

УДК 616.718.5-001.5:577.118-616.092.9

## Особенности жесткости и твердости регенерата большеберцовых костей в условиях техногенного микроэлементоза организма

А.В. Кореньков<sup>1</sup>, И.М. Закиев<sup>2</sup>, В.И. Закиев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Медицинский институт Сумского государственного университета. Украина

<sup>2</sup> Аэрокосмический институт национального авиационного университета, Киев. Украина

*Physical-mechanical characteristics of the tibiae in mature and elderly rats on the 24th day after a fracture in conditions of taking increased doses of heavy metal salts by the animals were studied with help of the method of kinetic indenting. In the experimental conditions, a decrease of hardness and worsening of elastic properties of bones after the injury were revealed. A lower content of osteotrophic elements in the experimental animal regenerate was found out and confirmed by the method of X-ray microanalysis.*

*За допомогою методу кінетичного інденування досліджено фізико-механічні характеристики великогомількових кісток зрілих і старих щурів на 24 добу після перелому в умовах споживання тваринами підвищених доз солей важких металів. Встановлено, що в умовах експерименту відбувається зниження твердості і погіршення пружних властивостей посттравмованих кісток. Виявлено зниження вмісту остеотропних елементів у регенераті експериментальних тварин, що підтверджено методом рентгенівського мікроаналізу.*

**Ключевые слова:** костный регенерат, микроэлементы, биомеханические характеристики

### Введение

Микроэлементы в составе многих ферментов и белков играют большую роль в репаративном остеогенезе, а именно принимают участие в гемостазе, ангиогенезе, образовании энергии, пролиферации и дифференцировке клеточных элементов, в синтезе органической матрицы кости и ее минерализации [8–10]. Питьевая вода и пища современного человека не всегда адекватны его потребностям в обеспечении теми или иными микроэлементами. На сегодняшний день существует много работ, которые показывают, что повышение содержания микроэлементов в почве, воде, атмосферном воздухе приводит и к повышению их уровня в организме животных и людей [11]. В отдельных регионах Украины антропогенное загрязнение окружающей человека природной среды во многих случаях связано с микроэлементами из группы тяжелых металлов, которые поступают в организм в повышенных количествах, вызывают дисбаланс его микроэлементного состава, что приводит к развитию микроэлементозов [4, 15]. Таким образом, заживление переломов очень часто может происходить именно в этих условиях.

Исходя из современных определений, репаративный остеогенез — это процесс образования морфологически зрелой костной ткани на месте повреждения кости, который направлен на ее полноценное структурно-функциональное восстановление [1, 12]. Безусловно, одним из главных критериев этого процесса является восстановление биомеханических свойств поврежденной кости, а именно прочности, твердости, жесткости. Поэтому *целью нашей работы* было исследование жесткости и твердости регенерата большеберцовых костей белых крыс с определением в их составе остеотропных элементов в условиях поступления в организм повышенного количества солей тяжелых металлов.

### Материал и методы

Эксперимент был проведен на 30 белых лабораторных крысах самцах 8- и 24-месячного возраста. На границе проксимальной и средней трети диафиза большеберцовых костей формировали дырчатый дефект диаметром 1,5 мм. Всем животным повреждение наносили зубным бором под эфирным наркозом в асептических условиях.

Исследуемые животные были разделены на 3 серии:

I серия (10 крыс) — контрольные животные, которые употребляли воду хорошего качества.

II серия (10 крыс) — экспериментальные животные, которые на протяжении одного месяца пили воду с комбинацией солей тяжелых металлов (медь ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) — 5 мг/л, цинк ( $\text{ZnCl}_2$ ) — 5 мг/л, железо ( $\text{FeSO}_4$ ) — 10 мг/л, марганец ( $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) — 5 мг/л и свинец ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) — 3 мг/л), что соответствует качеству воды в Сумской области [4].

III серия (10 крыс) — экспериментальные животные, которые пили такую же воду с солями тяжелых металлов на протяжении двух месяцев.

