

В.С.Пикалюк¹
С.О.Мостовой¹
Е.М.Максимова²
И.А.Наухацкий²
К.А.Плеханова²

¹ Крымский государственный университет им. С.И.Георгиевского

² Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского

Ключевые слова: регенераты нижней челюсти, Pb-интоксикация, гидроксиапатит, поколения животных.

Надійшла: 12.10.2011

Прийнята: 14.11.2011

УДК616.716.4+616.94 – 034.4: 615.015.25

ОСОБЕННОСТИ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РЕГЕНЕРАТА НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ ПЕРВОГО И ЧЕТВЕРТОГО ПОКОЛЕНИЙ БЕЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРЖЕННЫХ СВИНЦОВОМУ ОТРАВЛЕНИЮ

Резюме. В статье приведены результаты рентгеноструктурных исследований репаративного остеогенеза при переломах нижней челюсти на фоне хронической свинцовой интоксикации 1-4 поколений, проведенные на 72 лабораторных белых крысах самцах с массой тела 110-150 г. Целью настоящего исследования явилось изучение состояния кристаллических параметров гидроксиапатита костного регенерата и неповрежденного участка нижней челюсти при интоксикации свинцом у животных первого и четвертого поколения. Объектами исследования степени кристаллизованности гидроксиапатита служили регенераты нижних челюстей экспериментальных животных и участки нижнечелюстной кости, максимально приближенные к зоне репарации, высушенные и измельченные в агатовой ступке. Данные по минеральному составу рассматриваемых костных апатитов получены с помощью рентгеноструктурного анализа, проводимого на рентгеновском аппарате ДРОН-3. Установлено, что у животных 1 поколения свинец активно накапливается в костной ткани, внедряясь в кристаллическую решетку гидроксиапатита (с замещением ионов кальция), нарушая тем самым процессы минерализации. Выявлены нарушения течения процессов кристаллизации у животных 4 поколения, проявляющиеся в нарушении упорядоченности положения образованных кристаллитов, протекающих на фоне возможных закреплённых генетических нарушений, вызванных постоянным воздействием токсического агента (свинца).

Морфологія. – 2011. – Т. V, № 4. – С. 45-49.

© В.С.Пикалюк, С.О.Мостовой, Е.М.Максимова, И.А.Наухацкий, К.А.Плеханова, 2011

Picaluk V.S., Mostovoy S.O., Maksimova E.M., Nauhacky I.A., Plehanova K.A. Features of the lower jaw regenerate's crystal structure in several generations of white rats which were experienced a lead poisoning.

Summary. The article presents the results of x-ray diffraction studies of repairing osteogenesis in fractures of the lower jaw on the background of chronic lead intoxication 1-4 generations performed by 72 white rat males with body weight 110-150 g. The purpose of the present research was to study the state of crystalline parameters hydroxyapatite bone regenerate and intact area of the lower jaw during intoxication lead in animals of the first and fourth generation. The objects of the research degree hydroxyapatite crystallized were some regenerate of experimental animals' lower jaws and areas of bone situated closely to the area of reparation. The objects were dried and crushed in an agate mortar. Data on mineral composition obtained with the help of x-ray analysis, conducted by the x-ray machine DRON-3. It was founded for the 1 generation that lead actively accumulates in bone tissue with substituting for calcium. This way it broke the mineralization processes. The changes of crystallized processes for animals in 4 generation were shown. It' possible that genetics disorders are caused by lead's constant influence.

Key words: regenerate of the lower jaw, Pb-intoxication, hydroxyapatite, white rats generations.

Введение

Видовое приспособление животных к изменяющимся условиям внешней среды сопровождается морфологическими изменениями, по которым можно определить уровень дифференцированности и адаптационных возможностей популяций (Васильев А.Г. и соавт., 2000). Одним из критериев определения адаптационных возможностей организма является характер реакции костной ткани на макро- и ультраструктурном уровне. Особенно актуальным направлением в исследовании функции кости является изучение её минеральной составляющей. Основным неорганическим минеральным ком-

понентом костной ткани является гидроксиапатит различного стехиометрического состава, который, в отличие от природного, неразрывно связан с органическим матриксом, определяющим механизм его образования (Пальчик Н.А., Мороз Т.Н., 2005). Специфику протекания процессов адаптации показывает изменение степени кристалличности рассматриваемого апатита (Барышев А.Б. и соавт., 2000).

