

УДК [616.717.4+616.718.4]-001.5-06:577.18

**БИОМЕХАНІЧНІ ПАРАМЕТРИ ДОВГИХ КІСТОК СКЕЛЕТА
ПІСЛЯ ПЕРЕЛОМУ**

В.З. Сікора, Г.Ф. Ткач, М.В. Купина
*Сумський державний університет,
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007, Україна*

У роботі за допомогою комплексу біомеханічного дослідження вивчали міцнісні характеристики суцільної кістки та з модельованим переломом в середній третині діафіза, біохімічного методу, вміст (загального білка, кальцію, лужної фосфатази, активність АсАТ та АлАТ сироватки крові), розкриті основні закономірності морфогенезу кісток скелета суцільної кістки та з модельованим переломом в середній третині діафіза.

ВСТУП

Одним з реактивних проявів кістки як органа на зміни зовнішнього навантаження є перелом [1]. Теорія про порушення кісткового балансу після травми скелета [2] змінилася уявленням про кістки як мобільну динамічну систему. Відомо, що роль основних біологічних механізмів пластичності скелета після травми відіграють процеси моделювання (формування) і ремоделювання (перебудова) внаслідок кооперативної діяльності клітинних елементів різних типів, що знаходяться в ендості й періості [3]. Механізми репарації і ремоделювання функціонують протягом всього життя скелета і є вираженням функціональної адаптації кістки до змін біомеханічного навантаження. Ремоделювання починається в ембріональному періоді. Воно є відповідною реакцією на зміни метаболізму кісткової тканини будь-якої природи. Завдяки процесу ремоделювання кісткова тканина як природний біокомпозит підтримує свої механічні якості. До основних властивостей, що здатні реалізувати процеси формування і перебудови кісткової тканини, окрім генетичної детермінованості, належать кісткова маса, архітектоніка кістки як несучої конструкції, співвідношення в ній компактної й губчастої речовини, щільність його композиції [4]. При цьому маса скелета ссавців може змінюватися не тільки під впливом динамічних і статичних навантажень у процесі росту й розвитку кістки, але також і у дорослої тварини, будучи детермінантною механічною властивістю кісткової тканини, яка визначає її міцність [5]. Кількість і якість кістки впливають на її міцність. Зниження міцності кістки призводить до високого ризику переломів.

Якість кістки визначають три основних параметри: мікроархітектоніка кісткової тканини, наявність мікроушкоджень й органічний матрикс [6].

Метаболізм кісткової тканини є частиною загального обміну й, таким чином, перебуває в прямій залежності від його рівня й стану. Поряд із цим кісткова тканина бере активну участь в обмінних процесах і насамперед в обміні кальцію й фосфору [7].

Тому особливий інтерес становить вивчення функціонального і морфологічного станів кісткової тканини, знання яких дозволило б

опанувати процесом остеогенезу для керування ним в інтересах практики. Отже, велике значення мають вивчення остеогенезу і біомеханічних властивостей кістки після травми і діагностична оцінка травматичних порушень.

МЕТА РОБОТИ

Визначення особливостей біомеханічних параметрів довгих суцільних кісток скелета щурів та кісток з модельованим переломом в середній третині діяфіза.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1 На експериментальній моделі вивчити міцнісні показники кісток скелета контрольних груп тварин для проведення коректного порівняльного аналізу отриманих даних у експериментальних (з модельованим переломом в середній третині діяфіза кісток) груп тварин на певних стадіях репаративного остеогенезу.

2 Вивчити динаміку та кореляційну залежність між біохімічними показниками метаболізму міжклітинної речовини сполучної тканини щурів (загального білка, вмісту кальцію, лужної фосфатази, активність АсАТ та АлАТ сироватки крові).

