

УДК 616.71-089.844:547.238:549.753.11

© Лузин В.И., Грек О.А., 2010

МИНЕРАЛЬНЫЙ СОСТАВ БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ В НЕЕ БИОГЕННОГО ГИДРОКСИЛАПАТИТА, НАСЫЩЕННОГО ЦИНКОМ В РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Лузин В.И., Грек О.А.

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»

Лузин В.И., Грек О.А. Минеральный состав большеберцовой кости при имплантации в нее биогенного гидроксилапатита, насыщенного цинком в различных концентрациях // Украинский морфологический альманах. – 2010. – Том 8, №4. – С. 131-134.

В эксперименте на белых крыс обоснованы возможности оптимизации состава репаративного регенерата большеберцовой кости, губчатого вещества эпифизов и компактного вещества диафизов путем легирования имплантируемого керамического материала цинком в различной концентрации.

Ключевые слова: белые крысы, костный дефект, минерализация, гидроксилапатит, цинк.

Лузин В.И., Грек О.О. Мінеральний склад великогомілкової кістки при імплантації до неї біогенного гідроксилапатиту, насиченого цинком у різних концентраціях // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №4. – С. 131-134.

В експерименті на білих щурах обґрунтовано можливість оптимізації хімічного складу репаративного регенерату великогомілкової кістки, губчастої речовини епіфізів та компактною речовини діафізів шляхом легування матеріалу, що імплантується, цинком в різних концентраціях.

Ключові слова: білі щури, кістковий дефект, мінералізація, гідроксилапатит, цинк.

Luzin V.I., Grek O.A. Mineral composition of the tibial bone at implantation in it a biogenic hydroxyapatite, alloyed by zinc in different concentrations // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №4. – С. 131-134.

In the experiment, we proved that zinc-enhanced ceramic implants are able to optimize the chemical contents of regenerated bone tissue, cancellous bone of a tibia epiphysis and compact bone of a tibia diaphysis.

Key words: white rats, bone defect, mineralization, hydroxyapatite, zinc.

Введение. В современной костно-пластической хирургии при различных патологических процессах (костные кисты, опухоли, опухолеподобные состояния и др.) требуется своевременное хирургическое вмешательство и замещение костного дефекта пластическим материалом [11]. Процессы перестройки имплантатов изучены достаточно подробно [1, 11, 12], но сведения о преобразовании регенерата при имплантации материалов, содержащих в своем составе ионы различных металлов, в том числе и цинка, практически отсутствуют. Не исследованы и процессы адаптации отделов костного органа, соседствующих с областью имплантации.

Цель данного исследования – изучить в эксперименте на белых крысах изменения химического состава различных отделов большеберцовой кости (ББК) (эпифизов, диафиза, зоны нанесенного дефекта) при имплантации в проксимальный отдел диафиза биогенного материала на основе гидроксилапатита ОК-015, насыщенного цинком в концентрациях 0,20%, 0,50% и 1,00%.

Материал и методы исследования. Эксперимент был проведен на 252 белых крысах-самцах с исходной массой тела 135-145 г, распределенных на 6 групп: 1-ая группа – интактные животные, 2-ая группа – крысы, которым под эфирным наркозом стандартным стоматологическим бором наносили на границе между проксимальным метафизом и диафизом большеберцовых костей сквозной дырчатый дефект диаметром 2,2 мм. Поскольку передне-задний 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 на нижнюю конечность [6]. В 3-ей группе в нанесенный дефект имплантировали блоки биогенного гидроксилапатита диаметром 2,2 мм, содержащего стеклофазу (материал ОК-015). В 4-6-ой группах дефект заполняли блоками ОК-015, насыщенного цинком в концентрациях соответственно 0,20%, 0,50% и 1,00%. Все манипуляции на животных выполняли в соответствии с правилами Европейской конвенции защиты позвоночных животных, использующихся в экспериментальных и других научных целях [13].

По истечении сроков эксперимента (7, 15, 30, 60, 90 и 180 дней) крыс забивали путем декапитации под эфирным наркозом. У животных освобождали от мягких тканей скелета выделяли ББК, разделяли область, соответствующую нанесенному дефекту, диафиз и эпифизы, высушивали их в сухожаровом шкафу при 102°C в течение суток и озоляли в муфельной печи при температуре 450-500°C в течение 12 часов [6].

Все полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием стандартных прикладных программ [5].

