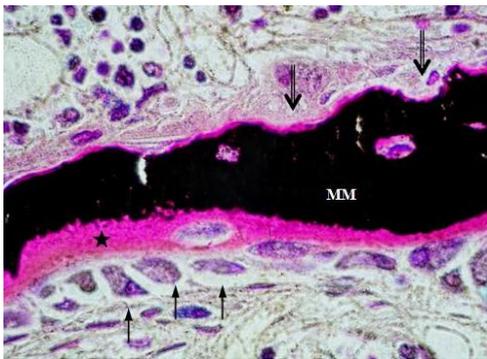


**Рис. 2.** Трабекулы тела позвонка крысы линии Вистар. Окраска по предлагаемой методике. Ув. 1000. Стрелками обозначены остеокласты, звездочкой (здесь и далее) – остеоид.



**Рис. 3.** Трабекулы тела позвонка крысы линии Вистар. Окраска по предлагаемой методике. Ув. 1000. Стрелками в верхней части рисунка обозначены резорбционные лакуны, а в нижней – активные остеобласты.

Срезы толщиной 1-2 мкм изготавливаются на ультрамикротоме «ULTRACUT» с использованием как алмазного, так и стеклянных ножей. Необходимо отметить, что качество срезов, получаемых при помощи стеклянных ножей, хуже, но, вполне достаточное для последующей морфометрии.

Полученные полутонкие срезы окрашиваются по методу Косса, являющимся классическим референтным методом выявления кальция в тканях. При этом костный минерал окрашивается в черный цвет вследствие отложения серебра, а остеоид остается восприимчивым к контрастному окрашиванию.

Процедура окраски следующая [2]:

1. Поместить срезы в 1% водный раствор нитрата серебра и освещают с помощью сильного источника света (лучше всего использовать солнечный

свет) в течение 2 – 15 минут (длительность может колебаться в зависимости от интенсивности освещения и свежести раствора).

2. Промыть в трех сменах дистиллированной воды.

3. Обработать 2,5% тиосульфата натрия 2 – 3 минуты.

4. Хорошо промыть в дистиллированной воде.

На последующих этапах производили окрашивание клеток и остеоида.

5. Окрасить 1% раствором метиленового синего 30 – 60 секунд. Методика приготовления 1% раствора метиленового синего: вначале готовится насыщенный водный раствор (на дистиллированной воде), который смешивается через 2 дня с 90% этанолом в соотношении 1:1. Затем из этого маточного раствора готовится 1% водный (на проточной воде) раствор метиленового синего [1].

6. Промыть в проточной воде.

7. Окрасить 0,05% раствором основного фуксина на 2,5% этаноле 30 секунд.

8. Промыть в проточной воде.

Длительность экспозиции указана приблизительно, поэтому ход окрашивания необходимо контролировать при помощи микроскопа.

Результат: минерализованная ткань – коричнево-черная в виде грубых гранул, остеоид – розово-красный, ядра клеток – фиолетово-синие.

На рисунках 1-3 представлены микрофотографии препаратов, полученных и окрашенных по этой методике.

Предлагаемая методика может быть полезна в морфологических исследованиях как для оценки гистологической структуры костной ткани, так и для постановки гистохимических реакций, включая лектино- и иммуногистохимию.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Микроскопическая техника / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.А. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
2. Ромейс Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. – М.: Издательство иностранной литературы, 1953. – 718 с.
3. Уикли Б.С. Электронная микроскопия для начинающих / Б.С. Уикли. – М.: Мир, – 1975. – 324 с.
4. Франке Ю. Остеопороз / Ю. Франке, Г. Рунге ; пер. с нем. А.Ю. Болотина и Н.М. Мылов. – М.: Медицина, 1995. – 304 с.
5. An Y.H. Handbook of histology methods for bone and cartilage / Y.H. An, K.L. Martin. – NJ: Humana Press, 2003. – 587 p.

Надійшла 07.09.2011 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін

УДК 546.815/.819: 616. 94+034.4: 615.015.25

© Пикалюк В.С., Мостовой С.О., Плеханова К.А., Верченко И.А., 2011

## БАЛАНС МИКРОЭЛЕМЕНТОВ РЕГЕНЕРАТА НИЖНЕЧЕЛЮСТНОЙ КОСТИ НА ФОНЕ СВИНЦОВОГО ОТРАВЛЕНИЯ И АНТИТОКСИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

Пикалюк В.С., Мостовой С.О., Плеханова К.А., Верченко И.А.

ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.П. Георгиевского»

Пикалюк В.С., Мостовой С.О., Плеханова К.А., Верченко И.А. Баланс микроэлементов регенерата нижнечелюстной кости на фоне свинцового отравления и антитоксической коррекции // Украинський морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 207-210.

В статье представлены результаты исследования химического состава регенерата нижней челюсти на фоне свинцовой интоксикации и проведенной антитоксической коррекции. С помощью методов вариационной статистики определены показатели, которые наиболее полно характеризуют процессы оссификации, протекающие в регенерате в разные сроки исследования.

**Ключевые слова:** регенерат, Pb, "МагнеВ6", "Гетацин-кальций", рентгено-флюорисцентный анализ.

**Пикалюк В.С., Мостовой С.О., Плеханова К.А., Верченко І.А.** Баланс мікроелементів в регенерації нижньощелепної кістки на тлі свинцевого отруєння та антитоксичній корекції // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 207-210.

У статті представлені результати дослідження хімічного складу регенерату нижньої щелепи на тлі свинцевого отруєння й проведеної антитоксичної корекції. За допомогою методів варіаційної статистики визначені показники, що найбільш повно характеризують процеси осифікації, які протікають в регенерації в різні терміни дослідження.

**Ключові слова:** регенерат, Pb, «МагнеВ6», «Тетацин-кальцій», рентгено-флюорисцентний аналіз.

**Pikaluk V.S., Mostovoy S.O., Plekhanova K.A., Verchenko I.A.** Microelementary balances in the mandible regenerate on a background the lead poisoning and conducted antitoxic correction were determined // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С.207-210.

Results of the research of chemical structure of mandible regenerate on a background the lead poisoning and conducted antitoxic correction are presented in the article. Figures that most full characterize the processes of ossification that take place in regenerate on different stages were determined by the methods of variation statistics.

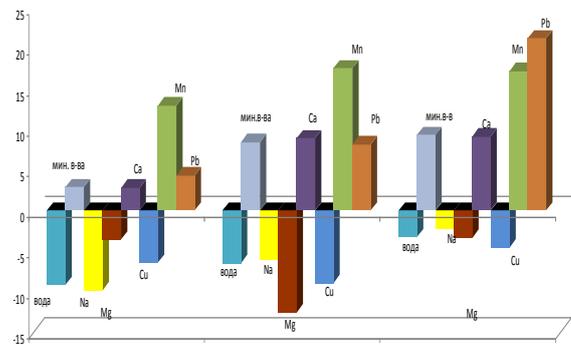
**Key words:** Pb, "MagnesiumB6", "Tetacium-calcium", X-ray fluorescence analysis.

Известно, что многие тяжелые металлы занимают исключительно важное место среди потенциально токсичных химических загрязнителей антропогенного происхождения. Приоритетным загрязнителем является свинец и его соединения, так как их техногенное накопление в окружающей среде идет быстрыми темпами [1]. Основной мобильный источник свинцевого загрязнения окружающей среды – автомобильный транспорт, использующий этилированный бензин. Значительную роль во влиянии свинцовых соединений на организм человека играет качество топлива [2]. Известно, что на влияние разнообразных факторов организм отвечает естественной реакцией – общим механизмом адаптации. Важная роль в адаптационных реакциях организма принадлежит костям скелета [3,4]. Изучение стадий посттравматической репаративной регенерации костной ткани в условиях неблагоприятных экологических факторов формирует представление о функциональной лабильности скелета, особенностях его функционирования и экологически обусловленных процессов превращения, которые приводят к нарушениям в опорно-двигательном аппарате [5].