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния кристаллических параметров гидроксиапатита костного регенерата и неповрежденного участка нижней челюсти при ин-

токсикации свинцом у животных первого и четвертого поколения.

Материалы и методы

Проведены экспериментальные исследования на 72 лабораторных белых крысах самцах с массой тела 110-150 г. В эксперименте использованы 3 группы: 1 контрольная (6-месячные животные, которым сразу после отбора создавалась модель перелома) и 2 опытные – первого и четвертого поколения животных, подвергнутых свинцовому отравлению. Для получения опытных групп (животные, подверженные интоксикации) были сформированы 4 семьи нелинейных белых крыс, которым, начиная с 3-месячного возраста, 1 раз в сутки внутрижелудочно вводили ацетат свинца в дозе 100 мг/кг. При возникновении беременности у самок в искусственно сформированной популяции оплодотворенные особи отсаживались в отдельные клетки с целью создания адекватных условий для последующего развития беременности. Изолированные животные продолжали получать свинец тем же способом и в той же дозировке. В качестве приплода было получено 40 животных. С момента прекращения грудного вскармливания и до 6-месячного возраста крысам производили внутрижелудочное введение ацетата свинца в той же дозе. По достижении 6-месячного возраста из сформированной популяции для оперативного вмешательства были отобраны 24 самца весом 110-130 г, которым создавали модель перелома. Из оставшихся животных опять были созданы аналогичные 4 семьи, из приплода которых создавали новые семьи до 4 поколения. При достижении 6 месячного возраста отобранным 24 животным 4 поколения создавали модель перелома. На момент исследования масса животных составляла 150-175 г. Оперативное вмешательство проводили следующим образом: за 30 минут до операции проводили антибактериальную контаминацию с помощью 30% раствора линкомицина гидрохлорида, вводимого в место предполагаемой травмы. Под эфирным наркозом с помощью физиодиспенсера «Implantmed» SI-923 W&H (Австрия), позволяющего одновременно с фрезажем производить орошение оперируемой области физиологическим раствором с рабочего наконечника и избегать перегрева костной ткани в процессе моделирования перелома, твёрдосплавным шаровидным бором № 1 производили остеоперфорацию углового отростка нижней челюсти. Точечное раневое отверстие размером 1мм на кожных покровах обрабатывали 5% спиртовым раствором йода. Содержание и кормление животных осуществляли в соответствии с научно-практическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных. Животных выводили из эксперимента путём декапитации под эфирным наркозом с последующим выделением и скелетированием нижнечелюстных костей. Сроки забора материала для изучения в динамике через 7, 14, 21, 30 суток от момента нанесения травмы, соответственно изучаемым стади-

ям репаративного остеогенеза.

Объектами исследования степени окристаллизованности гидроксиапатита служили регенераты нижних челюстей экспериментальных животных и участки нижнечелюстной кости, максимально приближенные к зоне репарации, высушенные и измельченные в агатовой ступке. Данные по минеральному составу рассматриваемых костных апатитов получены с помощью рентгеноструктурного анализа, проводимого на рентгеновском аппарате ДРОН-3 с использованием медного излучения, монохроматизированного с помощью кристалла графита. Условия съемки дифрактограмм: напряжение $U=30$ кВ, сила тока $I=30$ мА. Для устранения систематических погрешностей съемку проводили по методу внешнего стандарта с использованием поликристалла меди.

На полученных дифрактограммах определялись углы Брегга и интенсивности соответствующих пиков. Рассчитывали межплоскостные расстояния между атомными отражающими плоскостями по формуле Вульфа-Брегга (1):

$$n\lambda = 2d \sin \theta, \quad (1)$$

где n – порядок дифракционного максимума, λ – длина волны рентгеновского излучения, θ – угол Брегга, d – межплоскостное расстояние.