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

З метою вивчення біомеханічних параметрів довгих суцільних кісток скелета щурів та кісток з модельованим переломом в середній третині діяфіза та біохімічних показників метаболізму міжклітинної речовини сполучної тканини щурів проведені експериментальні дослідження на 24 білих безпородних щурах - самцях з масою тіла 150-200 г. Всі досліді проведені в ранковий час (8-10 годин), щоб виключити вплив на результати досліджень добових ритмів фізіологічних і біохімічних процесів.

Перед експериментом проводився ретельний огляд тварин, враховували їх рухову активність, стан покриву шерсті. Після зовнішнього огляду і вибраковування тварин, у яких виявили відхилення від звичайних норм у поведінці, розпочинали експеримент одночасно з дослідною і контрольною групами тварин. При цьому протягом всіх термінів спостереження у віварії підтримувалася постійна температура, за тваринами здійснювався належний догляд. Тварини утримувалися на стандартному кормовому раціоні у звичайних умовах віварію. Проводилися спостереження за динамікою маси тіла тварин кожні 10 днів.

Травми правої стегнової кістки завдавали так.

За 30 хвилин до початку операції вводили тваринам внутрішньом'язово профілактичну дозу ампіциліну (7,5 мг/кг). Під ефірним наркозом робили поздовжній розріз завдовжки 0,8 - 1,5 см. Поперечного перелому діяфіза завдавали зубним диском на глибину 2 мм на межі проксимальної та центральної третин діяфіза стегнової кістки. Операційну рану закривали шкірним швом.

Піддослідні тварини були поділені на 2 серії:

I серія (10 щурів) - інтактні тварини.

II серія (24 щурі) – експериментальні тварини після остеотомії в асептичних умовах на 1-шу, 5-ту, 14-ту і 21-шу доби по 6 тварин у кожній.

Механічні властивості кісткової тканини до і після остеотомії вивчали за допомогою вимірювання мікротвердості компактною тканиною стегнової кістки щурів на приладі ПМТ-3 (М.М.Хрущов, Е.С.Беркович, 1960) при постійному навантаженні 50 г і часі підведення й навантаження індентором 5 секунд (Б.В.Мугт, 1960). Зразки для випробування готували за методом, описаним у праці О.Г. Гонцової (1974).

Число мікротвердості Н визначали за формулою

$$H = P \cdot 1,854 / d^2 \text{ кгс / мм}^2,$$

де Р - навантаження на піраміду, кг; d - середнє арифметичне довжини обох діагоналей відбитка після зняття навантаження, мм; навантаження – 50г; час підведення і час навантаження індентора - 5 с. Юстирування приладу проводили на еталоні - свіжому відколі кристала кухонної солі. Кристал кухонної солі має відому величину твердості при будь-якому навантаженні від 5 до 50г 19-21 кг/мм².

Терміни забору матеріалу для вивчення мікротвердості непошкодженої і травмованої кістки проходили в динаміці (через 1-шу, 5-ту, 14-ту й 21-шу доби) від моменту завдання травми відповідно до стадій репаративного остеогенезу [1]. Забій тварин здійснювали відповідно до "Правил проведення робіт з експериментальними тваринами" [9]. Проводили їх скелетування, звільняючи від м'яких тканин травмовані стегнові кістки.

Для вивчення динаміки та кореляційної залежності між біохімічними показниками метаболізму міжклітинної речовини сполучної тканини щурів (загального білка, вмісту кальцію, лужної фосфатази, активності АсАТ та АлАТ сироватки крові) [10].

Матеріалом для дослідження була венозна кров експериментальних тварин. Після евтаназії відокремлювали голову щурів, тулуб поміщали на холод і збирали стікаючу кров у пробірку, що містить 1 мл 5% р-ну гепарину. Зібрана кров центрифугувалася при 300000 об/хв протягом 15 хвилин, сироватка відокремлювалася від еритроцитів. Еритроцити лізувалися в 4 об'ємах деіонізованої дистильованої води. Їх лізати і плазму крові поміщали в пластикові пробірки і зберігали в рідкому азоті для вивчення активності ферментів антиоксидантної системи. Осад відкидали. Еритроцити лізувалися в 4 об'ємах деіонізованої дистильованої води. У надосадовій рідині і лізатах еритроцитів визначався вміст загального кальцію – за методикою в посібнику за редакцією А.А. Покровського (1969), активність АлАТ та АсАТ – уніфікованим динітрофенілгідразиним методом за Райтманом і Френзель.

