

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Journal of Medicine
Has been issued since 2013.

ISSN: 2308-6513

E-ISSN: 2310-3434

Vol. 4, No. 2, pp. 57-64, 2014

DOI: 10.13187/issn.2308-6513

www.ejournal5.com

UDC 616

Growth and Microhardness of the Rat's Tibia in Different Ages after Fracture Modeling

Andrii N. Bushtruk

Sumy State University, Ukraine
40007, Sumy, R-Korsakova St., 2
PhD Student
E-mail: buzina76@mail.ru

Abstract. Bone injury is a powerful factor that leads to remodeling of the entire organ. When this change rate adjustment processes dependent on many factors including the age. There is strong evidence of changes in the skeleton of a young, mature and old age in terms of long bone injuries. But it is poorly understood changes in other age periods.

The aim of our work was to study bone growth and bone microhardness after defect modeling of the tibia in animals of different age periods.

Under sterile operating was applied defect of medial surface of the body with the middle third of the tibia. After 10, 15 and 24 days after defect application were study osteometric parameters and bone microhardness.

Tibia injury leads to disruption of the longitudinal growth processes in animals of young and adult ages, which is probably due to dysfunction of the epiphyseal growth plate. Also seen the development of periosteal reaction, which is accompanied by changes in the transverse dimensions of the bone. In animals of presenile and senile ages were not observe changes of bone growth parameters.

Microhardness bone tends to lower in animals of all ages. While in rats of young and adult ages observed normalization of this parameter to the 24 day, in animals of presenile and senile age there is a decrease of microhardness, which is a risk factor for recurrent fractures.

Keywords: bone; reparative osteogenesis; age; osteometriya; microhardness.

Введение. Скелет является важной составляющей организма как в метаболическом, так и в биомеханическом плане. Костная ткань относится к соединительной ткани и отличается от последней меньшей ригидностью и большей механической стойкостью [1]. Данные характеристики кости обеспечиваются за счет импрегнации коллагенового матрикса минеральными солями и зависят от функционирования неколлагеновых протеинов [2]. Благодаря высокой прочности кости скелета обеспечивают поддержку тела в пространстве и его форму, защищают мягкие ткани от механических повреждений и является вместилищем красного костного мозга. Минеральный компонент скелета служит резервуаром макро- и микроэлементов, которые в случае необходимости поступают в кровоток для обеспечения постоянства ионного состава. При этом благодаря процессам ремоделирования, кость является самовозобновляющейся

системой, меняет форму, массу и биомеханические свойства в соответствии с внешними механическим нагрузкам в течение всего периода жизни [3].

Травма кости является мощным фактором, который приводит к ремоделированию всего органа. При этом степень изменения процессов перестройки зависит от многих факторов, в том числе и от возраста. Имеются убедительные данные об изменениях в скелете в молодом, зрелом и старческом возрасте в условиях травмы длинных костей [4, 5]. При этом недостаточно изучены изменения в другие возрастные периоды.

Поэтому **целью** нашей работы было изучение роста кости и микротвердости костной ткани после моделирования дырчатого дефекта большеберцовой кости у животных различных возрастных периодов.

Материалы и методы исследования. Изучение особенностей механических параметров было проведено на 168 белых лабораторных крысах самцах 7 возрастных групп – подсосного возраста (15 дней), инфантильного (30 дней), ювенильного (80 дней), молодого (210 дней), зрелого возраста (435 дней), предстарческого (630 дней) и старческого возраста (810 дней).

Все животные были разделены на 2 серии – контрольную и экспериментальную. Контрольную серию животных составили интактные крысы 7 возрастных групп по 6 животных в каждой.

Животным экспериментальной серии (126 крыс) в условиях стерильной операционной наносился дырчатый дефект с медиальной поверхности тела средней трети большеберцовой кости. Травма была выполнена в месте, где отсутствуют мышцы и магистральные сосуды, для уменьшения общего травматизма. Дефект наносился стоматологическим бором диаметром от 1 до 2 мм в зависимости от возраста под наркотановым ингаляционным наркозом с использованием наркозного аппарата. Операционную рану зашивали, животных выводили из наркоза и удерживали в стационарных условиях вивария.

Крыс экспериментальной серии выводили из эксперимента через 10, 15 и 24 суток после перелома

Для изучения особенностей биомеханических и ростовых параметров костей скелета в возрастном аспекте использовали следующие методы исследования:

1. Остеометрия.