Идентификацию кристалла осуществляли путем сопоставления экспериментальных значений межплоскостных расстояний и относительных интенсивностей дифракционных максимумов с набором табличных значений для соответствующих кристаллических структур по международной картотеке ASTM (Кораго А.А., 1992).

Проведен расчет величин параметров элементарной ячейки по т.н. «квадратичной» формуле (2) для кристаллов гексагональной сингонии, к которой принадлежит исследуемый кристалл гидроксиапатита.

$$1/d^2 = 4(h^2+hk+k^2)/3a^2 + l^2/c^2, \quad (2)$$

где d – межплоскостное расстояние, h, k, l – индексы интерференции, a и c – параметры элементарной ячейки.

Расчеты проводились по методу графической экстраполяции (Франк-Каменецкий В.А., 1975).

Оценены размеры образовавшихся кристаллитов (блоков когерентного рассеивания) L по уширению дифракционных линий в соответствии с формулой Селякова-Шеррера (3).

$$L = K\lambda / \beta_m \cos \theta, \quad (3)$$

где λ – длина волны рентгеновского излучения, θ – угол дифракции, β_m – уширение линии образца, обусловленное малыми размерами кристаллитов, K – константа, близкая к единице.

Рассчитаны коэффициенты микротекстурирования T , свидетельствующие об однородности ориентации кристаллов в кристаллической решетке и рассчитывающиеся по методу соотношения рефлексов. Полученные цифровые данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета Statistica 6.0 for Windows.

Результаты и их обсуждение

При анализе рентгеновских дифрактограмм высушенных препаратов контрольной группы на 7, 14, 21, 30 сутки определяем, что основная кристаллическая фаза исследуемых препаратов представлена гидроксиапатитом с характерными дифракционными рефлексами (Кораго А.А., 1992). Сравнительный анализ дифрактограмм исследуемых образцов регенератов с дифрактограммами образцов материнской кости животных контрольной серии показывает смещение пиков в область больших углов Брегга, отмечае-

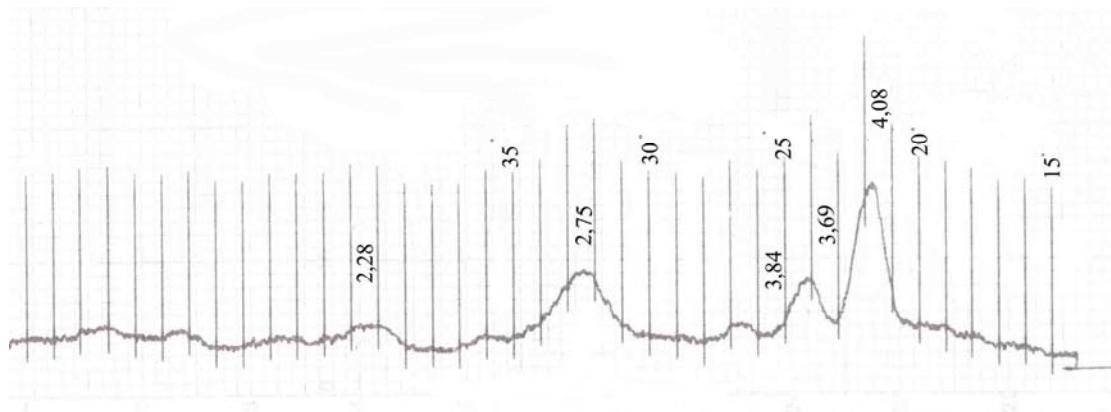


Рис. 1. Дифрактограмма образца регенерата нижней челюсти контрольной серии животных на 14 сутки опыта.

