными материалами. Ранее нами было установлено, что нанесение дефектов в большеберцовых костях и их заполнение биогенным материалом на основе гидроксилапатита у белых крыс репродуктивного возраста сопровождается дисбалансом химического состава костей скелета, снижением их прочности, замедлением темпов их роста [1, 5, 7]. При этом использование гидроксилапатитных материалов, содержащих в своем составе ионы различных микроэлементов (селена, цинка, марганца и др.) в значительной степени сглаживает выявленные отклонения [7, 8].

Представляется интересным в этом отношении легирование имплантируемого материала ОК-015 медью в различной концентрации, поскольку с одной стороны, медь выступает (вместе с O<sub>2</sub>, витамином С и α-кетоглутаратом) как катализатор в формировании стабильной трехспиральной молекулы костного коллагена [10, 11], определяющей в дальнейшем течение процессов минерализации и отложения костного гидроксилапатита. С другой стороны, как доказано [14, 15], недостаток меди в системе цитохром С-оксидаза-цитохром С ингибирует энергетический цикл остеогенных клеток, нарушается синтез белка, что приводит к гибели клеток и сказывается на процессах минерализации. Следовательно, в условиях присутствия ионов меди создаются оптимальные условия для системы цитохром С-оксидаза-цитохром

С, и, возможно, будут созданы условия и для сглаживания системных реакций скелета в этих условиях.

**Целью данного исследования** явилось исследование фазового состава минерала тазовых костей белых крыс при нанесении дефекта большеберцовых костей и заполнении его биогенным гидроксилапатитным материалом ОК-015, насыщенным медью в различной концентрации. Работа является фрагментом межкафедральной НИР Луганского государственного медицинского университета “Морфогенез костей скелета при заполнении костных дефектов гидроксилапатитными материалами различного состава” (гос. регистрационный № 0109U004621).

**Материал и методы исследования.** Исследования проведены на 105 белых крысах-самцах с исходной массой тела 135-145 г, распределенных на три группы: 1-ая группа - интактные животные, 2-ая группа – животные, которым с использованием эфирного масочного наркоза были сформированы сквозные костные дефекты на границе проксимального метафиза и диафиза большеберцовой кости (ББК) диаметром 2,2 мм [6]. Поскольку передзадний размер ББК в этой области составляет у крыс данного возраста в среднем 3,5-3,6 мм, целостность костного органа и функциональная нагрузка на него сохранялись. В 3-ей группе в нанесенный дефект имплантировали блоки биогенного гидроксилапатита диаметром 2,2 мм, содержащего стеклофазу (материал ОК015). В 4-6-ой группах дефект заполняли блоками ОК-015, насыщенного медью в концентрациях соответственно 0,10%, 0,25% и 0,50%. Все манипуляции на животных выполняли в соответствии с правилами европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [13].

По истечении сроков эксперимента (от 7 до 180

дней) выделяли тазовые кости, растирали их в агатовой ступке в порошок и исследовали методом рентгеноструктурного анализа по методике внутреннего контроля [3]. Определяли объемное содержание кристаллического фосфата кальция – гидроксилатапата, а также содержание аморфного фосфата кальция ( $\beta$ -трикальцийфосфата либо витлокита) и карбоната кальция (кальцита).

Все полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием стандартных прикладных программ [2].

**Результаты и их обсуждение.** Оценка всех полученных результатов проводилась при обязательном сравнении с показателями интактных животных аналогичного возраста (контрольная группа).

**Таблица.** Некоторые показатели фазового состава минерала тазовой кости половозрелых белых крыс при имплантации ОК-015 различного состава в область проксимального метадиафиза большеберцовой кости ( $X \pm Sx$ )