Результаты и их обсуждение. Для исследования были избраны эпифизы ББК, представленные преимущественно губчатым костным веществом, наиболее лабильным, и диафизы ББК – представленные преимущественно компактным костным веществом. Отдельно исследовалась область проксимального метадиафиза, соответствующая месту имплантации. Все полученные результаты в обязательном порядке сравнивались с показателями одновозрастных интактных животных.

За период наблюдения (с 7 по 180 день) содержание воды и органических веществ в области проксимального метадиафиза ББК интактных животных уменьшалось с $31,79 \pm 0,69\%$ до $25,98 \pm 0,91\%$ и с $27,06 \pm 0,37\%$ до $24,24 \pm 0,62\%$, а содержание минеральных веществ возрастало с $41,15 \pm 0,84\%$ до $49,77 \pm 0,44\%$ (табл. 1). В эпифизах ББК содержание воды и органических веществ в ходе наблюдения уменьшалось с $38,57 \pm 1,07\%$ до $31,02 \pm 0,92\%$ и с $28,91 \pm 0,57\%$ до $24,77 \pm 1,02\%$, содержание минеральных веществ возрастало с $32,52 \pm 0,72\%$ до $44,21 \pm 0,74\%$ (табл. 2). Соответственно, в диафизах ББК содержание воды и органических веществ в ходе наблюдения уменьшалось с $25,00 \pm 0,47\%$ до $20,95 \pm 1,01\%$ и с $25,22 \pm 0,62\%$ до $23,72 \pm 0,33\%$, содержание минеральных веществ возрастало с $49,78 \pm 1,01\%$ до $55,33 \pm 0,77\%$ (табл. 3).

Полученные данные соответствуют описанной в литературе возрастной динамике состава костей у интактных животных [2].

При нанесении незаполненного костного дефекта (2-я группа) содержание воды в формирующемся регенерате к 7 дню эксперимента превосходило контрольные значения на $30,97\%$, к 15 дню – на $12,67\%$ и к 30 дню – на $9,22\%$. Удельное содержание органического компонента к 7 дню наблюдения было меньше аналогичных показателей контрольной группы на $6,61\%$, после чего начинало возрастать, и к 15 и 30 дням превосходило показатели интактных животных на $6,79\%$ и на $9,80\%$ соответственно. Доля минеральных веществ в регенерате в период с 7 по 30 дни эксперимента была меньше, чем аналогичные показатели у интактных животных соответственно на $19,53\%$, $13,48\%$ и $10,39\%$. В более поздние сроки (после 30 дня) достоверные отклонения содержания воды, органических и минеральных веществ, в сравнении с показателями группы интактных животных не наблюдались. Такие изменения соответствуют описанной в литературе динамике изменений минерального состава костного вещества формирующегося регенерата [4].

В эпифизах ББК 2-й группы содержание воды превосходило показатели интактных животных в период с 7 по 60 день эксперимента соответственно на $9,22\%$, $4,80\%$ ($p > 0,05$), $2,14\%$ ($p > 0,05$) и $4,06\%$. Доля минерального компонента при этом была меньше значений 1-й группы в период с 7 по 30 дни – на $5,46\%$ ($p > 0,05$), $9,21\%$ и $6,14\%$. Наконец, доля органических веществ к 7 дню была меньше контрольных значений на $6,16\%$, а к 15 и 30 дням превосходила их соответственно на $4,55\%$ и $5,94\%$ ($p > 0,05$).

В компактном веществе диафизов ББК содержание воды превосходило контрольные значения во все установленные сроки эксперимента соответственно на $16,99\%$, $11,29\%$, $14,04\%$, $18,60\%$, $6,48\%$ ($p > 0,05$) и $7,92\%$ ($p > 0,05$). Доля минеральных веществ в диафизе ББК была меньше контрольной в период с 7 по 60 дни соответственно на $4,65\%$ ($p > 0,05$), $4,86\%$ ($p > 0,05$), $6,10\%$ и $4,59\%$. Содержание органиче-

ских веществ при этом также было меньше контрольного к 7, 15, 60, 90 и 180 эксперимента соответственно на $7,67\%$ ($p > 0,05$), $3,15\%$ ($p > 0,05$), $6,01\%$, $3,83\%$ ($p > 0,05$) и $5,42\%$.

