

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 57.01:591.471.35:616.379-008.64-092.9

doi: 10.19163/1994-9480-2021-4(80)-120-123

ВЛИЯНИЕ НАНЕСЕНИЯ ДЕФЕКТА БОЛЬШЕБЕРЦОВЫХ КОСТЕЙ ЮВЕНИЛЬНЫМ БЕЛЫМ КРЫСАМ С СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ НА НАНОСТРУКТУРУ БИОМИНЕРАЛА ТАЗОВОЙ КОСТИ

Владислав Игоревич Лузин^{1✉}, *Александр Владимирович Торба*²

^{1,2} Луганский государственный медицинский университет имени Святого Луки, Луганск, Луганская Народная Республика

¹ vladyslav_luzin@mail.ru ✉

² alexandr_v_torba@mail.ru

Аннотация. В эксперименте на 140 ювенильных крысах изучены изменения наноструктуры биоминерала тазовой кости (БМТК) после хирургической перфорации большеберцовых костей (ХПБК) при стрептозотоцин-индуцированном диабете (СИД). Установили, что ХПБК сопровождается дестабилизацией кристаллитов и снижением упорядоченности кристаллической решетки БМТК с наибольшими проявлениями к 30-м суткам после операции. При СИД наблюдаются аналогичные изменения, нарастающие с увеличением длительности эксперимента, к 90-м суткам размеры кристаллитов превышают значения контроля на 7,80 %, а коэффициент микротекстурирования снижается на 8,34 %. ХПБК у крыс с СИД приводит к усугублению нарушений наноструктуры БМТК с 60-х суток после операции; к 90-м суткам размеры кристаллитов превышают показатели группы ХПБК на 3,75 %, а коэффициент микротекстурирования снижается на 5,73 %.

Ключевые слова: крысы, стрептозотоцин-индуцированный диабет, повреждение кости, костный биоминерал, наноструктура

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

THE EFFECTS OF TIBIA FRACTURE ON NANOSTRUCTURE OF BONE MINERAL OF THE HIPBONE IN DIABETIC JUVENILE RATS

Vladislav I. Luzin^{1✉}, *Alexander V. Torba*²

^{1,2} Lugansk State Medical University named after St. Luke, Lugansk, Luhansk People's Republic

¹ vladyslav_luzin@mail.ru ✉

² alexandr_v_torba@mail.ru

Abstract. In the study in 140 juvenile rats we tested changes of nanostructure of bone mineral of the hipbone after fracture of the tibia in diabetic juvenile rats. We found out that fracture of the tibia results in instability of crystallites and derangement of crystal lattice of bone mineral. Manifestations peak here was registered on the 30th day of observation. Diabetes produces similar effects, which grow with time. By the 90th day crystallites enlarged by 7,80 % and microtexture decreased 8,34 % (both in comparison with the controls). Fracture of the tibia in diabetes results in aggravation of the nanostructure disorders beginning from the 60th day of the experiment. By the 90th day crystallites in this case enlarged by 3,75 % while microtexture coefficient decreased by 5,73 % (in comparison with non-diabetic animals with the tibia fracture).

Keywords: rats, streptozotocin-induced diabetes, bone injury, bone mineral, nanostructure

Глобальная распространенность сахарного диабета (СД) оценивалась в 2,8 % в 2000 г. и, по прогнозам, вырастет до 4,4 % в 2030 г. [1]. Заболеваемость и смертность, связанные с этим заболеванием, ложатся огромным бременем на сектор здравоохранения. СД I типа характеризуется аутоиммунным разрушением панкреатических β -клеток с наличием Т-клеточной реактивности к инсулярным антигенам [2].

При СД II типа основную причинную роль играют генетические факторы и факторы окружающей среды. Существует еще одна подгруппа взрослых пациентов, которые изначально были отнесены к фенотипу СД типа II, но имели положительные аутоантитела к β -клеткам [3]. Эти пациенты составляют 2–12 % всех случаев диабета, и для их описания был использован термин «латентный аутоиммунный диабет

взрослых» (LADA) [4]. LADA обычно диагностируется после 35 лет и его часто ошибочно диагностируют как СД II типа, но в конечном итоге пациенты становятся инсулинозависимыми быстрее.