Кости взвешивали на аналитических весах с точностью до 1 мг и измеряли штангенциркулем с точностью до 0,1 мм. Определение остеометрических параметров плечевой кости проводили по следующим показателям: наибольшая длина кости, наибольшая ширина проксимального и дистального эпифизов, наибольшая ширина и передне-задний размер середины диафиза.

2. Определение микротвердости кости.

Изучение микротвердости проводили на приборе ПМТ-3 в середине дефекта и на расстоянии в 10 мм от него. Перед проведением исследования поверхность кости зашлифовывали и фиксировали образец на металлическом столике с помощью эпоксидных смол. Для определения микротвердости в исследуемый образец под действием нагрузки Р вдавливали алмазную пирамиду. В наших опытах величина нагрузки составила 0,1 кгс. После действия нагрузки на поверхности образца остается отпечаток в виде пирамиды с квадратным основанием [6]. Для определения числа твердости Н (кгс/мм²) нагрузку Р делят на условную площадь боковой поверхности отпечатка:

$$HV = 18544 \left(\frac{P}{d^2} \right),$$

где Р - нагрузка на пирамиду;

d - диагональ отпечатка.

Результаты и их обсуждение. По данным отечественных и зарубежных ученых, процессы репаративной регенерации дырчатого дефекта у лабораторных животных происходит за счет формирования интрамембранозной модели без формирования хряща и завершаются в период от 24 до 30 дней в зависимости от возраста [7]. Учитывая данные литературы, мы можем утверждать, что через 10 дней после травмы происходит формирование тканеспецифических структур с формированием коллагенового каркаса через 15 дней и его кальцификацией и началом перестройки через 24 суток [3].

Анализируя показатели остеометрии большеберцовой кости животных разного возраста после нанесения травмы отмечается изменение показателей продольного и поперечного роста. Как видно из графика (рис. 1), длина кости через 10 дней после травмы достоверно уменьшается у животных подсосного, инфантильного, ювенильного и молодого возраста. Разница с контролем составляет от 7,98% ($p \leq 0,05$) у животных молодого возраста до 9,45% ($p \leq 0,05$) у крыс ювенильного возраста. Уменьшение разницы с контролем происходит за счет задержки продольного роста, морфологическим субстратом которого является эпифизарная пластинка, расположенная между проксимальным эпифизом и диафизом большеберцовой кости. Травма приводит к высвобождению целого ряда биологически активных соединений – простагландинов, костных морфогенетических белков, медиаторов воспаления, которые способны влиять на пролиферативную активность клеток эпифизарного хряща и вызвать задержку роста [4]. Несмотря на наличие постоянного роста костей крыс [8], он замедляется у животных зрелого возраста и почти прерывается у животных предстарческого и старческого возраста. Это связано с уменьшением пролиферативной активности клеток ростового хряща, которые также становятся менее чувствительными к воздействию внешних и внутренних факторов влияния. В нашем исследовании мы наблюдаем отсутствие достоверной разницы с контролем для показателя продольного роста у животных зрелого и последующих возрастных периодов, что подтверждает сведения об уменьшении пролиферативной активности хондроцитов эпифизарной пластинки роста.