Соотношение величин параметров решеток регенератов и материнской кости $a/c=1,39$ остается неизменным на протяжении всего исследования, что говорит о пропорциональном изменении параметров ячеек (рис. 1). Рассчитанные величины кристаллитов в зоне репарации ($520,11\pm 0,01 \text{ \AA}$) и коэффициента микротекстурирования ($T=0,51\pm 0,03$ отн.ед.) соответствуют размеру нормальной растущей кости (Данильченко С.Н., 2007).

Исследование значений межплоскостных расстояний по дифрактограммам регенератов животных 1 поколения, подверженных заправке ацетатом свинца (рис. 2), показывают увеличение параметров решетки на протяжении всего эксперимента в сравнении с аналогичными показателями контрольной серии животных, как в образцах, полученных в зоне репарации, так и в образцах, полученных в зоне неповрежденной кости. Проведенные расчеты приводят к следующим величинам параметров кристаллической решетки легированного гидроксиапатита: $a=9,443\pm 0,001 \text{ \AA}$, $c=6,914\pm 0,001 \text{ \AA}$ для регенерата; $a=9,449\pm 0,001 \text{ \AA}$, $c=6,897\pm 0,001 \text{ \AA}$ для материнской кости. Они значительно превышают аналогичные параметры, рассчитанные для решетки «чистого» гидроксиапатита. Отношение $a/c=1,37$ практически не меняется. Это свидетельствует о достаточной стабильности образовавшейся кристаллической решетки, а следовательно более низкой растворимости, что является одной из многих причин нарушений нормально-

мое на 14 сутки и остающееся неизменным до конца эксперимента, что свидетельствует об уменьшении параметров элементарной кристаллической ячейки регенератов в сравнении с материнской костью. Расчетные значения параметров кристаллической решетки регенератов: $a=9,371\pm 0,001 \text{ \AA}$, $c=6,712\pm 0,001 \text{ \AA}$ (\AA – ангстрем, $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м}$); параметров кристаллической решетки материнской кости: $a=9,381\pm 0,001 \text{ \AA}$, $c=6,748\pm 0,001 \text{ \AA}$. Это соответствует диапазону изменчивости структурных параметров апатитов биологических тканей (Данильченко С.Н., 2007).

го функционирования костной системы, возникающих при свинцовом отравлении. Увеличение же параметров элементарной ячейки гидроксиапатита животных первого поколения в сравнении с параметрами контрольной группы, при практически неизменном соотношении этих параметров, может свидетельствовать о том, что атомы свинца занимают кристаллографические позиции кальция в исследуемой структуре. Также практически неизменным остается размер кристаллитов (как в материнской кости так и в зоне репарации) – $L=510,92\pm 0,01 \text{ \AA}$, но уменьшается коэффициент микротекстурирования (в обоих исследуемых структурах) – $T=0,41\pm 0,02$ отн.ед., что характерно для уменьшения упорядочения в расположении кристаллов кости и позволяет опосредованно говорить о остеопоротическом состоянии костной ткани в исследуемых образцах (рис. 2). Такой вывод подтверждает и является развитием наших более ранних исследований (Мостовой С.О., 2009).

Дифрактограммы образцов животных 4 поколения, подверженных интоксикации, близки к соответствующим дифрактограммам, относящимся к контрольной группе животных. Соответствующие расчеты параметров кристаллической структуры животных 4 поколения также дают величины близкие к соответствующим величинам параметров для животных контрольной группы, как в зоне репарации так и материнской кости: $a=9,361\pm 0,002 \text{ \AA}$, $c=6,707\pm 0,002 \text{ \AA}$ для регенератов; $a=9,371\pm 0,001 \text{ \AA}$, $c=6,742\pm 0,001 \text{ \AA}$ для

материнской кости. Однако, визуальное расширение дифракционных пиков в сравнении с контрольной группой, подтверждённое рассчитанным размером кристаллитов в зоне репарации – $L=380,41\pm 0,01$ Å и увеличением коэффициента микротекстурирования $T=0,38\pm 0,01$ отн.ед в этой же области (для материнской кости аналогичные параметры отличаются <2%), свидетельствует о наименьших среди подопытных групп темпах роста кристаллов и еще большем разупорядоче-

нии кристаллов как в зоне материнской кости, так и в зоне репарации, в сравнении как с образцами контрольной группы, так и с образцами, содержащими свинец, что возможно связано с мутациями, нарушающими процесс кристаллизации. Отметим также, что расширение пиков может быть обусловлено не только мелкодисперсностью исследованного гидроксиапатита, но и наличием в нем различных искажений, напряжений и микродеформаций (рис. 3).

