

УДК 591.471.42:615.37"46"

© Лузин В.И., Левченко Н.В., 2012

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОМИНЕРАЛОВ КОСТИ И ДЕНТИНА РЕЗЦА НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ БЕЛЫХ КРЫС РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ИМ ЦИКЛОФОСФАНА**Лузин В.И., Левченко Н.В.***ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»*

Установлено, что костная система активно реагирует на влияние различных как внешне-средовых, так и эндогенных факторов. При этом в условиях техногенного загрязнения окружающей среды резко возрастает вероятность развития различных иммунодефицитных состояний [4]. Имеются сведения о том, что на морфогенез костной системы влияет и состояние иммунной системы организма [3]. Однако сведения о морфогенезе структур лицевого черепа, а также нижней челюсти, при иммунодефицитных состояниях в доступной литературе практически отсутствуют.

Цель данного исследования: изучить особенности ультраструктуры биоминерала кости, а также дентина резца нижней челюсти белых крыс различного возраста при введении им циклофосфана. Статья является фрагментом научно-исследовательской работы кафедры анатомии человека ГЗ «Луганский государственный медицинский университет» «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 периода выраженных старческих изменений (310-320 г).

Иммуносупрессивное состояние у животных моделировали путём введения циклофосфана. Расчёт дозировки вводимого препарата производили с учётом рекомендаций Ю.Р. и Р.С. Рыболовлевых [10], 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.

Цитостатик циклофосфан «Cyclophosphamid» ингибирует размножение и рост клеток, подавляет пролиферацию лимфоцитарных клонов, является онкогеном, снижает функцию альвеолярных макрофагов, продукцию лимфокинов, комплемента, интерферона. Как иммунодепрессант циклофосфан применяется при лечении аутоиммунных, ревматических заболеваний и в трансплантологии [2, 6]. Клетками-мишенями для него являются В-лимфоциты, Т-хелперные клетки, предшественники Т-супрессорных лимфоцитов, зрелые Т-супрессорные лимфоциты, предшественники эффекторных клеток. В дозах до 5 мг/кг в сутки препарат является цитотоксичным для В-лимфоцитов и угнетает их пролиферацию, вызывает истощение В-клеточно-зависимых пулов в селезёнке и лимфоузлах без нарушения Т-клеточно-зависимых регионов. В эксперименте циклофосфан (Р.97.243.42.) вводили животным внутривентриально на физиологическом растворе, инъекции производились ежедневно в дозировке 1 мг/кг веса в течение десяти дней. Контролем служили крысы, которым вводили физиологический раствор в эквивалентных объёмах.

По окончании эксперимента (через 7, 15, 30, 90 и 180 дней после окончания введения препарата) животных декапитировали под эфирным наркозом, нижние челюсти разделяли на костное вещество и резец, с которого при помощи бормашины стачивали эмаль и цемент. Рентгеноструктурное исследование порошка костного вещества и дентина резца, полученного в агатовой ступке, 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 анодного тока составляли соответственно 30 кВ и 20 А [8]. Дифрагированные рентгеновские лучи регистрировали в угловом диапазоне от 2° до 37° со скоростью записи 1° в 1 минуту [1]. На полученных дифрактограммах исследовали наиболее выраженные дифракционные пики, по угловому положению которых рассчитывали размеры блоков когерентного рассеивания по уравнению Селякова-Шерера и рассчитывали коэффициент микротекстурирования по методу соотношения рефлексов [7, 9].

Все полученные цифровые данные обраба-

тивали методами вариационной статистики с использованием стандартных прикладных программ [8].

Все манипуляции на животных выполняли в соответствии с правилами Европейской конвенции защиты позвоночных животных, использующихся в экспериментальных и других научных целях [11].

Результаты и их обсуждение. Оценку полученных результатов проводили при обязательном сопоставлении с аналогичными показателями одновозрастных контрольных животных.