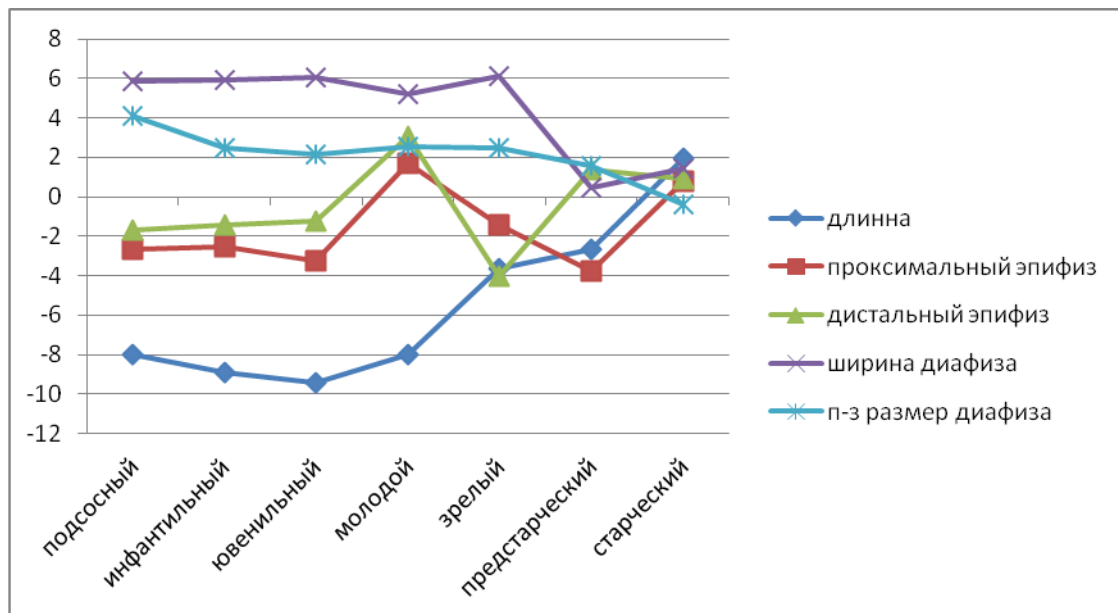


Рис. 1. Изменения остеометрических показателей большеберцовой кости животных разных возрастных групп через 10 дней после нанесения травмы

Кроме изменений процессов продольного роста отмечается нарушение показателей поперечных размеров диафиза. В эксперименте происходило нанесение дефекта с медиальной поверхности кости, поэтому основные изменения касаются показателей ширины органа. При этом отсутствуют достоверные изменения передне-заднего размера кости. Изменения ширины диафиза наблюдаются в диапазоне от 5,18% ($p \leq 0,05$) у животных молодого возраста до 6,09% ($p \leq 0,05$) - у крыс зрелого возраста. У животных предстарческого и старческого возраста не наблюдается изменений указанного показателя. Одним из возможных механизмов изменения ширины диафиза кости является развитие периостальной реакции. После нанесения перелома происходит активизация остеобластов, которые находятся под надкостницей и не выполняют синтетической функции в состоянии покоя [9]. После перелома за счет механической стимуляции и влияния медиаторов воспаления происходит их миграция в зону повреждения [3]. Кроме этого данные клетки приобретают способность синтезировать внеклеточный матрикс, что приводит к

активизации процессов аппозиционного роста и увеличение поперечных размеров диафиза. С возрастом происходит уменьшение пула остеобластических клеток надкостницы [8], что возможно является фактором отсутствия периостальной реакции у животных данной возрастной группы.

Ширина проксимального и дистального эпифизов на протяжении всех сроков наблюдения у животных разного возраста не меняется, что свидетельствует об отсутствии влияния травмы на показатели поперечного роста в отдаленных участках кости.

Через 15 дней наблюдения происходит уменьшение разницы с контролем для показателей продольного роста (рис. 2). Однако динамика является недостоверной, что позволяет говорить лишь о тенденции к восстановлению эпифизарного роста кости. У животных предстарческого и старческого возраста не происходит изменений длины кости.

У животных подсосных возраста происходит достоверное уменьшение ширины диафиза большеберцовой кости по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, что может свидетельствовать о высоком потенциале процессов ремоделирования. У животных всех других возрастных групп не происходит уменьшение ширины диафиза, что свидетельствует о выраженной периостальной реакции и меньшую выраженность процессов ремоделирования костной ткани. Как и в предыдущем сроке наблюдения не происходит достоверных изменений ширины передне-заднего размера диафиза и поперечных размеров эпифизов большеберцовой кости.