При всех типах СД развиваются весьма серьезные осложнения, одним из которых является остеопороз, приводящий к значительному увеличению риска переломов [5]. Если при СД I и II типа состояние костной системы с позиций морфологии описано достаточно полно, то при LADA структурно-функциональное состояние скелета практически не изучено.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Установить динамику изменения наноструктуры биологического минерала тазовой кости (БМТК) у ювенильных крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом (СИД) после хирургической перфорации большеберцовых костей (ХПБК).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании было задействовано 140 ювенильных белых крыс, массой при вступлении в эксперимент 135–150 г в возрасте 3 месяцев, находящихся на содержании в виварии «Луганского государственного медицинского университета имени Святого Луки». Животных содержали в условиях 12-часового дневного освещения при температуре 20–22 °С и влажности 60–80 %, и обеспечивали свободный доступ к пище и воде в течение 7 дней перед экспериментом. Крыс случайным образом разделили на четыре группы. Сахарный диабет индуцировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 55 мг/кг, растворенного в 0,1 М цитратном буфере с pH = 4,5 перед манипуляцией, и дозировали из расчета 2 мл/кг (35 крыс, ЮСИД-группа).

Через трое суток после инъекции диабетический статус каждого животного подтверждался путем измерения уровней глюкозы в крови из хвостовой вены, взятой через шесть часов после приема пищи. Уровень глюкозы анализировали с помощью глюкозооксидазного метода [6], используя стандартные наборы реактивов CORMAY LDL DIRECT (Польша), и выражали в ммоль/л сыворотки крови.

В исследование в дальнейшем были включены только крысы с уровнем глюкозы в крови ≥ 12 ммоль/л. ХПБК диаметром 2,0 мм при эфирной анестезии производили в проксимальном метадиафизе большеберцовых костей (35 крыс, ЮХПБК-группа) [7].

Части животных (35 крыс, ЮСИД-ХПБК-группа) перфорацию большеберцовых костей производили после индуцирования сахарного диабета. Контролем служили интактные животные (35 крыс, ЮК-группа).

Точкой отсчета начала эксперимента считали время введения стрептозотоцина, либо ему соответствующее.

Все дифрактограммы были получены с помощью дифрактометра ДРОН-2,0 и гониометрической приставки ГУР-5 с использованием $\text{Cu K}\alpha$ излучения ($\lambda = 0,1542$ нм), никелевого $\text{K}\beta$ -фильтра, с напряжением и силой тока на рентгеновской трубке 30 кВ и 10 мА. Образцы сканировали непрерывно при скорости $0,05^\circ/60$ секунд в диапазоне углов дифракции $3\text{--}37^\circ$ [8].

С учетом межплоскостных расстояний рефлексов L_{002} и L_{202} вычисляли размеры элементарных ячеек биологического минерала тазовых костей, затем, используя уравнение Селякова – Шерера, вычисляли размеры кристаллитов, используя полуширину дифракционного пика, соответствующего рефлексу L_{112} .

Коэффициент микротекстурирования как параметр, характеризующий однородность ориентации кристаллитов в кристаллической решетке, вычисляли как отношение высоты дифракционных пиков L_{002}/L_{202} . Для каждой группы рассчитывались среднее значение и стандартные ошибки, для сравнения между группами использовался двусторонний Т-критерий Стьюдента при уровне значимости $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ЮК-группе в период с 7 по 90 сутки наблюдения размеры элементарных ячеек БМТК вдоль осей **a** и **c** увеличились с $(9,378 \pm 0,004)$ до $(9,385 \pm 0,002) \cdot 10^{-10}$ М и с $(6,842 \pm 0,003)$ до $(6,849 \pm 0,004) \cdot 10^{-10}$ М соответственно (табл.). Соотношение размеров элементарных ячеек **c/a** с увеличением сроков наблюдения практически не изменялось и колебалось в пределах 72,96–72,97 у.е., что свидетельствует о наличии равновесия между процессами кристаллизации и резорбции в БМТК. Рост размеров элементарных ячеек БМТК находил отражение в увеличении размеров кристаллитов – в период наблюдения они увеличились с $(42,29 \pm 0,37)$ до $(44,33 \pm 0,34)$ нм, что свидетельствует об интенсивном их росте. При этом кристаллическая решетка БМТК у животных ЮК-группы в ходе наблюдения упорядочивалась, о чем свидетельствует увеличение коэффициента микротекстурирования с $(0,3875 \pm 0,0049)$ до $(0,4091 \pm 0,0046)$ у.е.