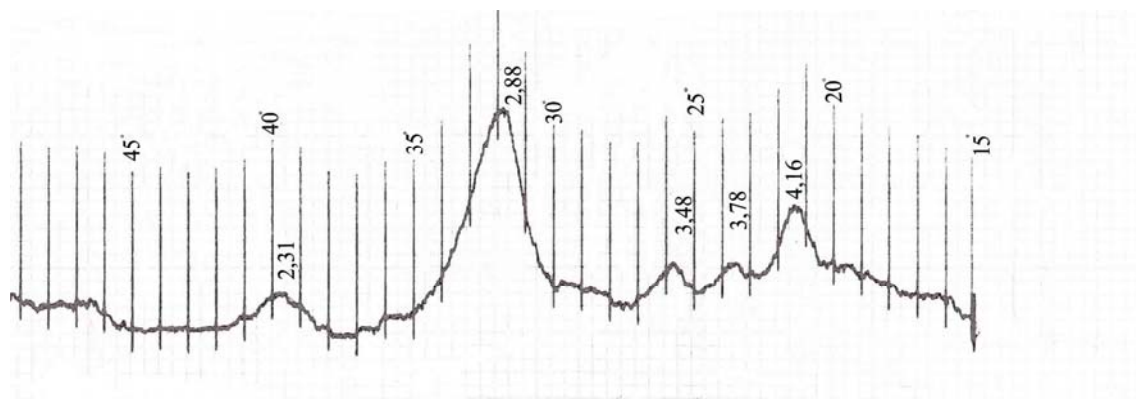


Рис. 2. Дифрактограмма образца регенерата нижней челюсти серии животных первого поколения на 14 сутки опыта.

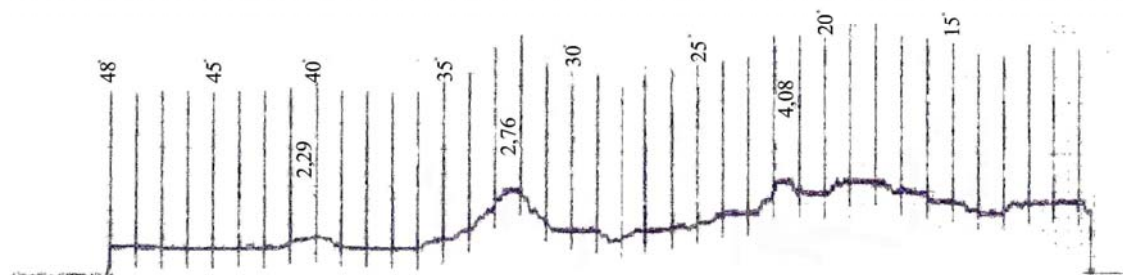


Рис. 3. Дифрактограмма образца регенерата нижней челюсти серии животных четвёртого поколения на 14 сутки опыта.

Таким образом, отмечаем присутствие адаптационных механизмов, протекающих в организме, направленных на утилизацию свинца, нивелирующих его влияние на процессы кристаллизации гидроксиапатита с одной стороны и дегенеративных с другой, которые проявляются как в уменьшении темпов роста, так и порядка построения образующихся кристаллитов.

Выводы

1. У животных первого поколения свинец активно накапливается в костной ткани, внедряясь в кристаллическую решётку гидроксиапатита (с замещением кальция), увеличивая её размеры, снижая растворимость и нарушая процессы упорядочности положения кристаллов в процессе минерализации, создавая условия для течения остеопоротических процессов.