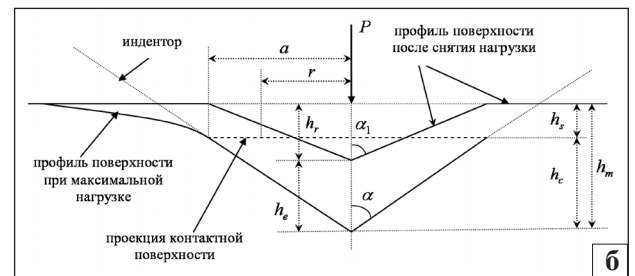
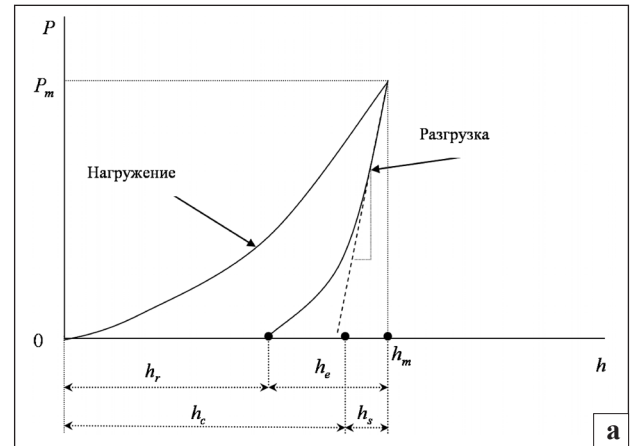
Животных выводили из эксперимента на 24-е сутки после перелома. Этот срок соответствует стадии «результат» по классификации репаративного остеогенеза по Н.А. Коржу, Н.В. Дедух [7].

Изучение упругопластических свойств регенерата большеберцовой кости проводили методом кинетического индентирования на приборе «Микрон-гамма», который был разработан в Аэрокосмическом институте национального авиационного университета [14, 16]. Расчет показателей микротвердости и модуля Юнга осуществляли посредством регистрации диаграмм вдавливания — зависимость нагрузки ( $P$ ) на индентор (трехгранная алмазная пирамида Берковича с основанием в виде равностороннего треугольника и углом при вершине между противоположными гранями  $65^\circ$ ) от глубины ( $h$ ) его внедрения в кость (рис. 1) [5, 17–24].

Препарированную кость перерезали на две части таким образом, чтобы область перелома оставалась по краю одного фрагмента. После этого кость устанавливали в полость приставки поперечным сечением сверху (согласно ориентации остеонов) и на одном уровне с ее полированной поверхностью. Приставку с костью фиксировали на двухкоординатном столе прибора так, чтобы обеспечить перпендикулярность оси пирамиды к интермедиарной части регенерата, в которой и проводили измерения. При этом были учтены условия нанесения отпечатков — расстояние между краем кости до отпечатка больше  $2,5 d$  ( $d$  — длина диагонали отпечатка), а расстояние между соседними отпечатками больше  $3 d$  [2, 3, 6].

Величину модуля упругости и микротвердости рассчитывали по формулам:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_i^2}{E_i} \quad \text{и} \quad H_M = \frac{P_m}{A_c},$$



**Рис. 1.** Диаграмма внедрения индентора (а) и схематическое представление невосстановленного и восстановленного отпечатков (б):  $h_m$  — максимальная глубина внедрения;  $h_r$  — глубина восстановленного отпечатка;  $h_c$  — контактная глубина;  $h_s$  — смещение контактной поверхности при вдавливании;  $h_e$  — упругое восстановление отпечатка;  $2a$  — размер отпечатка на поверхности после снятия нагрузки;  $\alpha$ ,  $\alpha_1$  — углы между осью и гранью при нагрузке и после снятия нагрузки соответственно

где  $E$ ,  $E_i$  и  $\nu$ ,  $\nu_i$  — модули упругости и коэффициенты Пуассона соответственно для кости и индентора (для алмаза:  $E_i=1141$  ГПа и  $\nu_i=0,07$ ; для кости  $\nu=0,3$ );  $E_y$  — приведенный контактный модуль упругости ГПа;  $H_M$  — невосстановленная микротвердость по Мейеру  $\frac{H}{\text{мм}^2}$  (представляет среднее давление на поверхности отпечатка и количественно наиболее точно отражает физическую сущность твердости) [6];  $P_m$  — максимальная нагрузка на индентор Н;  $A_c$  — проекция контактной площади,  $\text{мм}^2$ .