У неполовозрелых интактных крыс с 7 по 180 день наблюдения 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. При этом соотношение размеров элементарных ячеек *c/a* колебалось в пределах $72,91 \pm 0,02 (10^{-2})$ – $72,94 \pm 0,03 (10^{-2})$. Размеры блоков когерентного рассеивания в ходе наблюдения также увеличивались с $36,20 \pm 0,60$ нМ до $41,14 \pm 0,88$ нМ, а коэффициент микротекстурирования – с $0,3151 \pm 0,0093$ у.е. до $0,3931 \pm 0,0111$.

Полученные результаты свидетельствуют об активном росте и формировании костного минерала и увеличении с возрастом степени упорядоченности кристаллической решетки у интактных неполовозрелых животных.

В репродуктивном возрасте у интактных животных параметры элементарных ячеек вдоль осей *a* и *c* в период наблюдения продолжали увеличиваться соответственно с $9,378 \pm 0,002 \cdot 10^{-10}$ М до $9,383 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М и с $6,842 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М до $6,851 \pm 0,001 \cdot 10^{-10}$ М. В результате этого соотношение размеров элементарных ячеек костного гидроксилапатита *c/a* постепенно увеличивалось с $72,95 \pm 0,03 (10^{-2})$ до $73,01 \pm 0,03 (10^{-2})$. Размеры блоков когерентного рассеивания также продолжали 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.

Следовательно, можно утверждать о том, что в репродуктивном возрасте у интактных крыс продолжают рост и формирование элементарных ячеек, а также происходит дальнейшая стабилизация кристаллической решетки костного биоминерала.

У крыс старческого возраста с 7 по 180 день наблюдения параметры элементарных ячеек вдоль оси *a* 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 $73,16 \pm 0,02 (10^{-2})$. Размеры кристаллитов возрастали с $41,97 \pm 0,61$ нМ до $52,09 \pm 0,71$ нМ. При этом коэффициент микротекстурирования за ис-

следуемый период уменьшился с $0,4047 \pm 0,0038$ у.е. до $0,3412 \pm 0,0041$ у.е.

Это свидетельствует о развитии возрастзависимого остеопороза, в результате чего начинаются процессы дестабилизации кристаллической решетки костного биоминерала.

Возрастные изменения ультраструктуры биоминерала дентина имели сходную направленность. В ходе наблюдения у неполовозрелых крыс контрольной группы размеры элементарных ячеек биоминерала дентина вдоль оси *a* увеличивались с $9,347 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ М до $9,360 \pm 0,003 \cdot 10^{-10}$ 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* при этом было стабильным составляло $72,83 \pm 0,05 (10^{-2})$. В те же сроки размеры кристаллитов фторапатита увеличились с $26,47 \pm 0,21$ нМ до $28,54 \pm 0,25$ нМ, а значение коэффициента микротекстурирования – с $0,4839 \pm 0,0166$ у.е. до $0,5471 \pm 0,0095$ у.е.

В репродуктивном возрасте в ходе наблюдения размеры элементарных ячеек фторапатита вдоль оси *a* увеличивались 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 затем к 180 дню уменьшалось до $72,81 \pm 0,04 (10^{-2})$. Размеры кристаллитов фторапатита в ходе наблюдения увеличивались с $28,81 \pm 0,38$ нМ до $32,44 \pm 0,36$ нМ. Коэффициент микротестурирования с 7 по 90 дни увеличивался с $0,5597 \pm 0,0114$ у.е. до $0,5727 \pm 0,0064$ у.е, а затем к окончанию периода наблюдения снизился до $0,5689 \pm 0,0046$ у.е.

Это свидетельствует об уменьшении с возрастом общей обменной поверхности фторапатита и дестабилизации его кристаллической решетки, что, скорее всего, является проявлением первых признаков возрастного генерализованного пародонтоза.

Ультраструктура биоминерала дентина у крыс контрольной группы в период выраженных инволютивных изменений имела следующие особенности: параметры элементарных ячеек вдоль оси *a* 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. При этом соотношение размеров *c/a* колебалось в пределах $72,76 (10^{-2})$ – $72,91 (10^{-2})$. Размеры кристаллитов фторапатита при этом увеличивались с $34,16 \pm 0,49$ нМ до $36,99 \pm 0,31$ нМ, а коэффициент микротекстурирования понижался с $0,5653 \pm 0,0033$ у.е. до $0,4973 \pm 0,23$ у.е.