Отримані цифрові результати обробляли статистично на персональному комп'ютері з використанням пакета статистичних програм. Вірогідність різниці результатів між експериментом і контролем оцінювали з використанням критерію Стюдента, достатньою вважали вірогідність помилки менше 5% (p<0,05).

Результати роботи викладені у вигляді таблиць і графіків відсоткового співвідношення даних експерименту й контролю, взятого за 100%.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні відсутні фактичні дані про мікротвердість компактної речовини стегнової кістки щурів після травматичної остеотомії, немає відомостей і про топографію мікротвердості різних зон стегнової кістки. З огляду на попередні дослідження багатьох авторів ми можемо припустити, що мікротвердість кісткової тканини стегнової кістки щурів дослідної групи може змінюватися, тому що в кістковій тканині змінюється кількість неорганічних речовин.

Нами було вивчено 20 інтактних, 24 контрольні та 24 експериментальні стегнові кістки щурів. Проведено 156 вимірів і розрахунків при вивченні мікротвердості компактної речовини стегнових кісток щурів.

У результаті проведеного дослідження нами було встановлено динаміку мікротвердості різних ділянок компактної речовини стегнової кістки щурів (табл. 1).

Таблиця 1– Динаміка мікротвердості (кгс/мм² компакної речовини стегнової кістки щурів до і після остеотомії (M ± m))

	Досліджувана ділянка					
	Інтактні		Контроль		Експеримент	
	Середина діафіза	Епіфізарна зона	Середина діафіза	Епіфізарна зона	Середина діафіза біля місця пошкодження	Епіфізарна зона
1-ша доба	21,25± ±0,39	20,13 ± ±0,56	20,16 ± ±0,67	20,25 ± ±0,56	20,0 ± ±2,8	19,5 ± ±2,9
5-та доба	22,29± ±0,39	22,87 ± ±0,67	21,01 ± ±1,08	22,08 ± ±0,99	21,94 ± ±1,08	22,08 ± ±0,33
14-та доба	26,44± ±0,43	24,30 ± ±0,78	25,52 ± ±1,1*	26,16± ±0,25*	24,42 ± ±0,66	26,61 ± ±0,51
21-ша доба	28,25± ±0,56	28,95 ± ±0,55	26,61 ± ±0,3*	26,58 ± ±0,5*	25,86± ±0,48	26,58 ± ±0,85

Примітка. * — різниця достовірна відносно даних "інтактні"

Виходячи з результатів наших досліджень, ми можемо припустити, що зниження на 11,49-14,82% в перший день, на 11,85% -15,96% на 5-ту добу, та через 21 день -4,81%- 5,47% механічної міцності кісткової тканини найбільш виникає в місці остеотомії, що, у свою чергу, є найбільш вразливим місцем при подальшому пошкодженні (рис. 1).

Але в той самий час міцнісні характеристики компакної речовини стегнової кістки щурів після остеотомії в епіфізарній зоні виявилися міцнішими в 1,2 -1,5 разу, ніж в інтактній і контрольній групах тварин.

Таким чином, отримані результати мікротвердості компакної речовини стегнової кістки в середині діафіза і епіфізарній зоні кістки після остеотомії слід враховувати лікарям - травматологам при розробленні найбільш адекватних методів фіксації переломів.

Для вивчення впливу посттравматичного репаративного процесу на внутрішній стан тварини вивчали біохімічні показники крові щурів. Дані лабораторних досліджень наведені у таблиці 2.