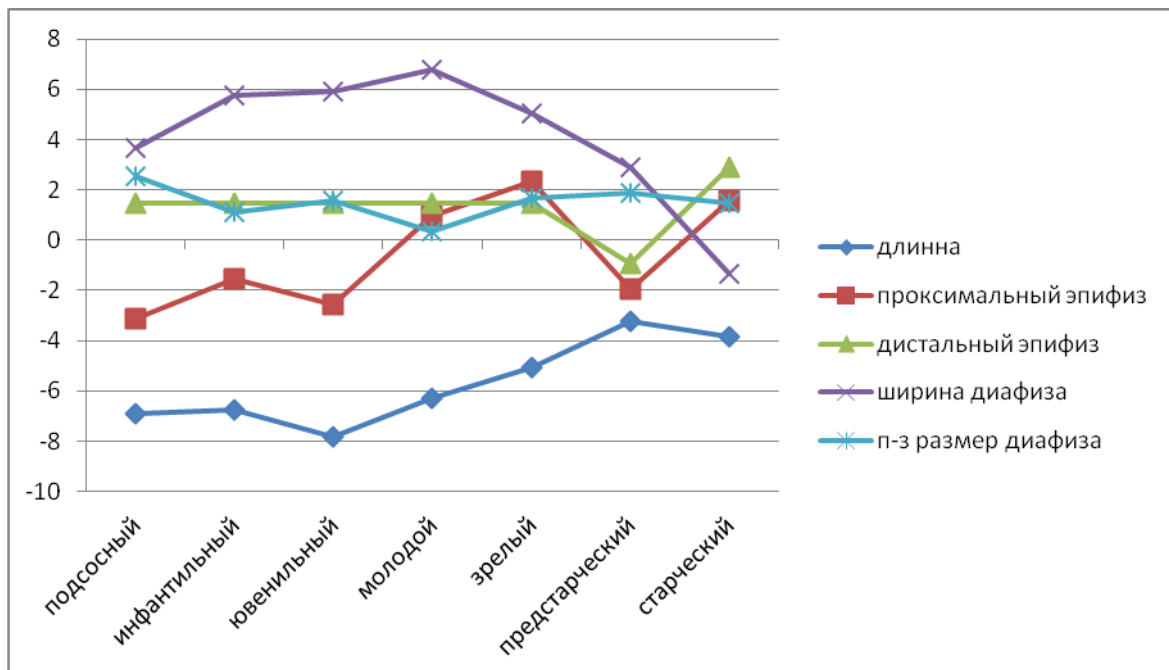


Рис. 2. Изменения остеометричных показателей большеберцовой кости животных разных возрастных групп через 15 дней после нанесения травмы

Через 24 дня после нанесения дефекта у животных подсосного возраста происходит активизация процессов продольного роста в травмированной кости (рис. 3). Разница с контролем является недостоверной и составляет лишь 2,93 % ($p \geq 0,05$). Хондроциты эпифизарного хряща животных данной группы имеют высокую пролиферативную активность и значительный потенциал регенерации, поэтому в течение 24 суток возможно их восстановление, что приводит к нормализации процессов продольного роста. У животных инфантильного, ювенильного и молодого возраста наблюдается тенденция к улучшению ростовых процессов, однако разница с контролем для длины кости является достоверной. Таким образом, задержка роста кости, вызванной ее травмой, остается значимой даже в условиях формирования костного регенерата.

В срок 24 суток после травмы происходит начало перестройки сформированного костного регенерата в соответствии с нагрузкой на конкретную кость. Таким образом, в настоящее время активизируются процессы остеокластической резорбции, направленные в

том числе и на элиминацию избыточной костной ткани [9]. Активизация этих процессов приводит к уменьшению поперечного размера кости у животных инфантильного, ювенильного и молодого возраста и отсутствия достоверной разницы с контролем.