Это свидетельствует о том, что у крыс старческого возраста уменьшается общая обменная поверхность биоминерала дентина и происходит дестабилизация его кристаллической решетки, что свидетельствует о развитии сенильного остеопороза и генерализован-

ного пародонтоза у животных контрольной группы.

После окончания введения неполовозрелым крысам циклофосфана изменения в ультраструктуре костного биоминерала наблюдались на 90 и 180 день исследования. В эти сроки размеры элементарных ячеек вдоль оси c превосходили контрольные данные на 0,11% и 0,15%, а коэффициент микротекстурирования был меньше контрольного на 10,25% и 8,10%. Размеры кристаллитов у подопытных животных во все сроки эксперимента превышали контрольные значения, однако, эти отличия не достигали границ доверительного интервала.

В биоминерале дентина размеры элементарных ячеек вдоль оси a превышали контрольные значения на 30 сутки на 0,08% и на 180 сутки – на 0,09%, а вдоль оси c – на 90 день на 0,13%. Соотношение размеров элементарных ячеек c/a на 30 день было меньше, чем у животных контрольной группы, на 0,18%. Размеры кристаллитов фтороapatита превосходили контрольные на 90 и 180 день соответственно на 4,56% и 6,86%, а коэффициент микротекстурирования на 30 и 180 день был меньше контрольного на 4,31% и 8,02%.

После введения цитостатика половозрелым крысам достоверные изменения ультраструктуры костного биоминерала регистрировались на 90 и 180 день эксперимента. В эти сроки размеры блоков когерентного рассеивания были больше, чем у интактных животных, на 3,52% и 4,23%, а коэффициент микротекстурирования, напротив, меньше на 4,31% и 4,47%. Параметры элементарных ячеек превышают контрольные значения вдоль оси c также на 90 и 180 день на 0,10% и 0,10%, а размер вдоль оси a – на 180 день на 0,12%.

Процессы нуклеации и роста элементарных ячеек биоминерала дентина у животных сравнимых групп протекали идентично, так как размеры элементарных ячеек вдоль осей a и c не имели существенных отличий. Размеры блоков когерентного рассеивания у подопытных крыс были больше, чем у интактных на 180 день превысили контрольный показатель на 4,23%. Достоверные изменения коэффициента микротекстурирования не регистрировались.

У крыс старческого возраста применение цитостатика вызвало изменения в ультраструктуре биоминералов кости и дентина также начиная с 90 дня эксперимента.

На 90 и 180 день размеры элементарных ячеек костного биоминерала вдоль оси a превышали контрольные показатели на 0,09% и 0,07%, а коэффициент микротекстурирования был ниже, чем у интактных животных, на 6,29% и 4,84%. Также, размеры кристаллитов гидроксилapatита были больше контрольных на 180 день на 4,14%.

Параметры элементарных ячеек минерала дентина вдоль оси a у подопытных животных больше, чем у контрольных крыс, на 90 день на 0,09%, а вдоль оси c на 180 день – на 0,12%. К 90 и 180 дню эксперимента размеры блоков когерентного рассеивания биоминерала дентина у крыс, которым вводили циклофосфан, были больше, чем у интактных животных, на 4,42% и 3,67%, а коэффициент микротекстурирования – меньше соответственно на 4,02% и 7,57%.

Заключение. Полученные в ходе эксперимента данные позволяют утверждать следующее:

1. Биоминерал дентина характеризуется меньшими размерами элементарных ячеек и блоков когерентного рассеивания, а также более высокой степенью упорядоченности кристаллической решетки, чем костный минерал.

2. В период инволютивных изменений биоминерал дентина так же, как и костный апатит, характеризуется прогрессирующей дестабилизацией кристаллической решетки.

3. Внутривентральное введение циклофосфана в дозировке 1 мг/кг веса в течение десяти дней у животных всех возрастных групп сопровождается явлениями дестабилизации кристаллической решетки и уменьшении общей обменной поверхности биоминерала кости и дентина. У неполовозрелых крыс отклонения регистрируются с 30 дня эксперимента, а у животных репродуктивной и инволютивной возрастных групп – с 90 дня.