Результаты рентгеноструктурного исследования биоминерала тазовой кости ювенильных белых крыс в зависимости от вида воздействия и длительности эксперимента ($X \pm Sx$)

Группа	Сроки, сут.	Размер элемент. ячейки вдоль оси c , 10^{-10} М	Размер элемент. ячейки вдоль оси a , 10^{-10} М	Размер кристаллитов, нМ	Коэффициент микро-текстурирования, у.е.
ЮК	7	9,378 ± 0,004	6,842 ± 0,003	42,29 ± 0,37	0,3875 ± 0,0049
	15	9,381 ± 0,002	6,844 ± 0,003	42,84 ± 0,37	0,3910 ± 0,0035
	30	9,380 ± 0,002	6,845 ± 0,002	43,19 ± 0,45	0,3973 ± 0,0032
	60	9,384 ± 0,003	6,847 ± 0,002	44,00 ± 0,41	0,4052 ± 0,0051
	90	9,385 ± 0,002	6,849 ± 0,004	44,33 ± 0,34	0,4091 ± 0,0046
ЮХПБК	7	9,388 ± 0,004	6,850 ± 0,003	44,71 ± 0,43*	0,3731 ± 0,0035*
	15	9,394 ± 0,003*	6,856 ± 0,003*	46,17 ± 0,42*	0,3416 ± 0,0042*
	30	9,402 ± 0,003*	6,862 ± 0,002*	46,86 ± 0,40*	0,3405 ± 0,0037*
	60	9,392 ± 0,002*	6,854 ± 0,003	46,51 ± 0,40*	0,3741 ± 0,0042*
	90	9,390 ± 0,003	6,855 ± 0,003	46,52 ± 0,37*	0,4027 ± 0,0043
ЮСИД	7	9,391 ± 0,003*	6,848 ± 0,003	44,35 ± 0,42*	0,3770 ± 0,0037
	15	9,396 ± 0,003*	6,854 ± 0,003*	45,27 ± 0,43*	0,3587 ± 0,0045*
	30	9,398 ± 0,003*	6,859 ± 0,003*	46,27 ± 0,39	0,3547 ± 0,0040*
	60	9,401 ± 0,004*	6,862 ± 0,003*	46,90 ± 0,43*	0,3670 ± 0,0049*
	90	9,405 ± 0,003*	6,865 ± 0,003*	47,79 ± 0,41*	0,3750 ± 0,0033*
ЮСИД-ХПБК	7	9,391 ± 0,002*	6,849 ± 0,004	44,83 ± 0,41*	0,3729 ± 0,0043*
	15	9,383 ± 0,004^	6,859 ± 0,002*	46,45 ± 0,39*	0,3407 ± 0,0043*
	30	9,403 ± 0,003*	6,864 ± 0,003*	47,00 ± 0,42*	0,3364 ± 0,0035*
	60	9,405 ± 0,004*^	6,865 ± 0,003*^	47,07 ± 0,43*	0,3530 ± 0,0046*^
	90	9,406 ± 0,003*^	6,867 ± 0,003*^	48,27 ± 0,45*^	0,3796 ± 0,0042*^

*Статистически значимое отличие от ЮК-группы ($p \leq 0,05$); ^ статистически значимое отличие от ЮХПБК-группы ($p \leq 0,05$).

В БМТК животных с ХПБК размеры элементарных ячеек вдоль оси a с 7-х по 30-е сутки превышали значения ЮК-группы на 0,14; 0,23 и 0,09 %, а размеры вдоль оси c к 7-м и 15-м суткам – на 0,18 и 0,25 %. В результате, размеры кристаллитов с 7-х по 90-е сутки превышали параметры ЮК-группы на 5,73; 7,77; 8,48; 5,72 и 4,95 %, что отражалось в снижении упорядоченности кристаллической решетки: коэффициент микро-текстурирования с 7-х по 60-е сутки был понижен на 3,73; 12,64; 14,30 и 7,68 %.