Одновременно с определением физико-механических свойств регенерата большеберцовых костей проводили анализ его поверхности методом рентгеновского микроанализа на растровом электронном микроскопе «РЭМ 106-И». Определяли содержание кальция, фосфора, кислорода в местах измерения микротвердости и жесткости.

Содержание животных и все манипуляции проводили в соответствии с положением «Общих этических принципов экспериментов на животных», утвержденным Первым Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

## Результаты и их обсуждение

Исследование регенерата кости выявило, что максимальная твердость соответствует середине ее интермедиарной части, а минимальная — наружной и внутренней поверхностям. Исходя из этого, мы учитывали результаты, где наблюдались наибольшие показатели твердости (рис. 2).

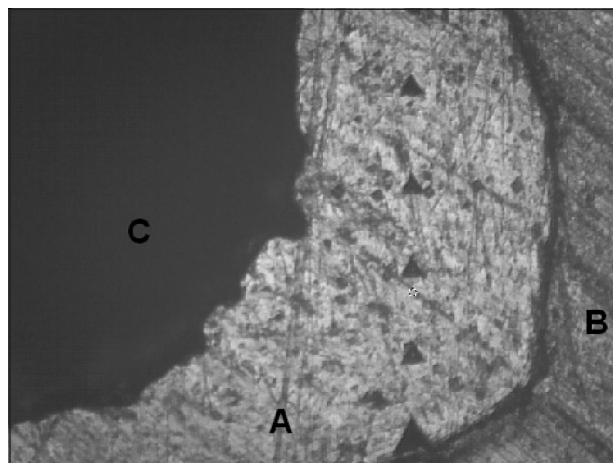
Жесткость является одним из биомеханических свойств кости, которое характеризует ее способность сохранять свою форму под нагрузкой [13]. Полученные диаграммы нагружения в программном обеспечении «Микрон-гамма» дали возможность провести расчеты упругой и пластической составляющей работы индентирования (рис. 3).

Результаты анализа кривых индентирования регенерата большеберцовых костей контрольной серии свидетельствуют, что максимальная их твердость и жесткость на 24-е сутки после перелома наблюдаются у зрелых животных. Твердость составила  $(0,914 \pm 0,02)$  ГПа, а модуль упругости  $(28,31 \pm 0,6)$  ГПа (табл.).

Определилась тенденция к уменьшению величины твердости и жесткости регенерата большеберцовых костей старых крыс на 8,54% ( $P < 0,05$ ) в первом и на 8,27% ( $P < 0,05$ ) во втором случае по отношению к зрелым животным.

Повышенное поступление в организм солей тяжелых металлов в период регенерации большеберцовых костей сопровождалось изменениями их биомеханических свойств. Так, после одного месяца эксперимента у зрелых животных произошло уменьшение твердости на 9,96% ( $P < 0,05$ ) и модуля упругости на 6,68% ( $P < 0,05$ ). У старых животных наблюдалась подобная тенденция к уменьшению этих показателей на 9,57% ( $P < 0,01$ ) в первом и на 7,98% ( $P < 0,05$ ) во втором случае.

Условия эксперимента привели и к изменениям показателей, которые отображали состояние неорганической фазы поврежденных участков костей. С помощью рентгеновского микроанализа области перелома, который был проведен на растровом электронном микроскопе (рис. 4, 5), у зрелых животных была выявлена тенденция к уменьше-



**Рис. 2.** Микрофото поперечного сечения большеберцовой кости на уровне перелома с отпечатками, которые выполнены алмазной пирамидой Берковича на нанотвердомере «Микрон-гамма» (А — кость с отпечатками; В — эпоксидная смола; С — костномозговая полость). Ув.  $\times 500$

нию концентрации кальция на 12,41% ( $P < 0,01$ ), фосфора на 10,38% ( $P > 0,05$ ) при одновременном сохранении высокой концентрации кислорода.