Таблиця 2 – Біохімічні показники в динаміці остеогенезу (n = 10), M±m

Доба	Загальний білок, г%	Вміст кальцію, ммоль/л	Лужна фосфатаза, нмоль/с*л	Активність АсАТ, мкмоль/мл	Активність АлАТ, мкмоль/мл
Інтактні	6,98± ±1,24	1,32± ±2,67	3019,79± ±1,27	0,0124± ±0,67	0,0120± ±0,12
1-ша доба	6,22± ±0,76*	4,13± ±0,89*	2569,39± ±0,57	0,0096± ±0,42	0,0107± ±0,56
5-та доба	6,43± ±0,86	2,58± ±1,46*	4732,69± ±0,67	0,0116± ±0,21	0,0127± ±0,18
14-та доба	5,17± ±1,75*	2,28± ±1,27*	2800,81± ±1,72*	0,0119± ±0,29	0,0103± ±0,61
21-та доба	6,38± ±1,71*	2,97± ±3,35**	2343,42± ±0,72*	0,0113± ±0,89	0,0124± ±0,69

Примітка.* - відзначені показники відрізняються від відповідних величин контрольних даних з рівнем не менше P < 0,001; ** - P < 0,01

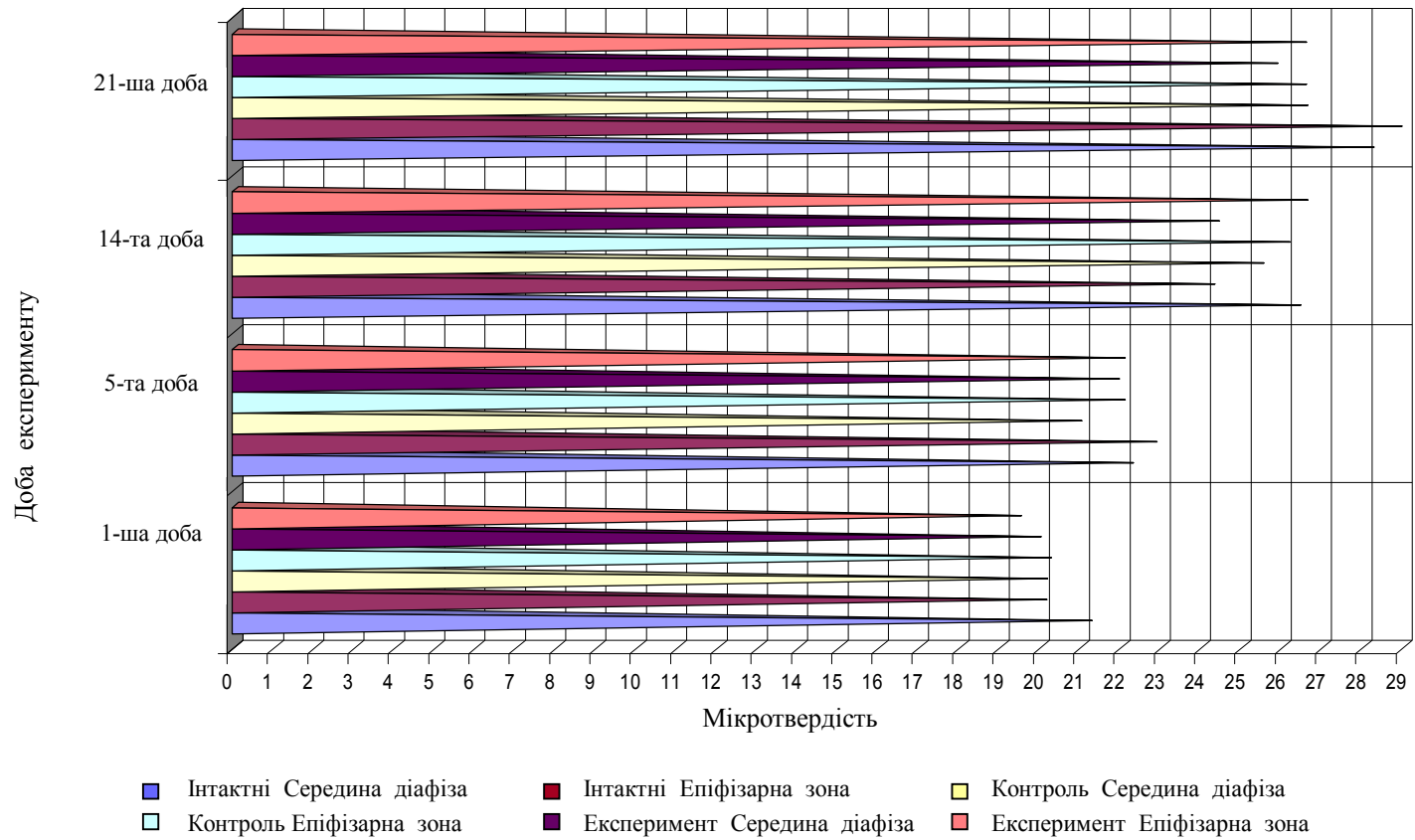


Рисунок 1. – Динаміка мікротвердості (кг/мм² компактної речовини стегнової кістки щурів до і після остеотомії (M±m))

Активність лужної фосфатази у сироватці крові щурів до остеотомії склала $3019,79 \pm 1,27$ нмоль/с*л. Ми встановили, що активність лужної фосфатази у крові дослідних щурів після остеотомії стегнової кістки на 1-шу добу знижується до $2569,39 \pm 0,57$ нмоль/с*л, а потім поступово підвищується. Особливо високі показники відмічаються на 5-ту добу $4732,69 \pm 0,67$ нмоль/с*л, $2800,81 \pm 1,72$ нмоль/с*л – на 14-ту добу та $2343,42 \pm 0,72$ нмоль/с*л – на 21-шу добу відповідно.

Як відзначалося вище, ЛФ є маркером остеобластів, хоча її фізіологічна роль у цьому виді клітин остаточно не з'ясована.