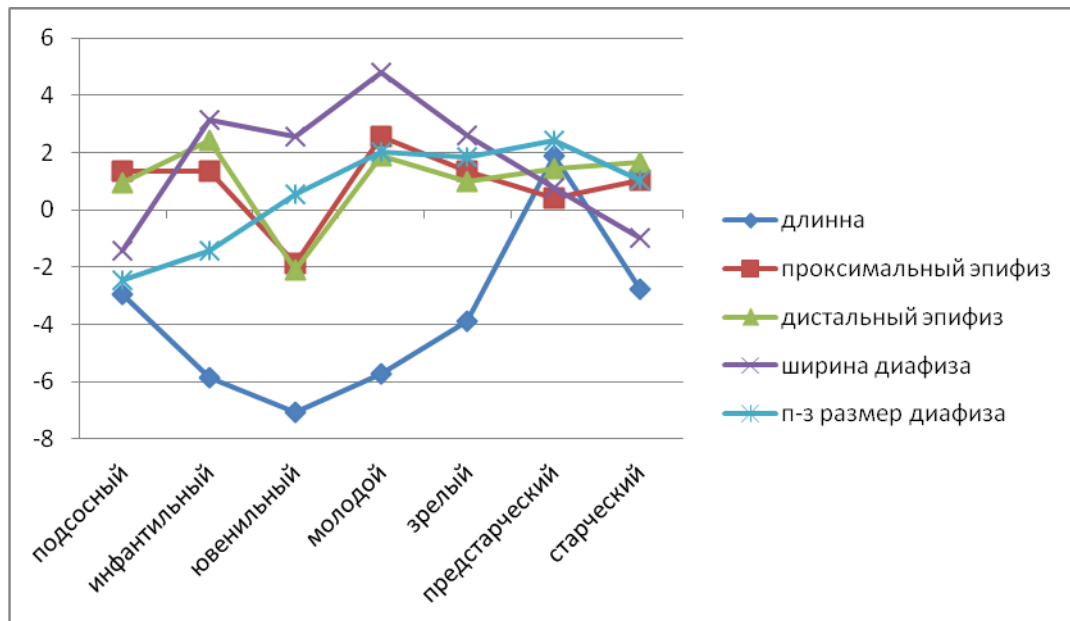


Рис. 3. Изменения остеометрических показателей большеберцовой кости животных разных возрастных групп через 24 дня после нанесения травмы

Показатель микротвердости предоставляет информацию о качестве костной ткани, которая имеет прямую зависимость как от ультраструктурного строения, так и от макроорганизации кости. Качество костной ткани обеспечивается в первую очередь за счет строения кристаллической фазы – ее соотношение с аморфной и от строения кристаллитов гидроксиапатита [10]. Большое значение в формировании качества кости также качество ее органической составляющей, в первую очередь коллагеновых волокон. Повреждения кости инициирует активацию процессов ремоделирования всей кости, что приводит к изменениям параметров микротвердости во все возрастные периоды. У животных контрольной серии наблюдается рост микротвердости с максимумом в зрелом возрасте и ее уменьшение у крыс старческого возраста, колеблясь при этом в диапазоне от 121,49 до 183,02 кг/см².

Травма большеберцовой кости приводит к уменьшению показателя микротвердости костной ткани. У крыс подростного и молодого возраста наблюдается наименьшая разница с контролем, которая составляет 8,97 % ($p \leq 0,05$) и 9,11 % ($p \leq 0,05$) соответственно. У животных инфантильного, ювенильного, зрелого и предстарческого возраста число твердости уменьшается в диапазоне от 10,75 % ($p \leq 0,05$) до 12,45 % ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о наличии относительного равновесия между процессами резорбции и синтеза костной ткани в процессе ремоделирования. «Качество костной ткани» находится в пределах физиологических отклонений и может быть восстановлено в среднесрочной перспективе. При этом у животных старческого возраста происходит критическое уменьшение показателя твердости костной ткани, который является меньше контроля на 16,75 % ($p \leq 0,05$).

Через 15 и 24 суток после травмы не наблюдается дальнейшей потери «качества костной ткани» у животных от подростного до зрелого возраста, однако микротвердость кости не восстанавливается (рис. 4). В течение всего репаративного остеогенеза происходят системные изменения в травмированном органе, что приводит к его перестройки на микроскопическом уровне [3]. При этом полное восстановление строения кости в соответствии с физиологическими нагрузками, которые действуют на орган, может завершаться в срок от 6 месяцев до 1,5 года. Отсутствие негативной динамики изменений микротвердости у животных указанных возрастных групп свидетельствует о равновесии в процессе ремоделирования травмированного органа.