Таким образом, нанесение сквозного дефекта в проксимальных отделах диафиза ББК сопровождается увеличением содержания воды и уменьшением содержания органических и минеральных веществ, как в эпифизах, так и в диафизе ББК. Амплитуда и продолжительность отклонений в составе компактного вещества диафиза ББК выше, чем в эпифизах. Это объясняется тем, что диафиз и область нанесения дефекта, в отличие от эпифиза имеют общую внутриорганный систему гемодинамики – интрамедуллярную [2, 4]. Поэтому продукты резорбции и биологически активные вещества, формирующиеся при резорбции костных отломков и формировании регенерата, оказывают на компактное вещество диафиза большее влияние, нежели на губчатое вещество эпифизов.

При заполнении дефекта ББК материалом ОК-015 без легирования цинком (3-я группа) содержание воды в регенерате в период с 7 по 60 дни наблюдения было ниже, чем в группе с незаполненным дефектом, на $13,19\%$, $26,39\%$, $9,79\%$ и $3,47\%$ ($p > 0,05$) соответственно, что объясняется заполнением объема дефекта материалом ОК-015. В дальнейшем достоверные отклонения не наблюдались. Содержание органических веществ в регенерате к 15, 30 и 60 дням было больше показателей группы интактных животных соответственно на $10,38\%$, $4,81\%$ ($p > 0,05$) и $7,65\%$. При сравнении с показателями 2-й группы, содержание органических веществ было достоверно больше лишь к 60 дню – на $11,37\%$. Преобладание органического компонента в 3-й группе в сравнении с 1-й и 2-й группами, вероятно, объясняется наличием в имплантате стеклофазы, в результате резорбции которой высвобождаются ионы кремния и бора, позитивно влияющие на процессы костеобразования [10, 12].

Содержание минеральных веществ в регенерате группы ОК-015 было больше показателей группы с незаполненным дефектом в период с 7 по 30 дни соответственно на $17,02\%$, $22,36\%$ и $10,87\%$, то есть постепенно уменьшалось, что объяснимо наличием керамического материала в области имплантации (то есть условиями эксперимента), который подвергся постепенной биорезорбции.

В эпифизах ББК 3-й группы содержание воды по сравнению и с 1-й и со 2-й группами достоверно не изменялось, а содержание минеральных веществ превосходило значения 2-й групп к 15, 30 и 90 дням эксперимента соответственно на $10,09\%$, $7,83\%$ и $4,98\%$. Доля органического компонента к 15 и 30 дням была меньше значений 2-й группы на $3,08\%$ ($p > 0,05$) и $10,32\%$, а к 60 дню превосходила их на $9,85\%$.

В диафизах ББК 3-й группы содержание воды к 15 и 60 дням эксперимента было меньше значений 2-й группы на $18,43\%$ и $12,84\%$; доля органи-

ческих веществ к 7 и 15 дням превосходила значения 2-й группы на 10,21% и 10,52%, а к 30 дню было меньше их на 8,03% ($p > 0,05$). Доля минеральных веществ к 7 дню была меньше контрольной (2-я группа) на 4,18% ($p > 0,05$), а к 15 и 60 дням превосходила ее на 5,07% и 6,19%.

Таким образом, имплантация материала ОК-015 в дефект ББК сопровождается сглаживанием негативного влияния условий эксперимента на состав ББК. Это проявляется в преобладании содержания органических и минеральных веществ над показателями 2-й группы, а также уменьшением содержания воды как в эпифизах, так и в диафизе ББК.

Динамика состава различных отделов ББК при имплантации в нее ОК-015, легированного цинком, практически не отличалась от таковой в 3-ей группе, но имели место некоторые количественные отклонения.

Сравнение содержания минеральных веществ в регенерате ББК в 4-6-й группах с аналогичными показателями 3-й группы (имплантация ОК-015 без насыщения цинком) не выявило достоверных отличий.

При этом содержание воды в костно-керамическом регенерате 4-6-й групп превосходило показатели 3-й группы к 15 дню на 3,78% ($p > 0,05$), 14,62% и 13,56% соответственно. С 30 по 90 дни доля воды в составе вещества регенерата ББК 4-6-й групп от контрольной достоверно не отличалась, а к 180 дню было меньше показателей 3-й группы на 9,45% ($p > 0,05$), 5,65% ($p > 0,05$) и 7,43% соответственно.

Увеличение процентного содержания воды в регенерате подопытных групп в сравнении с показателями 3-й группы к 15 дню эксперимента предположительно можно расценивать как ускорение процессов резорбции имплантированного материала в присутствии ионов цинка. В поздние сроки уменьшение этого показателя свидетельствует о завершении резорбтивных процессов.