Дані таблиці демонструють, що активність ЛФ після операції поступово наростає й досягає максимуму на 5-ту добу. Це свідчить не тільки про зростання каталітичної активності ферментів, але й про поступове зрушення рН тканин у лужний бік на 5-ту добу після втручання.

Лужна фосфатаза на 14-ту і 21-шу доби досліджень вірогідно відрізнялася від доопераційного рівня. Це свідчить про те, що й у цей період часу в кістковій тканині проходять процеси її перебудови з високим ступенем метаболічної активності.

Тому ми вважаємо, що підвищення активності лужної фосфатази після остеотомії пов'язане з активацією синтезу її тканинних форм у печінці, нирках і кістковій тканині. Крім того, відомо, що у клітинах кісткової тканини, як і в інших органах, фосфатаза депонована у значних кількостях. Під час перелому відбувається посилена мобілізація тканинних ферментів у зону ушкодження. Тому активність ЛФ у сироватці крові щурів після остеотомії висока за рахунок підвищення загальної кількості ферментів, які транспортуються із печінки, кишечника, нирок, кісткової тканини в зону перелому.

При визначенні вмісту кальцію Ca^{2+} ми встановили, що його рівень вірогідно збільшується в 1-шу добу остеогенезу з $1,32 \pm 2,67$ до $4,13 \pm 0,89$ ммоль/л. Ми можемо припустити, що це пов'язано зі збільшенням активності остеобластичних реакцій у кістковій тканині внаслідок затихання остеокластичних реакцій.

На 5-ту добу остеогенезу рівень кальцію також відрізняється від доопераційного рівня, але його показники значно менші ($2,58 \pm 1,46$ ммоль/л), оскільки інтенсивність катаболічних реакцій знижується, хоча залишається на високому рівні $2,28 \pm 1,27$ ммоль/л - 14 доба та $2,97 \pm 3,35$ ммоль/л відповідно.