**Матеріал і методи дослідження.** Исследование проведено на 144 белых беспородных крысах самцах с массой тела 150-200г. Животные были разделены на 2 группы. 1 группа (72 крысы) – животные, не подверженные затравке ацетатом свинца. Животным 2 группы (72 крысы) – создавалась модель свинцового отравления. Травму нижней челюсти наносили под эфирным наркозом твёрдосплавным шаровидным бором №-1. Производили остеоперфорацию крыловидного отростка нижней челюсти. Каждая группа была разделена на 4 серии по 24 животных. Первую серию составили животные с моделью перелома нижней челюсти, которым в послеоперационном периоде производили внутривенные инъекции 1мл физиологического раствора. Животные второй серии получали препарат «МагнеВ6» в дозе 0,3 мл/кг 3 раза в сутки и внутривенно 1мл физиологического раствора. Животным третьей серии производили внутривенные инъекции «Тетацин-кальций», в дозе 20 мл/кг 2 раза в сутки по схеме; (инъекции производились в течение 4 суток с последующим перерывом также 4 суток на протяжении всего эксперимента). Четвёртую серию составили животные, получавшие «МагнеВ6» и «Тетацин-кальций» одновременно в дозах, приведенных выше. Вторую группу (72 крысы) представляли животные, которым в течение 2,5 месяцев внутривенно производилось введение ацетата свинца в дозе 100 мг/кг, после чего моделировали перелом. Животные были разделены на аналогичные 4 серии. Забор материала осуществляли в соответствии с правилами проведения работ с экспериментальными животными [6]. Проводили скелетирование нижнечелюстных костей. Они подвергались исследованию с помощью рентгенофлюорис-

центного метода с помощью спектрометра энергии рентгеновского излучения тип СЕР-01 фирмы «Elva». Исследовалась поверхность регенерата нижней челюсти, определялись: Na, Mg, K, Ca, P, Cu, Zn, Sr, Mn, Pb. После этого из челюсти выделяли крыловидный отросток с перфорационным отверстием. Фрагменты взвешивались, высушивались до температуры постоянного веса при температуре 105°C в сушильном шкафу и определялось содержание воды органических и неорганических веществ процентно-весовым методом. Полученный цифровой материал обработан методом вариационной статистики с использованием прикладного пакета STATISTICA 6,0 for Windows. Определяли среднюю арифметическую (M), ее ошибку (m), критерий Стьюдента (t). Уровень достоверности принят равным 95%. Цифровые данные положены в основу таблиц и графиков.

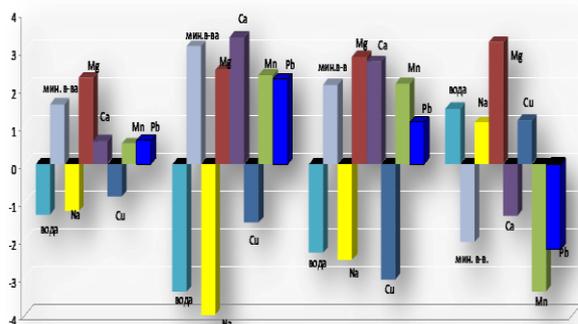
**Результаты и их обсуждение.** Показатели химического состава регенерата контрольной группы животных в первые две недели опыта характеризуются интенсивными процессами дегидратации и снижения содержания гидрофильных макроэлементов. Так, на 14 сутки исследования содержание воды снижается на 1,4% ( $p < 0,05$ ) Na-на 9,8% ( $p < 0,05$ ), K-на 4% ( $p < 0,05$ ), Mg-на 5% ( $p < 0,05$ ), Cu-на 6% ( $p < 0,05$ ), Zn-на 1,4% ( $p < 0,05$ ). В последующие сроки описанная динамика сохраняется, но теряет прежнюю интенсивность. Совершенно противоположными особенностями представлен макроэлементарный состав, характеризующий степень кальцификации костного матрикса. Наибольшие изменения отмечаются на 21 и 30 сутки опыта: так, содержание Ca и P увеличивается на 9% и 5% ( $p < 0,05$ ) на 21 сутки и 8% и 5% ( $p < 0,05$ ) на 30. Отмечается также увеличение содержания Mn (активатора осификации) на протяжении всего опыта на 12%, 17%, 17,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Таким образом, острые воспалительные явления в регенерате нижнечелюстной кости стихают к 21 суткам исследования и начинаются процессы интенсивной минерализации регенерата.



**Рис.1.** Динамические изменения процентно-весового соотношения и микроэлементарного состава в области регенерата нижнечелюстной кости контрольной группы животных между различными сроками опыта.

Химический состав регенерата нижнечелюстной кости характеризуется более высокой степенью минерализации кости в первую половину опыта, наиболее выраженной на 14 сутки опыта. В позднем послеоперационном периоде отмечается тенденция к снижению интенсивности процессов оссификации, приобретающая к 30 суткам отрицательные показатели. Уровень Mg на протяжении всего опыта имеет высокие показатели в соотношении с контролем: от 2%( $p>0,05$ ) на 7 сутки до 3,2%( $p>0,05$ ) к 30 суткам. Полученные результаты согласуются с исследованиями, подтверждающими торможение процессов минерализации в поздние сроки репарации [7].