Группа	Срок (дни)	Фазовые компоненты костного минерала, %		
		Кальцит	Гидроксилатапатит	Витлокит
Интактные	7	14,34±0,33	67,28±0,67	18,37±0,39
	15	13,87±0,23	68,22±0,59	17,91±0,39
	30	13,81±0,42	68,90±0,73	17,29±0,33
	60	13,14±0,32	70,18±0,45	16,68±0,48
	90	13,24±0,35	70,11±0,46	16,65±0,35
	180	13,73±0,25	69,57±0,43	16,69±0,21
Дефект	7	14,85±0,50	65,33±0,77	19,82±0,40*
	15	14,77±0,61	64,09±1,26*	21,14±0,75*
	30	14,88±0,59	66,07±0,72*	19,05±0,20*
	60	14,87±0,35*	66,35±0,64*	18,78±0,47*
	90	14,11±0,15	68,52±0,35*	17,26±0,33
	180	13,67±0,20	68,71±0,44	17,62±0,46
Материал ОК-015	7	15,24±0,45	64,90±0,62*	19,86±0,88*
	15	15,65±0,31*	65,17±0,45*	19,19±0,38*
	30	14,49±0,41	66,53±0,74	18,98±0,43*
	60	14,35±0,26*	67,12±0,31*	18,53±0,18*
	90	13,25±0,27#	70,38±0,36#	16,37±0,39
	180	13,87±0,15	69,28±0,36	16,85±0,26
ОК015 + 0,1% Cu	7	16,16±0,23*^	63,76±0,53*	20,07±0,42*
	15	14,40±0,27#	66,91±0,32#	18,69±0,28^
	30	14,53±0,29	67,31±0,33	18,16±0,25^
	60	13,91±0,51	69,61±0,64^#	16,47±0,26^#
	90	13,19±0,42	71,11±0,53^	15,69±0,53^
	180	13,94±0,25	69,42±0,41	16,65±0,27
ОК015 + 0,25% Cu	7	16,24±0,32*^	63,06±0,30*^#	20,70±0,42*
	15	14,54±0,46	66,81±0,53#	18,66±0,26^
	30	13,73±0,46	68,95±0,57^#	17,32±0,23^#
	60	13,61±0,26^	70,10±0,51^#	16,29±0,28^#
	90	13,12±0,31^^	70,44±0,37^	16,43±0,19
	180	13,81±0,14	70,02±0,41	16,17±0,30^
ОК015 + 0,5% Cu	7	16,49±0,32*^#	63,11±0,25*^#	20,39±0,30*
	15	13,37±0,40#	68,12±0,57^#	18,51±0,35^
	30	14,28±0,34	68,44±0,69^	17,29±0,52^#
	60	14,07±0,26*	68,31±0,41*^#	17,62±0,28*#
	90	1,01±0,35^	71,17±0,27^	15,82±0,32^
	180	12,88±0,31#	70,58±0,24^#	16,54±0,29

**Примечание:** \* - здесь и далее обозначает достоверное отличие от группы интактных животных ( $p < 0,05$ ); ^ - здесь и далее обозначает достоверное отличие от группы с незаполненным дефектом ( $p < 0,05$ ); # - здесь и далее обозначает достоверное отличие от группы ОК-015 без легирования ( $p < 0,05$ )

У интактных животных в ходе наблюдения с 7 по 90 дни наблюдения содержание кристаллического фосфата кальция в костном минерале тазовой кости постепенно возрастало – с  $67,28 \pm 0,67\%$  до  $70,11 \pm 0,46\%$  (табл.), а доли аморфных составляющих – витлокита и кальцита – понижались соответственно с  $18,37 \pm 0,39\%$  до  $16,65 \pm 0,35\%$  и с  $14,34 \pm 0,33\%$  до  $13,24 \pm 0,35\%$ . Это соответствует полученным нами ранее данным о фазовом составе костного минерала у интактных животных репродуктивного возраста [4]. К

180 дню наблюдения намечалась слабовыраженная тенденция к обратному изменению исследуемых показателей, что можно рассматривать как начальные проявления процессов старения костной системы [9].

Нанесение сквозного дырчатого дефекта в большеберцовой кости сопровождалось увеличением степени аморфности биоминерала губчатого вещества тазовой кости. При этом содержание гидроксилатапата в биоминерале тазовой кости было меньше аналогичных показателей у интактных животных в период с 7 по 90 день эксперимента соответственно на 2,90%, 6,04%, 4,11%, 5,46% и 2,27%. В то же время содержание карбоната кальция в костном минерале превосходило показатели интактных животных в те же сроки соответственно на 3,50%, 6,46%, 7,74%, 13,15% и 6,58%. Доля аморфного фосфата кальция (витлокита) изменялось более значительно по амплитуде, но лишь в период с 7 по 60 дни наблюдения, когда оно превосходило контрольные показатели соответственно на 7,87%, 18,01%, 10,19% и 12,62%.

К 180 дню эксперимента достоверные отклонения исследуемых показателей не определялись.

В том случае, когда в нанесенный в большеберцовой кости дефект имплантировали материал ОК-015, также было выявлено увеличение степени аморфности костного минерала тазовой кости, однако степень отклонений в ранние сроки была несколько выше, чем в группе без имплантации. При этом отклонения регистрировались лишь в период до 60 дня эксперимента.