Доля органических веществ в регенерате ББК 5-6-й групп была меньше показателей 3-й группы соответственно на 8,11% и 6,08%. К поздним срокам (90 и 180 дней с момента имплантации) доля органического компонента уже превосходила показатели 3-й группы, что составило для 4-й группы 6,89% и 9,79%, для 5-й - 3,07% ($p > 0,05$) и 6,46% ($p > 0,05$) и для 6-й - 7,79% ($p > 0,05$) и 8,03% ($p < 0,05$).

Снижение содержания органических веществ в сравнении с показателями 3-й группы к 15 дню наблюдения может свидетельствовать о ускорении процессов их минерализации в присутствии ионов цинка. При этом, отсутствие изменений со стороны количества минерального компонента в регенерате подопытных групп в сравнении с 3-й группой, наряду с изменениями содержания воды и органических веществ может свидетельствовать о том, что в присутствии ионов цинка в регенерате, наряду с ускорением биологической деградации имплантированного гидроксилалюмината, ин-

тенсивно протекают процессы формирования новообразованного костного минерала.

В эпифизах ББК 4-й группы содержание воды было меньше значений 3-й группы к 15 и 30 дням соответственно на 6,47% и 7,84%, а доля органического компонента больше в период с 30 по 90 дни на 15,92%, 2,87% ($p > 0,05$) и 6,80%. Доля минеральных веществ к 15 дню превосходила контрольную (3-я группа) на 8,48%, а к 60 и 90 дням была меньше – на 4,23% ($p > 0,05$) и 4,91% соответственно.

В компактном веществе диафизов ББК 4-й группы содержание воды преобладало над контрольными показателями к 15 дню на 18,31%, а к 30 и 90 дням меньше их – на 14,81% и 10,21% ($p > 0,05$) соответственно. Доля органического компонента была меньше значений 3-й группы к 7 и 15 дням на 8,21% и 6,94%, а в период с 30 по 90 дни преобладала над ними – на 12,32%, 4,44% ($p > 0,05$) и 9,88% ($p > 0,05$). Содержание минеральных веществ при этом достоверно не изменялось.

При имплантации ОК-015, насыщенного 0,50% цинка (5-я группа), содержание воды в эпифизах ББК преобладало над показателями 3-й группы к 15 дню на 9,50%, а доля органических веществ была меньше – на 9,24%. В дальнейшем, к 30 и 90 дням доля органических веществ превосходила контрольные значения соответственно на 9,01% и 9,54% ($p > 0,05$), а доля минерального компонента к 90 дню была меньше контрольной на 4,88%.

В этом случае в диафизах ББК содержание воды к 7 дню было меньше контрольного (3-я группа) на 14,74%, к 15 дню было больше его на 12,89%, а в период с 30 по 90 дни вновь уменьшалось соответственно на 14,38%, 6,39% ($p > 0,05$) и 7,33% ($p > 0,05$). Доля органического компонента преобладала над значениями 3-й группы в период с 30 по 90 дни соответственно на 9,31%, 5,97% ($p > 0,05$) и 6,76% ($p > 0,05$), количество минеральных веществ к 7 дню было больше контрольного на 9,74%, а к 15 дню меньше на 5,25%, после чего достоверно не изменялось.

Имплантация ОК-015, насыщенного цинком в концентрации 1,00% (6-я группа), сопровождалась изменениями состава ББК в целом сходными с 5-й группой: содержание воды в эпифизах было больше контрольного (ОК-015 без примесей) к 7 и 15 дням эксперимента на 5,79% и 5,75%, а содержание органических веществ преобладало над контрольным к 30 и 90 дням соответственно на 8,68% и 12,42%. В результате доля минерального компонента была меньше значений 3-й группы к 7 и 15 дням на 6,06% и 5,67%.

Состав компактного вещества диафизов изменялся следующим образом: содержание воды было меньше контрольного (3-я группа) к 7 дню на 11,45% ($p > 0,05$), а к 15 и 90 дням превосходило его соответственно на 8,94% и 14,28%. Содержание органических веществ превосходило при этом контрольное с 30 по 90 дни соответственно на 13,02%, 12,51% и 6,58% ($p > 0,05$), а доля минерального компонента к 7 дню была

больше контрольной на 8,12%, а к 90 дню - меньше на 8,75%.