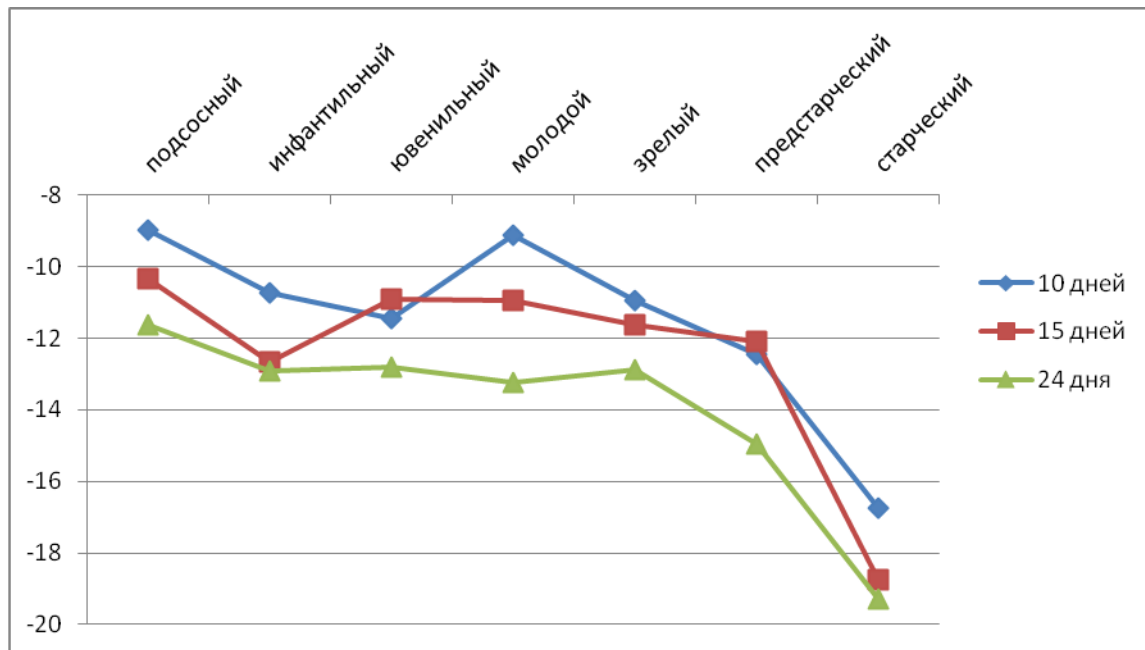


Рис. 4. Изменения числа твердости костной ткани большеберцовой кости животных разных возрастных групп в эксперименте

При этом у животных предстарческого возраста через 24 суток после травмы происходит рост разницы с контролем до 14,97 % ($p \leq 0,05$), что свидетельствует об ухудшении микроскопического строения костной тканей. Уменьшение микротвердости у животных старческого возраста фиксируется в течение 15 и 24 суток после травмы. Механическое повреждение кости запускает процессы ремоделирования, однако, как известно, у особей старческого возраста процессы резорбции преобладают над синтезом [11, 14], что является одним из механизмов развития сенильного остеопороза. Таким образом, травма является пусковым механизмом ремоделирования, а физиологическое преимущество остеокластов резорбции приводит к ухудшению «качества костной ткани» у животных предстарческого и старческого возраста. Низкий уровень физической активности обуславливает недостаточную стимуляцию ОБ и снижает интенсивность процессов костеобразования [15, 16]. Так, доказано, что механическая стимуляция непосредственно активирует ионные каналы клеток зоны регенерата и запускает каскад реакций, связанных с синтезом веществ внеклеточного матрикса [12].

Другой возрастной особенностью метаболизма костной ткани является снижение синтеза коллагена и неколлагеновых костных протеинов. Нарушается также процесс формообразования коллагеновых волокон в межклеточном веществе кости. Уменьшается биосинтез и изменяется соотношение протеогликанов, а также кристаллическая и аморфная фазы минерального компонента, что не может не отражаться на скорости остеорепаляции [4]. Происходит снижение биохимических маркеров костного метаболизма в крови – Gla-белка и щелочной фосфатазы, играющих значительную роль в минерализации кости. Также возможно замедление ремоделирования в связи со снижением активности генов в клетках регенерата у лиц пожилого возраста (13). Таким образом, совокупность ряда факторов у животных предстарческого и старческого возраста приводит к снижению числа твердости до 24 суток наблюдения и может привести к повторным переломам.

Выводы.

1. Травма большеберцовой кости приводит к нарушению процессов продольного роста у животных молодого и зрелого возраста, что возможно связано с нарушением функционирования эпифизарной пластинки роста. Также наблюдается развитие периостальной реакции, что сопровождается изменениями поперечных размеров кости. У животных предстарческого и старческого возраста не наблюдается изменений параметров роста кости.

2. Микротвердость костной ткани имеет тенденцию к снижению у животных всех возрастных групп. При этом у крыс молодого и зрелого возраста наблюдается нормализация данного параметра к 24 дню наблюдения, в то время как у животных предстарческого и старческого возрастов происходит снижение микротвердости, что является фактором риска развития повторных переломов.