2. У животных четвёртого поколения свинец не влияет на процессы кристаллообразования, не внедряясь кристаллическую решётку гидроксиапатита; однако меньшие размеры, низкие темпы роста и высокая степень разупорядочности кристаллитов в зонах репарации и в области материнской кости, вероятнее всего, связаны с генетически закрепленными изменениями, ведущими к нарушениям минерального обмена и, следовательно, процессов кристаллизации.

Перспективы дальнейших исследований связаны с изучением состояния кристаллических параметров гидроксиапатита костного регенерата и неповрежденного участка нижней челюсти в различных моделях токсического воздействия.

Литературные источники

Васильев А. Г. Эволюционно-экологический анализ устойчивости популяционной структуры вида (хроно-географический подход) / А. Г. Васильев, И. А. Васильева, В. Н. Большакову – Екатеринбург, 2000. – С. 20-79.

Пальчик Н. А. Рентгенофлуорисцентный анализ, рентгенография и спектроскопия для исследования патогенных органоминеральных образований в живом организме / Н. А. Пальчик, Т. Н. Мороз // Спектрография, рентгенография и кристаллохимия минералов : мат. междунар. науч.-практ. конф. – Казань, 2005. - С. 194-196.

Изучение апатита бедренных костей детей / А. Б. Барышев, Т. И. Иванова, О. В. Франк-Каменецкая [и др.] // Минералогия и жизнь. – Сыктывкар, 2000. – С. 85-89.

Кораго А. А. Введение в биоминералогия /

А. А. Кораго. – СПб. : Недра, 1992. – С. 176-181.

Франк-Каменецкий В. А. Руководство по рентгеновскому исследованию минералов // В. А. Франк-Каменецкий. - СПб. : Недра, 1975. — 396 с.

Данильченко С. Н. Структура и свойства апатитов кальция с точки зрения биоминералогии и биоматериаловедения : [обзор] / С. Н. Данильченко // Вестник СумГУ. – 2007. - №2. - С. 33-58.

Кристаллическая фаза в составе регенерата нижней челюсти на фоне хронической свинцовой интоксикации и проводимой антитоксической терапии / С. О. Мостовой, В. С. Пикалюк, Е. М. Максимова [и др.] // Морфология.— 2009. — Т. 3, № 1. - С. 50-56.

Пикалюк В.С, Мостовой С. О., Максимова О.М., Наухацький І.А., Плеханова Х.О. Особливості кристалічної структури регенерату нижньої щелепи першого та четвертого поколінь білих щурів, які були піддані свинцевому отруєнню.

Резюме. В статті приведені результати рентгеноструктурних досліджень репаративного остеогенезу при переломах нижньої щелепи на тлі хронічної свинцевої інтоксикації 1-4 поколінь лабораторних білих щурів, виконаних на 72 лабораторних білих щурах-самцях з масою тіла 110-150 г. Метою даного дослідження стало вивчення стану кристалічних параметрів гідроксиапатита кісткового регенерату і незайманої ділянки нижньої щелепи при інтоксикації свинцем у тварин першого і четвертого покоління. Об'єктами дослідження ступеня кристалізованості гідроксиапатита були регенерати нижніх щелеп експериментальних тварин і ділянки нижньої щелепи кістки, максимально наближені до зони репарації, висушені і подрібнені в агатовій ступці. Дані по мінеральному складу розглянутих кісткових апатитів отримані за допомогою рентгеноструктурного аналізу, проведеного на рентгеновському апараті ДРОН-3. Встановлено, що у тварин 1 покоління свинець активно накопичується в кістковій тканині, впроваджуючись в кристалічну решітку гідроксиапатита (із заміщенням кальцію), порушуючи тим самим процеси мінералізації. Показані зміни перебігу процесів кристалізації у тварин 4 покоління, що виявляються в порушенні упорядкування положення утворених кристалітів, які перебігають на тлі можливих генетичних порушень, викликаних постійною дією токсичного агента (свинцю).

Ключові слова: регенерат нижньої щелепи, Pb-інтоксикація, гідроксиапатит, покоління білих щурів.