

**И.Ф.НЕФЕДОВА<sup>1</sup>, С.В.ГЛУШКОВ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Самарский государственный медицинский университет  
Институт экспериментальной медицины и биотехнологий

<sup>2</sup>Самарский государственный аэрокосмический университет  
Кафедра космического машиностроения

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КОСТНОЙ  
ТКАНИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КАЛЬЦИЯ  
ГИДРОКСИАППАТИТА И КАЛЬЦИЯ САНДОЗ  
В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА**

Научный руководитель – профессор Л.Т.Волова

**В данном исследовании продемонстрирован сравнительный анализ состояния костной ткани при использовании кальция гидроксиапатита и кальция Сандоз в условиях экспериментального остеопороза.**

*Ключевые слова: остеопороз, овариоэктомия, костная ткань, механическая прочность, гидроксиапатит.*

**I.F.NEFEDOVA, S.V.GLUSHKOV**

**COMPARATIVE ASSESMENT OF BONE TISSUE CONDITION  
UNDER THE USE OF CALCIUM HYDROXYAPATITE AND  
CALCIUM SANDOZ IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS**

**This study demonstrates a comparative analysis of the bone tissue condition using calcium hydroxyapatite and calcium Sandoz in experimental osteoporosis.**

*Key words: osteoporosis, oophorectomy, bone mechanical strength, hydroxyapatite.*

Остеопороз – заболевание, характеризующееся потерей костной ткани с ухудшением ее микроархитектоники. Данные изменения приводят к хрупкости костной ткани и являются причиной переломов у больных при сравнительно незначительных нагрузках на костную ткань. Регенерационные потенции костной ткани при явлениях остеопороза резко сни-

жены<sup>1</sup>.

В настоящее время продолжается изучение патогенеза этого заболевания, а также поиск эффективных веществ для его коррекции.

В ИЭМБ разработан и запатентован способ получения биологически

---

<sup>1</sup> Let K., Hao Yu the Quality of healing compared between osteoporotic fractures and normal traumatic fracture // In: Qin L., Genant H.K., Griffith J.F., Leung K. S., editors. Advanced bioim aging technologies in assessment of bone quality and forest Materials methods of research and application. – Berlin, Germany: Springer. – 2007. P.531-541.

активного вещества – кальция гидроксиапатита (ГАП) из аллогенных костных тканей, который в свой состав включает кроме кальция и фосфора, ряд микроэлементов и органический компонент - в виде коллагеновых и неколлагеновых белков – регуляторов метаболизма костной ткани<sup>2</sup>.

Моделирование остеопороза на животных является распространенным методом его изучения<sup>3</sup>. Для этой цели используют как мелких грызунов, так и крупных животных (собаки и овцы). Крысы с двусторонней овариэктомией широко используются в качестве модели для имитации потери костной массы у женщин в постменопаузе<sup>4,5</sup>, что открывает возможность для изучения лечебного потенциала ГАП.

Цель исследования: оценить возможности аллогенного гидроксиапатита в сравнении с кальцием Сандоз для коррекции остеопороза, вызванного гипоестрогенным состоянием в эксперименте.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на базе ИЭМБ (директор д.м.н., профессор Л.Т. Волова) СамГМУ (ректор академик РАН, профессор Г.П. Котельников) с соблюдением требований биоэтики. Эксперименты проведены с использованием самок крыс (n=50) стока Sprague Dawley SPF категории

массой 180-200 г., которых содержали в условиях сертифицированного vivария.

Все животные были разделены на 4 группы: первая – ложнооперированные (ЛО), у них (n=10) под общей анестезией (золетил+рометар) произведен стандартный доступ к яичникам с их иммобилизацией без овариэктомии с последующим ушиванием операционной раны. Вторая (ОЭ) – группа животных, у которых произведена овариэктомия (n=10), но на протяжении всего эксперимента не проводилось никакой медикаментозной коррекции состояния. В третьей группе (ОЭ+С) у животных (n=10) была произведена овариэктомия и через 180 суток начато ежедневное введение препарата кальция Сандоз рег ос из расчета 200 мг/кг в течение 90 суток. В четвертой группе (ОЭ+ГАП) крыс (n=10) также была произведена овариэктомия, а через 180 суток начато введение аллогенного гидроксиапатита «Лиопласт» в/м в наружную поверхность бедра из расчета 200 мг/кг в течение 90 суток. С целью создания эктопического депо исследуемого вещества кратность введения составила 1 раз в 2 недели.

Методика получения лабораторных образцов гидроксиапатита (ГАП) заключалась в нейтрализации гидроокисью натрия образующихся после деминерализации костной ткани солянокислых растворов.

Эвтаназию животных производили на 270 сутки от начала эксперимента путем внутрисердечного введения летальной дозы тиопентала натрия. После чего производили взвешивание животных (весы ОНАУС NVL 2101). Во время секционного исследования производили осмотр и выделение

2 Волова Л.Т., Подковкин В.Г. Способ получения аллогенного гидроксиапатита // Патент на изобретение RU 2168998. – 2000.