Содержание Ca и P увеличилось - на 4,1%( $p>0,05$ ), Mn-на 4,3%( $p>0,05$ ). Содержание гидрофильных макроэлементов Na, K, соответственно воды и Mg снижено. Отличительная характеристика макроэлементарного состава регенерата исследуемой серии животных - достаточно низкое содержание свинца на 39,3%( $p>0,05$ ) и 39,5%( $p>0,05$ ) на 7 и 14 сутки и 40 и 41%( $p>0,05$ ) на 21 и 30 сутки соответственно. Учитывая некоторые морфоструктурные особенности, возникающие в регенерате при применении исследуемого препарата [8], увеличение содержания Ca в данной серии животных мы связываем не столько с количеством его накопления в единице объема новообразованной кости, сколько в степени его накопления в регенерате нижнечелюстной кости в целом.



**Рис.2.** Динамические изменения процентно-весового соотношения и макро-микроэлементарного состава регенерата нижнечелюстной кости группы животных получавших в послеоперационном периоде препарат «MgB6» (в соотношении с контролем).

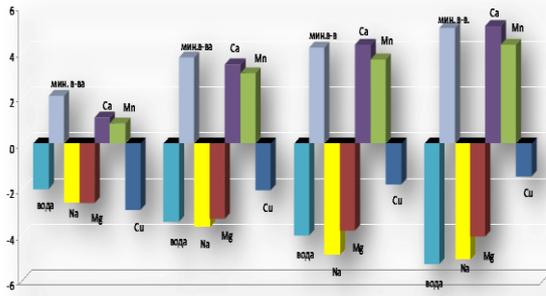
Химический состав регенерата животных, получавших в послеоперационном периоде комбинацию препаратов «Тетрацин-кальций» и «МагнеВ6», характеризуется активными процессами минерализации костной ткани, на что указывает рост минерального компонента, содержание которого превышает показатели контроля от 2,18%( $p>0,05$ ) на 7сутки до 4,23%( $p>0,05$ ) на 30 сутки. Несмотря на активные процессы оссификации и дегидратации, протекающие в регенерате, уровень содержания Mg остаётся на достаточно высоком уровне. Его количество превышает показатели контрольной группы с 1%( $p>0,05$ ) на 7сутки до 3%( $p>0,05$ ), на 30 сутки. Однако, при этом явлений замедления кальцификации регенерата в поздние сроки опыта, возникающей в серии животных получавших препарат «МагнеВ6», в чистом виде не отмечается. Полученный эффект мы связываем с действием препарата «Тетрацин-кальций», который снижает остеокластическую активность, вызываемую магнием [9]. Существенно снижено накопление свинца в костном регенерате. Его количество на 7 сутки снижено на 41%( $p>0,05$ ) и

достигает 43%( $p>0,05$ ), к 30 суткам исследования. Таким образом, полученные результаты ещё раз подтверждают синергизм действия препаратов [9].

Химический состав регенерата животных, подверженных заправке ацетатом свинца, характеризуется выраженными явлениями гипергидратации в сравнении с животными контрольной группы, что сказывается на содержании минеральной составляющей регенерата. Содержание макроэлементов, принимающих участие в минерализации коллагенового матрикса костной ткани, резко снижено, что наиболее выражено на 30 сутки: Ca-на 30,4%( $p>0,05$ ), P-на 23,02%( $p>0,05$ ), Mn-на 26,3%( $p>0,05$ ). Содержание Pb и Cu в данной серии животных также имеет свои отличительные черты. Накопление первого протекает быстрыми темпами и превышает показатели контроля на 586%( $p>0,05$ ) к концу исследования, что согласуется с литературными данными и нашими исследованиями о накоплении этого элемента в местах активного остеогенеза [1]. Количество меди отстает от показателей контроля от 24,4%( $p>0,05$ ) на 7-е сутки достигая 27,3%( $p>0,05$ ) к 30 суткам исследования, частично объясняя низкую интенсивность процессов репарации, отмеченную ранее нами [1].