Ми вважаємо, що до цього періоду регенерації з'являються клітини остеобластичної спрямованості, які мають кальціестимулювальну активність. Отже, підвищення вмісту кальцію в крові пов'язане з інтенсивністю остеогенезу. Кальцій бере участь у реакціях, пов'язаних з формуванням органічного скелета кісткового матриксу і подальшою мінералізацією.

Аналіз вмісту таких метаболітів, як загальний білок, та активності ферментів переамінування АлАТ і АсАТ показав невисокі значення коефіцієнта кореляції між інтактними та експериментальними (2-3%) тваринами в різні періоди після остеотомії.

ВИСНОВКИ

1 Таким чином, можна вважати, що реакція кісткової тканини на стресові фактори "біомеханічної природи" відображається у зниженні мікротвердості з 5-ї доби і залишається в усі терміни спостереження. Це пов'язано з виходом макроелементів – кальцію і фосфору – із кісткової тканини.

2 Остеотомія спричиняє розлад метаболізму кісткової тканини, що характеризується зростанням у сироватці крові концентрації активності

лужної фосфатази, кальцію і незначним зменшенням загального білка та активності ферментів переамінування АЛТ і АсАТ.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

У подальшому будуть вивчені загальнобіологічні взаємовідношення репаративного та фізіологічного остеогенезу.

SUMMARY

In this work we stated inability characteristics of the intact bone and bone with fracture by biomechanical methods. By biomechanical methods statyed the level of general protein, calcium, alcalite fosphatase; ALT, AST in blood plasma. Have beenshown basical regnlarly of morphogenesis of the intact and fractured bone.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Карпенко Л.Ю. Биохимические аспекты развития костной патологии у собак при эндокринных расстройствах //Материалы XIV Международной конференции «Белые ночи». – Санкт-Петербург, 2001 - С. 3-18.
2. Некачалов В.В. Патология костей и суставов. – СПб.: Сотис, 2000. – 288 с.
3. Clinton T. Rubin, Janet E. Rubin. Biology, Physiology, and Morphology of Bone In: Ruddy: Kelley's Textbook of Rheumatology, 6-th ed., W. B. Saunders Company; Section XIX - Disorders of Bone and Structural Protein, Chapter 110. – P. 1611-1634.
4. Pamela Gehron at all. Bone Biochemistry. In: Osteoporosis. Eds: von Robert Marcus, David Feldman, Jennifer Kelsey, 2-nd ed., Academic Press, 2002, Vol. 1-20.
5. Principles of Bone Biology, Eds: John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz, Gideon A. Rodan; 2-nd ed., Academic Press; San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, 2002, vol. 1-2.
(Contents: URL:http://www.academicpress.com/bonebio/pdf/bilezikian_PBB2_toc.pdf).
6. Blahser S.. Nitrogen anabolic effect of calcitonin on bone in rats //Acta Endocr., 1975. - Vol. 80. - Suppl. 199. – 546p.
7. Anita Karanen, Biocompatibility of orthopaedic implants on bone forming cells, Chapter 2. Review of the literature 2.1. Bone, Department of Anatomy and Cell Biology, University of Oulu Biocenter Oulu, University of Oulu, 2000.
8. Десятниченко К.С., Камерин В.К. Изменение белкового и фосфорно-кальциевого обмена крови при возмещении дефектов костей голени // Мат. 25-й юбилейной научно-практической конференции. – Курган. - 1992. – С. 14-16.
9. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. – М.: Медицина, 1981. – 167 с.
10. Западнюк В.И., Западнюк И.П., Захария С.А. Лабораторные животные. – К.: Вища школа, 1985. – 385 с.
11. Марри Р., Греннер, Мейес П., Родуэлл В.. Биохимия человека. – М.: Мир, 1993. - 812 с.

В.З. Сікора, професор Медичного інституту СумДУ, м. Суми;

Г.Ф. Ткач, доцент Медичного інституту СумДУ, м. Суми;

М.В. Купина, студент Медичного інституту СумДУ, м. Суми

Надійшла до редакції 14 лютого 2007 р.