Из этого следует, что наноструктура БМТК у животных ЮХПБК-группы характеризуется дестабилизацией и снижением упорядоченности кристаллической решетки с наибольшими проявлениями к 30-м суткам после операции и постепенным последующим восстановлением. Это есть отражение реакции организма на ХПБК с задействованием иммунных и метаболических механизмов, направленной на обеспечение процессов остеорепарации. Одним из компонентов данной реакции является и развитие окислительного стресса, приводящего в итоге к увеличению активности резорбтивных процессов и разрушению БМТК [9].

У животных ЮСИД-группы размеры элементарных ячеек БМТК вдоль оси a превосходили значения ЮК-группы с 7-х по 90-е сутки наблюдения на 0,14; 0,16; 0,20 и 0,21 %, а размеры элементарных ячеек вдоль оси c – с 15-х по 90-е сутки на 0,15; 0,21; 0,22; 0,24 %.

Дестабилизация элементарных ячеек БМТК у крыс ЮСИД-группы находила отражение в нарушении процессов кристаллизации: размеры кристаллитов превышали значения ЮК-группы с 7-х по 90-е сутки экспери-

мента на 4,86; 5,68; 7,12; 6,59 и 7,80 % соответственно. В результате нарушалась и упорядоченность кристаллической решетки БМТК – коэффициент микро-текстурирования понижался и был меньше значений ЮК-группы с 15-х по 90-е сутки эксперимента на 8,26; 10,72; 9,42 и 8,34 %.

При СИД наноструктура БМТК у животных ЮХПБК-группы также характеризуется дестабилизацией и снижением упорядоченности кристаллической решетки, нарастающими с увеличением длительности эксперимента.

Доказано, что при СИД из-за гипергликемии и повышенного уровня окислительного стресса повышается уровень конечных продуктов гликирования (КПГл) [1]. КПГл ингибируют дифференцировку остеобластов, что отражается в снижении экспрессии щелочного фосфата и коллагена 1 α 1 и ингибировании образования минерализованного матрикса [3]. Кроме того, КПГл индуцируют апоптоз остеобластов, уменьшая количество остеобластов и нарушая костеобразование [5]. В результате нарушается образование минерального матрикса, что находит отражение в нарушении наноструктуры БМТК.

При ХПБК у ювенильных крыс с СИД изменения наноструктуры БМТК прогрессировали и к 60-м и 90-м суткам после операции размеры элементарных ячеек вдоль осей a и c превышали значения группы с ХПБК на 0,14 и 0,17 % и на 0,17 и 0,18 % соответственно. Также, размеры кристаллитов к 90-м суткам были больше значений ХПБК-группы на 3,75 %, а коэффициент микро-текстурирования к 60-м и 90-м суткам – меньше на 5,65 и 5,73 %.

Перфорация большеберцовых костей у крыс со стрептозотоциновым диабетом приводит к усугублению нарушений наноструктуры биоминерала тазовых костей с 60-х суток после операции; к 90-м суткам размеры кристаллитов превышают показатели группы ХПБК на 3,75 %, а коэффициент микротекстурирования снижается на 5,73 %.

Сочетание ХПБК и СИД приводило к усугублению нарушений наноструктуры БМТК с 60-х суток после операции, а к 90-м суткам эксперимента изменения нарастали. Следует полагать, что при сочетании ХПБК и СИД прогрессирует нарастание уровней КПГл и окислительного стресса, что приводит к более грубым повреждениям в скелете и дестабилизации кристаллической решетки БМТК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У ювенильных белых крыс ХПБК сопровождается дестабилизацией и снижением упорядоченности кристаллической решетки с наибольшими проявлениями к 30-м суткам после операции и постепенным последующим восстановлением. СИД у ювенильных белых крыс сопровождается дестабилизацией и снижением упорядоченности кристаллической решетки с 7-х суток, нарастающими с увеличением длительности эксперимента. Сочетание ХПБК и СИД у ювенильных животных приводит к усугублению нарушений наноструктуры БМТК с 60-х суток после операции, к 90-м суткам эксперимента изменения нарастают.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kanazawa I., Sugimoto T. Diabetes Mellitus-induced Bone Fragility // *Intern. Med.* 2018. № 57 (19). P. 2773–2785.
2. Impact of Type 1 Diabetes Mellitus on Skeletal Integrity and Strength in Adolescents as Assessed by HRpQCT / J. Devaraja, R. Jacques, M. Paggiosi [et al.] // *JBMR Plus.* 2020. № 4 (11). P. e10422.
3. Shah V.N., Carpenter R.D., Ferguson V.L., Schwartz A.V. Bone health in type 1 diabetes // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2018. № 25 (4). P. 231–236.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