4. Изменения ультраструктуры костного минерала и биоминерала дентина у крыс периода старческих изменений после введения циклофосфана можно также рассматривать как проявления ускоренного старения.

Перспективы дальнейших исследований. Для подтверждения полученных результатов в дальнейшем планируется провести биохимическое исследование биоминералов костного вещества и дентина резца нижней челюсти у белых крыс различного возраста в условиях нашего эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Азаров Л.В. Метод порошка в рентгенографии / Л.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 паблишинг. – 2000. – 539 с.
3. Кашенко С.А. Особенности остеогенеза при

действии иммуностимуляторов / С.А. Кашенко // Проблеми остеології. - 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. 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.

6. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В двух томах. - Харьков: Торсинг.- Изд. 14-е. - 2002. – Т. II - 560 с.

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

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

9. Подрушник Е.П. Ультраструктура минерально-

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

10. 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.

11. 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.

Лузин В.И., Левченко Н.В. Рентгеноструктурное исследование биоминералов кости и дентина резца нижней челюсти белых крыс различного возраста после введения им циклофосфана // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, №1. – С. 177-180.

В эксперименте на 180 белых крысах трех возрастных групп исследовали прочность нижней челюсти при введении циклофосфана. Установили, что внутрибрюшинное введение циклофосфана в дозе 1 мкг/кг массы тела в течение десяти дней у животных всех возрастных групп сопровождается явлениями дестабилизации кристаллической решетки и уменьшения общей обменной поверхности биоминерала кости и дентина. У неполовозрелых крыс отклонения регистрируются с 30 дня эксперимента, а у животных репродуктивной и инволютивной возрастных групп - с 90 дня. Изменения ультраструктуры костного минерала и биоминерала дентина у крыс периода старческих изменений после введения можно также рассматривать как проявления ускоренного старения.

Ключевые слова: крысы, онтогенез, нижняя челюсть, апатиты, циклофосфан.

Лузин В.И., Левченко Н.В. Рентгеноструктурне дослідження біомінералів кістки та дентину різця нижньої щелепи білих щурів різного віку при введенні циклофосфану // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, №1. – С. 177-180.

В експерименті на 180 білих щурах трьох вікових груп досліджували міцність нижньої щелепи при введенні циклофосфану. Встановили, що внутрішньоочеревинне введення циклофосфану у дозі 1 мкг/кг маси тіла на протязі десятих днів у тварин усіх вікових груп супроводжується явищами дестабілізації кристалічної решітки та зменшенням загальної обмінної поверхні біомінералу кістки та дентину. У статевонезрілих тварин відхилення реєструються з 30 доби експерименту, а у репродуктивних та інволютивних тварин – з 90 доби. Зміни ультраструктури кісткового мінералу та біомінералу дентину у старих щурів можна також розглядати як прови прискореного старіння.

Ключові слова: щури, онтогенез, нижня щелепа, апатити, циклофосфан.

Luzin V.I., Levchenko N.V. X-ray diffraction study of biominerals of bone and mandibular incisors dentin in white rats of different ages after administration of cyclophosphanum // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, №1. – С. 177-180.

In experiment on 180 white rats of three age-grades investigated strength of a mandible at introduction of cyclophosphanum. Found that intraperitoneal injection of cyclophosphanum at a dose of 1 mg / kg body weight for ten days in animals of all age groups, accompanied by the phenomena of instability of the crystal lattice and reduce the total exchange surface of the biomineral of bone and dentin. In immature rats the deviations are recorded with a 30 day experiment, and in reproductive and senile animals - from 90 days. Changes in the ultrastructure of the bone mineral and biomineral dentin in rats after a period of senile changes in the introduction can also be seen as a manifestation of accelerated aging.

Key words: rats, ontogenesis, mandible, apatites, cyclophosphanum.

Надійшла 17.10.2011 р.

Рецензент: проф. В.Г.Ковешніков