При имплантации в большеберцовую кость материала ОК-015 процентное содержание гидроксилатапата в минерале тазовой кости было меньше показателей контрольной группы соответственно установленным срокам эксперимента на 3,53%, 4,47%, 3,44% и 4,37%. Содержание кальцита в исследуемом биоминерале превосходило контрольные показатели с 7 по 60 дни эксперимента на 6,20%, 12,81%, 4,91% и 9,19%, а доля витлокита – соответственно на 7,87%, 18,01%, 10,19% и 12,62%.

К 90 и 180 дням эксперимента достоверные отклонения исследуемых показателей не определялись.

При насыщении имплантата медью в различных концентрациях (4-6-я группы) динамика фазового состава минерала тазовой кости качественно не отличалась от таковой в 3-й группе, но имели место некоторые количественные отличия.

Имплантация ОК-015, насыщенного медью в концентрации 0,10% сопровождалась в сравнении с 3-й группой к 15 и 60 дням увеличением доли гидроксилатапата на 2,67% и 3,72% и уменьшением содержания кальцита и витлокита – соответственно на 7,96% и 3,07% ( $p > 0,05$ ) и на 2,59% ( $p > 0,05$ ) и 11,10%.

В том случае, когда ОК-015 был насыщен медью в концентрации 0,25% (5-я группа), к 7 дню содержание гидроксилатапата в минерале тазовой кости было меньше аналогичного в 3-й группе на 2,84%, а доли кальцита и витлокита – больше, соответственно на 6,57% ( $p > 0,05$ ) и 4,23% ( $p > 0,05$ ). Вероятно, это связано с тем, что в присутствии меди в имплантате процессы регенерации протекают активнее, вследствие чего активизируются ответные реакции скелета в целом.

В дальнейшем, с 15 по 60 дни содержание гидроксилатапата в тазовой кости было больше, чем в 3-й группе соответственно на 2,51%, 3,64% и 4,45%.

Содержание аморфных компонентов в те же сроки было меньше значений 3-й группы: кальцита на 7,10%, 5,27% и 5,18% ( $p>0,05$  во всех случаях), а витлокита – на 2,76% ( $p>0,05$ ), 7,74% и 12,12%.

Аналогичными, но более выраженными были изменения фазового состава костного минерала в группе с максимальной концентрацией меди в имплантате – 0,50%. К 7 дню наблюдения содержание гидроксилapatита в минерале тазовой кости было меньше аналогичного в 3-й группе на 2,75%, а доли кальцита и витлокита – больше, соответственно на 8,21% и 2,69% ( $p>0,05$ ).

В дальнейшем, с 15 по 180 дни содержание гидроксилapatита в тазовой кости было больше, чем в 3-й группе соответственно на 4,53%, 2,86% ( $p>0,05$ ), 1,77%, 1,13% ( $p>0,05$ ) и 1,88%. Содержание аморфных компонентов в те же сроки было меньше значений 3-й группы: кальцита на 14,55%, 1,47% ( $p>0,05$ ), 1,99% ( $p>0,05$ ), 1,81% ( $p>0,05$ ) и 7,15%, а аморфного фосфата кальция – соответственно на 3,54% ( $p>0,05$ ), 8,91%, 4,90%, 3,38% ( $p>0,05$ ) и 1,82% ( $p>0,05$ ).

**Заключение.** Таким образом, нанесение сквозного дырчатого дефекта в проксимальных отделах диафиза большеберцовой кости при сохранении функциональной нагрузки сопровождается изменениями фазового состава биологического минерала тазовой кости. Это проявляется в увеличении содержания аморфных солей кальция (кальцита и витлокита) и уменьшении содержания кристаллического фосфата кальция (гидроксилapatита) в период до 90 дня эксперимента. Следует полагать, что выявленные отклонения являются проявлением системной реакции скелета на активно текущие процессы репаративной регенерации в большеберцовой кости. Данное предположение подтверждается также тем фактом, что максимальная амплитуда выявленных отклонений была к 15 и 60 дням эксперимента – в период наибольшей интенсивности формирования и перестройки костного регенерата в большеберцовой кости.