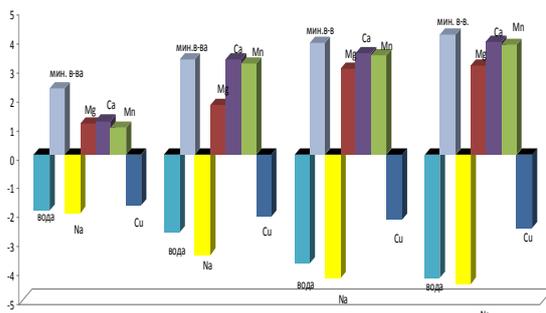
Содержание минерального компонента имеет динамичный прирост и превышает показатели опытной группы в серии животных, не получавшей в послеоперационном периоде корригирующей терапии, от 4,37%( $p>0,05$ ) на 7 сутки до 5,22%( $p>0,05$ ) на 30 сутки исследования, что естественно вызывает повышение содержания макроэлементов, участвующих в оссификации. На фоне активно протекающих оссификационных процессов отмечаются активные процессы дегидратации и снижения содержания гидрофильных макроэлементов. На протяжении всего эксперимента определяется тенденция в повышении уровня Mg от 3% до 3,3%( $p>0,05$ ). Отмечаем частичную нормализацию содержания уровня Cu, превышающее показатели опытной группы 5 серии на 5,4%( $p>0,05$ ) на 7 сутки опыта до 6,8%( $p>0,05$ ) на 30 сутки, что говорит о стимуляции магнием части ферментных систем. Существенным отличием этой серии животных является предельно низкое содержание свинца, по цифровым показателям не имеющее статистически достоверных отличий с животными контрольной группы 1 серии, подтверждая тем самым конкурентно-антidotные свойства препарата [10].

Непосредственный анализ данных макроэлементарного состава регенерата животных, заправленных ацетатом свинца и получавших в послеоперационном периоде терапии препаратом «Тетрацин-кальций», повторяет динамику контрольной группы третьей серии животных. Основные элементы оссификации обладают противоположной направленностью. Следует отметить особенности, характеризующие данную серию. Содержание Pb имеет предельно низкие значения и во все сроки опыта и в 2 раза ниже показателей контрольной группы 1 серии животных. Уровень меди, сохраняя динамику предшествующих серий опытной группы животных, имеет более низкие цифровые показатели, отставая от показателей животных, заправленных свинцом и не получавших в послеоперационном периоде корригирующую терапию, что связано с механизмом действия препарата и частично объясняет нарушение формирования трабекулярных комплексов в регенерате [8].



**Рис.3.** Динамічні зміни процентно-взового співвідношення і макро-мікроелементарного складу регенерата нижньочелюстної кістки групи тваринних, отриманих в післяопераційний період препарат «Тетацин-кальцій» (в співвідношенні з контролем).

Хімічний склад регенерата нижньочелюстної кістки тваринних, отриманих ацетатом свинцю і отриманих в післяопераційний період терапію препаратами «Тетацин-кальцій» і «МагнеВ6» в загальних рисах повторює динамічну картину, присущу 6-7 серіям тваринних і характеризується збільшенням мінерального компонента від 2,29% на 7 днів, до 5,25% на 30 днів. Зростання мінеральної складової регенерата непрямо пов'язане з природним осифікуючим макроелементами. Процес інтенсивного формування первинної кісткової мозолі супроводжується процесом дегідратації - від 3,13% ( $p > 0,05$ ) в першу тиждень досвідки, до 4,37% ( $p > 0,05$ ) через місяць дослідження, що свідчить про зниження Na - від 6,4% до 7,0% ( $p > 0,05$ ), K - від 6,8% до 7,9% ( $p > 0,05$ ). Вміст Mg при збереженій динаміці поступово зменшується на протязі всього досвідки залишається високим, що пов'язано з штучним екзогенним введенням його в організм. Показники вмісту рівня Cu, являючись кофактором цитохромоксидаз, мають більш високі значення і перевищують показники серії тваринних, отриманих свинцем без провідної коррируючої терапії на 4,5%, 5,9%, 6,6% і 7,4% ( $p > 0,05$ ) Таким чином, комбінація досліджуваних препаратів практично повністю усуває побічні ефекти, виникаючі при їх роздільному використанні.



**Рис.4.** Динамічні зміни процентно-взового співвідношення і макро-мікроелементарного складу регенерата нижньочелюстної кістки групи тваринних, отриманих в післяопераційний період препарати «Тетацин-кальцій» і «МагнеВ6».

**Висновки:** 1. Острії запальні явища в регенераті нижньочелюстної кістки стихають к 21 тижню дослідження і характеризуються процесами інтенсивної мінералізації регенерата. Репаративна регенерація нижньої щелепи на фоні свинцевого отруєння протікає повільними темпами, супроводжується низькою мінералізацією кістки, низьким

содержанием мікроелементів - активаторів остеогенезу, і інтенсивним накопленням свинцю в зоні відновлення дефекта.