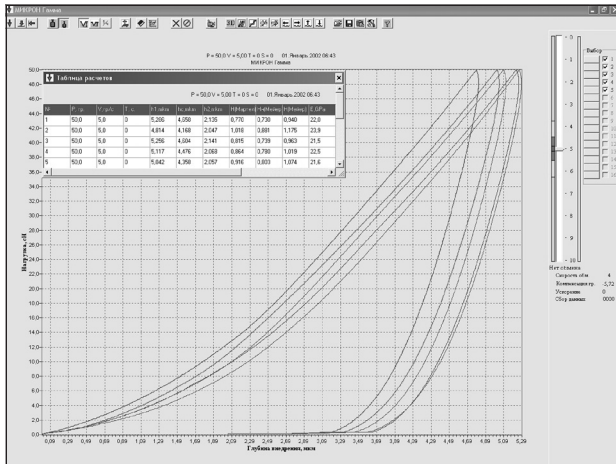
У контрольных старых животных содержание остеотропных элементов было больше, чем у животных II группы (зрелых) — кальция на 12,85% ( $P < 0,05$ ), фосфора на 9,74% ( $P > 0,05$ ). Концентрация кислорода имела другую тенденцию — она уменьшилась на 12,27% ( $P > 0,05$ ). После месяца эксперимента у старых животных произошло уменьшение содержания кальция на 9,27% ( $P > 0,05$ ), фосфора на 6,7% ( $P > 0,05$ ), кислород оставался практически неизменным.

Употребление экспериментальными животными воды с повышенной концентрацией солей тяжелых металлов на протяжении двух месяцев привело к дальнейшим изменениям содержания в регенерате остеотропных элементов. Концентрация кальция уменьшалась на 18,82% ( $P < 0,01$ ) у зрелых и на 15,5% ( $P < 0,01$ ) у старых животных, а фосфор на 19,48% ( $P < 0,01$ ) и на 13,81% ( $P < 0,05$ ) соответственно.

При этом показатели твердости и модуля упругости у зрелых и старых животных также

**Таблица.** Данные о некоторых биомеханических свойствах и рентгеновском микроанализе регенерата большеберцовых костей крыс на 24-е сутки после перелома  $n=10$ ,  $M \pm m$

| Серия эксперимента | Возраст | Биомеханические показатели |                  | Рентгеновский микроанализ |                  |                  |
|--------------------|---------|----------------------------|------------------|---------------------------|------------------|------------------|
|                    |         | $H_m$ ГПа                  | модуль Юнга ГПа  | Ca, %                     | P, %             | O, %             |
| I серия            | зрелые  | $0,914 \pm 0,02$           | $28,31 \pm 0,6$  | $34,82 \pm 0,84$          | $14,84 \pm 0,91$ | $37,09 \pm 2,64$ |
|                    | старые  | $0,836 \pm 0,016$          | $25,97 \pm 0,69$ | $39,95 \pm 1,8$           | $16,44 \pm 0,59$ | $32,54 \pm 4,12$ |
| II серия           | зрелые  | $0,823 \pm 0,025$          | $26,42 \pm 0,62$ | $30,5 \pm 1,2$            | $13,3 \pm 1,23$  | $37,49 \pm 2,24$ |
|                    | старые  | $0,756 \pm 0,017$          | $23,9 \pm 0,52$  | $36,25 \pm 1,97$          | $15,34 \pm 1,02$ | $32,45 \pm 3,87$ |
| III серия          | зрелые  | $0,736 \pm 0,014$          | $23,78 \pm 0,37$ | $28,27 \pm 1,68$          | $11,95 \pm 0,42$ | $38,73 \pm 2,78$ |
|                    | старые  | $0,676 \pm 0,015$          | $21,2 \pm 0,65$  | $33,76 \pm 1,32$          | $14,17 \pm 0,63$ | $34,35 \pm 4,57$ |



**Рис. 3.** Интерфейс «Микрон-гамма» с диаграммами внедрения индентора в кость

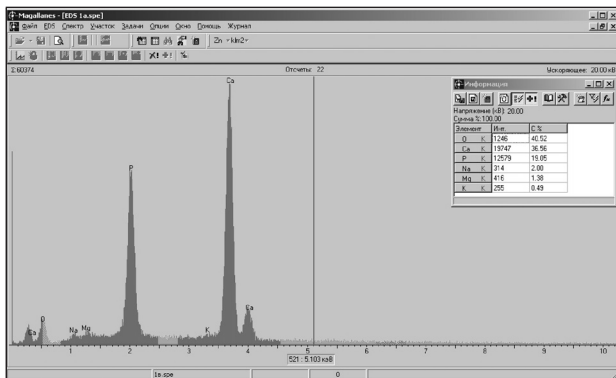
уменьшились на 19,09% ( $P < 0,001$ ) и 16,01% ( $P < 0,001$ ) соответственно в первом случае и на 19,14% ( $P < 0,001$ ) и 18,37% ( $P < 0,01$ ) во втором по сравнению с контролем.