В.И. Лузин – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии, Луганский государственный медицинский университет имени Святого Луки, Луганск, Луганская Народная Республика;

А.А. Торба – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой госпитальной хирургии и онкологии, Луганский государственный медицинский университет имени Святого Луки, Луганск, Луганская Народная Республика.

Статья поступила в редакцию 21.09.2021; одобрена после рецензирования 29.10.2021; принята к публикации 15.11.2021.

The authors declare no conflicts of interests.

Information about the authors

V. I. Luzin – doctor of medical science, Professor, head of the Department of human anatomy, operative surgery and topographic anatomy, Lugansk state medical University of St. Luke, Lugansk, Lugansk people's Republic;

A. A. Torba – candidate of medical science, associate Professor, head of Department of hospital surgery and Oncology, Lugansk state medical University named St. Luke, Lugansk, Lugansk people's Republic.

The article was submitted 21.09.2021; approved after reviewing 29.10.2021; accepted for publication 15.11.2021.

4. Laugesen E., Ostergaard J.A., Leslie R.D.G. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty // *Diabet. Med.* 2015. № 32 (7). P. 843–852.

5. Romero-Díaz C., Duarte-Montero D., Gutiérrez-Romero S.A., Mendivil C.O. Diabetes and Bone Fragility // *Diabetes Ther.* 2021. № 12 (1). P. 71–86.

6. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982. 336 с.

7. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В.И. Лузин, Д.В. Ивченко, А.А. Панкратьев [и др.] // *Український медичний альманах.* 2005. № 2 (додаток). С. 162.

8. Миркин Л.И. Рентгеноструктурный анализ. Индексирование рентгенограмм: справочное руководство. М.: Наука, 1981. 496 с.

9. Osipov B., Emami A.J., Christiansen B.A. Systemic Bone Loss After Fracture // *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* 2018. № 16 (4). P. 116–130.

REFERENCES

1. Kanazawa I., Sugimoto T. Diabetes Mellitus-induced Bone Fragility. *Intern. Med.* 2018;57(19):2773–2785.

2. Devaraja J., Jacques R., Paggiosi M. et al. Impact of Type 1 Diabetes Mellitus on Skeletal Integrity and Strength in Adolescents as Assessed by HRpQCT. *JBMR Plus.* 2020;4(11):e10422.

3. Shah V.N., Carpenter R.D., Ferguson V.L., Schwartz A.V. Bone health in type 1 diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2018;25(4):231–236.

4. Laugesen E., Østergaard J.A., Leslie R.D.G. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabet. Med.*, 2015;32(7):843–852.

5. Romero-Díaz C., Duarte-Montero D., Gutiérrez-Romero S.A., Mendivil C.O. Diabetes and Bone Fragility. *Diabetes Ther.* 2021;12(1):71–86.

6. Kolb V.G., Kamyshnikov V.S. Clinical Chemistry Handbook. Minsk: Belarus; 1982. 336 p. (In Russ.).

7. Luzin V.I., Ivchenko D.V., Pankratyev A.A. et al. Technique for modeling a bone defect in laboratory animals. *Ukrainian Medical Almanac.* 2005;2(supp.):162. (In Russ.).

8. Mirkin L.I. Rentgenostruktorny analiz. X-ray analysis. Indexing radiographs: guide. Moscow: Nauka, 1981. 496 p. (In Russ.).

9. Osipov B., Emami A.J., Christiansen B.A. Systemic Bone Loss After Fracture. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* 2018;16(4):116–130.