Имплантация в нанесенный дефект большеберцовой кости биогенного материала на основе гидроксилapatита (ОК-015) сопровождалась аналогичными изменениями, однако, были выявлены и некоторые отличия. Во-первых, к 7 и 15 дням эксперимента выявленные отклонения были выражены больше, чем в группе без имплантации. По-видимому, это можно объяснить активными процессами перестройки имплантированного в большеберцовую кость материала в данный период. Во-вторых, во временном интервале изменения фазового состава костного минерала регистрировались менее продолжительный период, чем в группе без имплантации (до 60 дня). Вероятно, это связано с тем, что присутствию солей кальция (имплантированного материала) в участке интенсивно протекающих процессов регенерации сглаживает системную реакцию скелета.

Насыщение ОК-015 медью к 7 дню характеризовалось более выраженной, чем в группе без насыщения реакцией фазового состава тазовой кости, что, вероятно, связано с активизацией в присутствии ионов меди процессов репаративной регенерации в большеберцовой кости. В дальнейшем, насыщение ОК-015 медью сопровождалось сглаживанием отклонений в фазовом составе минерала тазовой кости. Наиболее предпочтительной, по нашим данным, является концентрация меди 0,50%.

### Перспективы дальнейших исследований.

Для подтверждения выявленных закономерностей будет проведено сравнительное гистоморфометрическое исследование регенерата большеберцовой кости и других отделов костного скелета.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Ивченко В.К. Особенности роста и формообразования костей скелета при имплантации в большеберцовую кость «Остеоapatита керамического»-015, легированного марганцем/ В.К. Ивченко, В.И. Лузин, А.А. Лубенец, Д.В. Ивченко // Украинський морфологічний альманах. – 2007. – Том 5, №2. – С.114-115.
2. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – Киев: Морфосон, 2000. – 320 с.
3. Лузин В.И. Применение рентгеноструктурного анализа для исследования фазового состава костного минерала/ В.И. Лузин // Украинський морфологічний альманах. – 2005. - Том 3, №4. – С. 61-64. Лузин В.И.
4. Сравнительное исследование ультраструктуры костного и керамического гидроксилapatита методом рентгеноструктурного анализа/ Лузин В.И., Бережной Е.П., Кучеренко С.А., Глушенко Р.Н. // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Том 9, №3. – С. 105-108.
5. Лузин В.И. Прочность плечевой кости при имплантации в большеберцовую кость гидроксилapatитного материала ОК-015/ В.И. Лузин, В.К. Ивченко, Д.В. Ивченко, и др. // Травма. - 2007. – Том 8, №4. – С. 387-389.
6. Лузин В.И. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В.И. Лузин, Д.В. Ивченко, А.А. Панкратьев, и др. // Украинський медичний альманах. – 2005. – Том 8, №2 (додаток). – С. 162.
7. Лузин В.И. Минеральная насыщенность различных отделов скелета при имплантации в большеберцовую кость „Остеоapatита керамического – 015” / В.И. Лузин, И.Г. Новоскольцева, В.В. Стрий и др. // Украинський морфологічний альманах. – 2007. – Т. 5, № 2. – С. 114-115.
8. Лузин В.И. Прочность плечевой кости при имплантации в большеберцовую кость гидроксилapatитного материала ОК-015, легированного медью/ В.И. Лузин, В.В. Стрий // Украинський медичний альманах. – 2009. – Том 12, №5. – С. 114-117.
9. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение: Монография / Акад. мед. наук Украины; Под ред. Н.А.Коржа. – Х.: Золотые страницы, 2002. – 648 с.
10. Скоблин А.П. Микроэлементы в костной ткани / А.П. Скоблин, А.М. Белоус. - М.: Медицина, 1968.-232 с.
11. Смоляр В.И. Влияние недостатка меди на рост и формирование костной ткани / В.И. Смоляр, Э.В. Биняшевский // Вопросы питания.– 1988.– №6.– С. 28-32.
12. Cattermole H.C. Bone mineral changes during tibial fracture healing / H.C. Cattermole, J.E. Cook, J.N. Fordham, [et al.] // Clin. Orthop.– 1997.– Vol.339.– P.190-196.
13. 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.
14. Lowe N.M. Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? / N.M. Lowe, W.D. Fraser, M.J. Jackson // Proc.Nutr.Soc. - 2002. - Vol. 61. – P.181-185.
15. Pabbruwe M.B. Bone formation within alumina tubes: effect of calcium, manganese, and chromium dopants / M.B. Pabbruwe, O.C. Standard, C.C. Sorrell, et al. // Biomaterials. - 2004. - Vol.25. – P.4901.