### Выводы и перспективы дальнейших исследований

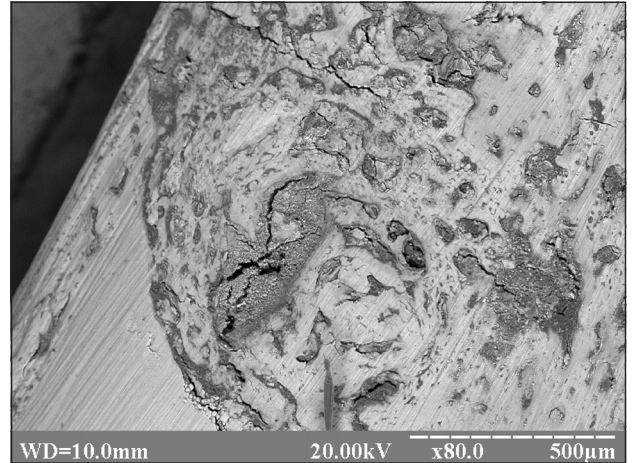
Нарушение микроэлементного баланса организма вследствие поступления повышенного количества солей тяжелых металлов, которые определяются в воде и почве Сумской области, привело к снижению твердости и жесткости регенерата костей в области перелома.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о разнице твердости и жесткости регенерата большеберцовых костей крыс, которые были связаны с его химическим составом, возрастом животных и с серией эксперимента.

Использование метода кинетического индентирования и рентгеновского микроанализа дало возможность определить зависимость твердости и жесткости регенерата поврежденных костей от со-



**Рис. 5.** Спектр остеотропных элементов, полученный методом рентгеновского микроанализа большеберцовой кости на 24-е сутки после перелома



**Рис. 4.** Электронная сканограмма регенерата большеберцовой кости зрелой крысы III серии на 24 сутки после перелома. Ув. x80

держания в них остеотропных макроэлементов.

Несмотря на преобладание остеотропных элементов, в костях старых животных отмечен меньший показатель твердости и жесткости. Очевидно, в возрастном снижении биомеханических показателей регенерата костей важную роль играют не только неорганические компоненты, но и другие фазы кости и их взаимосвязь.

В будущем планируется проведение коррекции выявленных изменений негативного влияния солей тяжелых металлов на биомеханические показатели регенерата костей лекарственным препаратом-корректором.

### Литература

1. Актуальные проблемы теоретической и клинической ортоаурологии [Текст] / Ю.И. Денисов-Никольский, С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, И.В. Матвейчук. — М.: ОАО «Типография «Новости», 2005. — 336 с.
2. Боярская Ю.С. Физика процессов микроиндентирования [Текст] / Ю.С. Боярская, Д.З. Грабко, М.С. Кац. — Кишинев: Штиинца, 1986. — 256 с.
3. Булычев С.И. Испытание материалов непрерывным вдавлением индентора [Текст] / С.И. Булычев, В.П. Алехин. — М.: Машиностроение, 1990. — 224 с.
4. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Сумській області у 2006 році [Текст]. — Суми: Вид-во «Джерело», 2007. — С. 8–21.
5. Игнатович С.Р. Определение микромеханических характеристик поверхности материалов с использованием наноиндентомера «Микрон-гамма» [Текст] / С.Р. Игнатович, И.М. Закиев, В.И. Закиев // Вестник ХНАДУ: сб. науч. тр. — 2008. — № 42. — С. 86–89.
6. Колмаков А.Г. Методы измерения твердости [Текст] / А.Г. Колмаков, В.Ф. Тереньев, М.Б. Бакиров. — М.: «Интернет Инжиниринг», 2005. — 150 с.
7. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации [Текст] / Н.А. Корж, Н.В. Дедух // Ортопед. травматол. — 2006. — № 1. — С. 76–84.
8. Мазо В.К. Новые пищевые источники эссенциальных микроэлементов — антиоксидантов [Текст] / В.К. Мазо, И.В. Гмошинский, Л.И. Ширина. — М.: Миклош, 2009. — 208 с.

9. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология [Текст] / А.П. Авцын, А.А. Жворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова. — М.: Медицина, 1991. — 456 с.
10. Новые пищевые источники эссенциальных микроэлементов [Текст] / В.К. Мазко, С.Н. Зорин, И.В. Гмошинский и др. // Вопросы детской диетологии. — 2004. — Т. 2, № 3. — С. 9–11.
11. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека [Текст] / А.В. Скальный. — М.: Оникс XXI век, Мир, 2004. — 216 с.
12. Современные возможности оптимизации репаративной регенерации костной ткани [Текст] / Н.П. Омеляненко, С.П. Миронов, Ю.И. Денисов-Никольский и др. // Вест. травматол. и ортопед. им. Н.Н. Приорова. — 2002. — № 4. — С. 85–88.
13. Сопротивление материалов: учебное пособие [Текст] / Н.А. Костенко, С.В. Баясникова, Ю.Э. Волошановская и др.; под ред. Н.А. Костенко. — [3-е изд.]. — М.: Высшая школа, 2007. — 488 с.
14. Пат. 30003 Україна, G01N 3/40. Прилад для випробування матеріалів на мікротвердість / Ігнатів С.Р., Заків І.М., Заків В.І., Дворник Є.П.; заявник і патентовласник Київський аерокосмічний інститут національного авіаційного університету. — № 200709512 ; заявл. 21.08.2007 ; опубл. 11.02.2008, Бюл. № 3.
15. Рустембекова С.А. Микроэлементозы и факторы экологического риска (для практикующих врачей) [Текст] / С.А. Рустембекова, Т.А. Барабошкина. — М.: Логос, 2006. — 112 с.
16. Фирстов С.А. Размерный эффект при микро/нано — индентировании и его компенсация с учетом особенности начального контакта [Текст] / С.А. Фирстов, С.Р. Игнатович, И.М. Закиев // Пробл. прочности. — 2009. — № 2. — С. 43–54.
17. Anisotropic properties of human tibial cortical bone as measured by nanoindentation [Text] / Z. Fan, J.G. Swadener, J.Y. Rho et al. // J. Orthopaed. Res. — 2002. — Vol. 20, N 4. — P. 806–810.
18. Dental resin composites containing silica-fused whiskers-effects of whisker-to-silica ratio on fracture toughness and indentation properties [Text] / H.K. Xu, J.B. Quinn, D.T. Smith et al. // Biomaterials. — 2002. — N 23. — P. 735–742.
19. Nanoindentation as a means for distinguishing clinical type of osteogenesis imperfecta [Text] / Z.F. Fana, P. Smithb, F. Rauchc, G.F. Harris // Composites Part B: Engineering. — 2007. — Vol. 38, Issue 3. — P. 411–415.
20. King R.B. Elastic analysis of some punch problems for a layered medium [Text] / R.B. King // Int. J. Sol. Struct. — 1987. — Vol. 23, N 12. — P. 1657–1664.
21. Loubet J.L. Vickers Indentation Curves of Elasto-Plastic Materials [Text] / J.L. Loubet, J.M. Georges, G. Meille // ASTM STP 889, Microindentation Techniques in Materials Science and Engineering: eds. P.J. Blau, B.R. Lawn. — West Conshohocken PA: ASTM Internat., 1986. — P. 72–89.
22. Newey D. An ultra-low-load penetration hardness tester [Text] / D. Newey, M.A. Wilkins, H.M. Pollock // J. Phys. E—Sci. Instrum. — 1982. — Vol. 15, N 1. — P. 119–122.
23. Oliver W.C. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation measurements [Text] / W.C. Oliver, G.M. Pharr // J. Mater. Res. — 1992. — Vol. 7, N 6. — P. 1564–1583.
24. Pharr G.M. On the generality of the relationship among contact stiffness, contact area, and elastic modulus during indentation [Text] / G.M. Pharr, W.C. Oliver, F.R. Brotzen // J. Mater. Res. — 1992. — Vol. 7, N 3. — P. 613–617.

Статья поступила в редакцию 23.12.2009 г.