2. Використовуваний препарат «МагнеВ6» оптимізує дію на процеси мінералізації кісткової тканини в ранні терміни репарації, в формі часткової нормалізації процесів кальцифікації кісткової тканини, перешкоджаючи накопленню свинцю в зоні регенерації.

3. Використання препарату «Тетацин-кальцій» надає при цьому оптимізує дію на процеси кальцифікації в місці протікаючої репарації, зменшуючи при цьому концентрації свинцю до мінімальних значень. Процеси репарації на фоні використання препарату «Тетацин-кальцій» протікають на фоні помірного дегідратації кісткової тканини при передельно низькому вмісті свинцю в зоні регенерації.

4. Спільне використання коррируючих препаратів практично повністю усуває побічні ефекти, виникаючі при їх роздільному використанні.

**Перспективи дослідження.** Для глибшого аналізу отриманих даних плануємо провести факторний і кореляційний аналіз цифрових величин.

**ЛІТЕРАТУРА:**

1. Мостовой С.О., Пикалюк В.С. Хилько В.В. Репаративний остеогенез нижньої щелепи на фоні інтоксикації ацетатом свинцю / Український медичний альманах. - 2007. - Т.5, №1 - С. 73 - 81. // С.О. Мостовой, В.С. Пикалюк, В.В. Хилько.
2. Громов С.А. Виброси свинцю від автотранспорту / ЕТС. Обз., інф. пробл. оточуючої середовища і природ. ресурсів ВІНТИ.1-993, - № 5 - С 77-82. // С.А. Громов.
3. Мостовой С.О., Пикалюк В.С., Белоцерковский В.П. Остеометрические особенности роста и формообразования нижней челюсти при воздействии пороговых доз ацетата свинца и антиоксидантной коррекции свинцовой интоксикации препаратом «Магне-В6» / Таврический медико-биологический вестник. - 2003 - №4 - С.119 - 122. // С.О. Мостовой, В.С. Пикалюк, В.П. Белоцерковский.
4. Дедух Н.В., Никольченко О.А., Побел А.М. Регенерація кісткової тканини при остеопорозі (експериментальні дослідження) / Український медичний альманах.- 2003. - Т.6, №2 - С66 - 69. // Н.В. Дедух, О.А. Никольченко, А.М. Побел.
5. Побел А.Н. Діяння хімічних токсигенів на кісткову і хрящову тканину / Ортопедія, травматологія і протезування. - 1998, - №2. - С.143 - 147. // А.Н. Побел.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. - Strasbourg, 1986. - P. 52.
7. Мостовой С.О. Пикалюк В.С. Формування регенерата нижньочелюстної кістки на фоні прийому препарату «МагнеВ6» / Інститут травматології та ортопедії АМН України Матеріали ІІ всеукраїнської школи з міжнародною участю «Фізіологія та морфологія тканин опорно-рухової системи в нормі і при шкідливих впливах» // - Київ - 2007 - С. 48-56. // С.О. Мостовой, В.С. Пикалюк.
8. Мостовой С.О. Хилько В.В. Репаративний остеогенез нижньої щелепи на фоні інтоксикації ацетатом свинцю і антиоксидантної корекції препаратом «Тетацин-кальцій» / Вісник морфології - Вінниця - 2007 - Т.13, №2 - С. 300 - 307. // С.О. Мостовой, В.В. Хилько.
9. Мостовой С.О. Пикалюк В.С. Вплив препаратів «МагнеВ6» і «Тетацин-кальцій» на перебіг репаративного остеогенезу нижньої щелепи в експерименті / Проблемы достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. - Симферополь - 2007 - Т. 143 - ч. 4 - С.56 - 67. // С.О. Мостовой, В.С. Пикалюк.
10. S.O. Mostovoy, V.S. Picaluk, K. A. Plehanova Reparative osteogenesis of the mandible on a background of a chronic intoxication by acetate of lead and antitoxic correction of a lead intoxication by a preparation "MgB6" during two weeks of post operation term / Tavrichesky medico-biologicheskyy vestnik - Simferopol - Vol 10 - P.178 - 183. // Mostovoy S.O., Picaluk V.S., Plehanova K. A.

Надійшла 07.09.2011 р.  
Рецензент: доц. В.М. Волошин