References:

1. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts / F. Shapiro / *Eur Cell Mater.* 2008. Vol. 15. P. 53-76.
2. Bone morphogenetic proteins/ Towler Dwight / *Blood.* 2009. Vol. 114(10). P. 2012-2013.
3. A review of fracture healing/ Webb J.C.J., Tricker J. / *Current Orthopaedics.* 2000. Vol. 14. P. 457-463.
4. The effect of age on gene expression in adult and juvenile rats following femoral fracture / B.J. Desai, M.H. Meyer, S. Porter [et all] / *J. Orthop. Trauma.* 2003. Vol. 17. P. 689-698.
5. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone/ J. Y.Rho, L.Kuhn-Spearing, P.Zioupou / *Med. Eng. Phys.* 1998. Vol.20. P. 92-102.
6. Stephen C. C. Bone mechanics handbook / C.C. Stephen. / *Informa Health Care.* 2001. 980 p.
7. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method / S.N. Danilchenko, O.V. Kalinkevich, M.V. Pogorelov [et. all] / *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2011. Vol. 96A, № 4. P. 639 – 647
8. Age variations in the properties of human tibial trabecular bone and cartilage/ Ding M./ *Acta Othop. Scand.* 2000. Vol.29. P. 1-45.
9. The cell biology of osteoclast function / H.K. Vaananen, H. Zhao, M. Mulari, J.M. Halleen / *J. Cell. Sci.* 2000. №3. P. 377-381.
10. Mechanical testing of bone and the bone-implant interface / Yuehuei H. An, Robert A./ *Draughn.* CRC Press. 2000. 624 p.
11. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response / Bignon, A., Chouteau, J., Chevalier, J. / *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003. Vol. 14(3). P. 1089-1097.
12. Mechanical stimulation alters tissue differentiation and molecular expression during bone healing / Palomares Kristy T. Salisbury, Gleason Ryan E., Mason Zachary D. [et all] / *J Orthop Res.* 2009. Vol. 27(9). P. 1123-1132.
13. Perspective: On our age-related bone loss: Insights from a new paradigm / H.M. Frost / *J Bone Miner Res.* 1997. Vol. 12. P. 1539-1546.
14. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications / H.M. Frost / *Anat Rec.* 2001. Vol. 262. P. 398-419.
15. Perspectives: The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis / H.M. Frost / *J Bone Miner Res.* 1992. Vol. 7. P. 253-261.
16. Perspective: Some roles of mechanical usage, muscle strength, and the mechanical in skeleton physiology, disease, and research / H.M. Frost, J.L. Ferretti, W.S.S. Jee / *Calcif. Tissue Int.* 1998. Vol. 62. P. 1-7.

УДК 616

Параметры роста и микротвердости большеберцовых костей крыс различного возраста после нанесения перелома

Андрей Николаевич Буштрук

Сумский государственный университет, Украина
40007, Сумы, ул. Р-Корсакова, 2
Аспирант
E-mail: buzina76@mail.ru

Аннотация. Травма кости является мощным фактором, который приводит к стимуляции ремоделирования всего органа. Скорость и направленность процессов ремоделирования зависит от многих факторов, включая возраст. Существуют убедительные доказательства изменений параметром роста и микротвердости скелета животных молодого, зрелого и старческого возраста при повреждении кости. В то же время недостаточно изучены изменения данных параметров в других возрастных периодах.

Целью нашей работы было изучение роста кости и микротвердости костной ткани после моделирования дырчатого дефекта большеберцовой кости у животных различных возрастных периодов.

В условиях стерильной операционной наносился дырчатый дефект с медиальной поверхности тела средней трети большеберцовой кости. Через 10, 15 и 24 дня после нанесения дефекта были исследованы параметры роста и микротвердости исследуемых костей.

Травма большеберцовой кости приводит к нарушению процессов продольного роста у животных молодого и зрелого возраста, что возможно связано с нарушением функционирования эпифизарной пластинки роста. Также наблюдается развитие периостальной реакции, что сопровождается изменениями поперечных размеров кости. У животных предстарческого и старческого возраста не наблюдается изменений параметров роста кости.

Микротвердость костной ткани имеет тенденцию к снижению у животных всех возрастных групп. При этом у крыс молодого и зрелого возраста наблюдается нормализация данного параметра к 24 дню наблюдения, в то время как у животных предстарческого и старческого возрастов происходит снижение микротвердости, что является фактором риска развития повторных переломов.

Ключевые слова: кость; репаративный остеогенез; возраст; остеометрия; микротвердость.