Выявленные в условиях эксперимента изменения химического состава различных отделов ББК можно объяснить следующим образом: в результате биологической резорбции имплантата высвобождаются ионы цинка, которые поступают в кровь. Установлено, что при повышенном уровне цинка повышает активность щелочной фосфатазы [10], которая разрушает ингибиторы кальцификации в участках, окруженных остеобластами. В результате щелочную фосфатазу считают местным фактором минерализации костной ткани [8]. Однако, имеются данные и о том, что значительный уровень цинка наоборот, ингибирует щелочную фосфатазу [9]. Помимо этого щелочная фосфатаза, в состав которой входят четыре атома цинка, катализирует гидролиз моноэфиров фосфорной кислоты (183). В результате высвободившиеся фосфат-ионы связываются с ионами кальция либо с NH_2 -группами оксализина, входящего в состав коллагена [7]. В результате создаются благоприятные условия для оптимизации как синтеза органического матрикса, так и его обызвествления.

Следует учитывать также, что, с одной стороны, ионы цинка повышают активность остеобластов *in vitro* [14] в результате чего создаются оптимальные условия для течения процессов репаративной регенерации. С другой стороны, по данным тех же авторов [14], ионы цинка *in vivo* ингибируют резорбцию кости. Вероятно этим, а также ингибированием щелочной фосфатазы, объясняется увеличение содержания воды и снижение содержания минеральных веществ в эпифизах и диафизах ББК в 6-й группе, где содержание цинка в имплантате было наибольшим (1,00%).

Заключение. Применение материала ОК-015, легированного цинком в различной концентрации, для пластики костных дефектов оказывает оптимизирующее воздействие на химический состав формирующегося регенерата. С учетом изменений химического состава губчатого вещества эпифизов и компактного вещества диафизов большеберцовой кости, более предпочтительной является концентрация цинка в имплантате 4-й группы - 0,25%.

Перспективы дальнейших исследований.

С целью подтверждения выявленных закономерностей будет проведено гистологическое исследование формирующегося регенерата, проксимального эпифизарного хряща и середины диафиза большеберцовых костей в условиях нашего эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ивченко В.К. Особенности химического состава регенерата, формирующегося при пластике костных дефектов материалами на основе гидроксипатита с различным содержанием марганца / В.К. Ивченко, В.И. Лузин, Д.В. Ивченко, [и др.] // «Новое в травматологии и ортопедии». Материалы Всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых, посвящен-

ной 50-летию НИИ травматологии и ортопедии Донецкого государственного медицинского университета им. М. Горького. - Донецк, 2006. - С. 25-26.

2. Ковешников В.Г. Скелетные ткани: хрящевая ткань, костная ткань. Под ред. В.Г. Ковешникова. / В.Г. Ковешников, М.Х. Абакаров, В.И. Лузин. - Луганск: Изд-во Луганского госмедуниверситета, 2000. - 154с.: ил.

3. Колб В.Г. Клиническая биохимия / В.Г. Колб, В.С. Камышников - Минск: Беларусь, - 1976. - С.209 - 211.

4. Корж А.А. Репаративная регенерация кости / А.А. Корж, А.М. Белоус, Е.Я. Панков. - Москва: Медицина, 1972. - 232 с.

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

6. Лузин В.И. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В.И. Лузин, Д.В. Ивченко, А.А. Панкратьев, и др. // Украинский медицинский альманах. - 2005. - Том 8, №2 (додаток). - С. 162.

7. Морфофункциональная организация, реактивность и регенерация костной ткани / [В.Г. Гололобов, А.К. Дулаев, Р.В. Деев, Е.Н. Цыган]. - СПб.: Военно-медицинская академия, 2006. - 47 с.

8. Музафаров А.И. Данные клинко-рентгенологического исследования легких у рабочих цинкового производства / А.И. Музафаров // Гигиена труда и профессиональные заболевания. - Алма-Ата. - 2002. - Том XXIX. - Ч. 2. - С. 62-65.

9. Сидоркина А.Н. Биохимические аспекты травматической болезни и ее осложнений. Издание второе, переработанное и дополненное / А.Н. Сидоркина, В.Г. Сидоркин. - Н. Новгород: ННИИТО, 2009. - 120 с

10. Скоблин А.П. Микроэлементы в костной ткани / А.П. Скоблин, А.М. Белоус. - М.: Медицина, 1968.- 232 с.

11. Bone formation within alumina tubes: effect of calcium, manganese, and chromium dopants / Pabbruwe M.B., Standard O.C., Sorrell C.C., [et al.] // Biomaterials. - 2004. - Vol.25. - P.4901.

12. Carlisle E.M. Silicon: A Possible Factor in Bone Calcification / E.M. Carlisle // Science. - 1970. - Vol. 167. №. 3916. - P. 279 - 280.

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.

Надійшла 18.09.2010 р.
Рецензент: доц. В.М.Волошин