3 Raisz L.G. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis // *New England Journal of medicine*. –1988. P.818-828.

4 Li X.J., Jee W.S.S., Ke H.Z., Mori S., Akamine T. Age-related changes of cancellous and cortical bone of histomorphometry in female rats Sprague-Dawley // *Cells and materials* (Annex 1); 1991. P. 25-35.

5 Vronsky T.J., Yen C.F. Ovariectomy of rats as an animal model for postmenopausal bone loss // *Cells and materials*. (Annex 1); 1991. P. 69-74.

матки с последующим ее взвешиванием (весы лабораторные ВЛ – 224В). У животных всех групп были выделе-

Относительное содержание кальция в костной ткани определяли путем вычисления соотношения массы

Таблица 1

*Изменения абсолютной и относительной масс  
бедренной кости у крыс в группах*

№	Группы животных	Абсолютная масса нативной бедренной кости, г	Относительная масса нативной бедренной кости, %	Относительное содержание кальция в бедренной кости, %	p
1.	ЛО	1,028	100	36,3	<0,05
2.	ОЭ	0,946	76	36,4	<0,05
3.	ОЭ+С	1,018	79	39,5	<0,05
4.	ОЭ+ГАП	1,220	84	34,6	<0,05

ны бедренные кости с обеих сторон, которые также подвергали взвешиванию с определением абсолютной и относительной массы кости.

Каждую левую бедренную кость фиксировали в нейтральном 12% растворе формалина, декальцинировали по стандартной схеме с использованием раствора трилона Б и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 7 мкм получали с использованием микротомы (МС-2) и окрашивали их гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по Ван Гизон.

Анализ полученных гистологических препаратов производили при помощи системы визуализации на базе микроскопа Olympus VX 41. Морфометрию структур выполняли после получения изображений с использованием программы «Морфология 5.2» (ВидеоТест г. Санкт-Петербург, Россия). При морфометрическом анализе оценивали: высоту суставного хряща, толщину трабекул, относительную плотность костной ткани, относительную плотность остеоцитов.

нативной бедренной кости к массе кости после полной декальцинации.

Правые бедренные кости экспериментальных животных всех групп подвергали механическим испытаниям на четырехточечный изгиб и сдавливание на универсальной испытательной машине (Instron). При этом была изготовлена специальная оснастка, представляющая собой неподвижную опору вверху с регулируемым расстоянием между пластинами и нагружающее устройство с «качающимся» коромыслом. Нагружающее устройство закрепляли в подвижном траверсе испытательной машины. Загружение осуществляли в «жестком» режиме, т.е. с фиксированным шагом перемещений подвижной (верхней) опоры со скоростью 1 мм/мин.

Все полученные экспериментальные данные были проанализированы с помощью описательной статистики с применением программы Статистика 10.0. Для групповых значений определяли средние значения (M) показателей и ошибку среднего (m).

Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производили по двухвыборочному t-тесту Стьюдента. Полученные результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

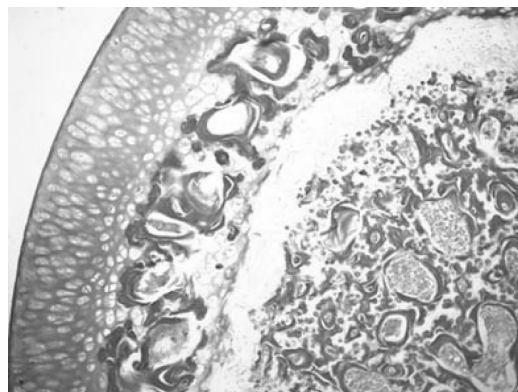
Результаты исследований и их обсуждение. На 270 сутки эксперимента масса тела животных в группе ОЭ увеличилась на 142% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой ЛО. При лечении животных препаратом «кальций Сандоз» увеличение массы составило 136% ( $p < 0,05$ ), а в группе ОЭ+ГАП - 130% ( $p < 0,05$ ).

Изменения со стороны матки были различными и определялись группой наблюдения. Так у ЛО матка представляла собой типичное строение с четким разделением на два рога и нормальным анатомическим положением. Яичники без изменений. В группах ОЭ; ОЭ+С; ОЭ+ГАП матку определяли в виде нитчатой двурогой структуры с признаками выраженной атрофии. В месте ранее выполненной овариоэктомии - выраженное разрастание жировой ткани<sup>6</sup>. Так в группе ЛО средний вес матки составил - 0,907г ( $p < 0,05$ ); у ОЭ - 0,135г ( $p < 0,05$ ); у ОЭ+С - 0,131г ( $p < 0,05$ ); ОЭ+ГАП - 0,119г ( $p < 0,05$ ).

Изменения абсолютной и относительной масс бедренной кости крыс в группах представлено в таблице 1.

При гистологическом исследовании микропрепаратов, полученных из головки бедренной кости ЛО животных отмечали ее нормальную гистологическую структуру. Суставной хрящ

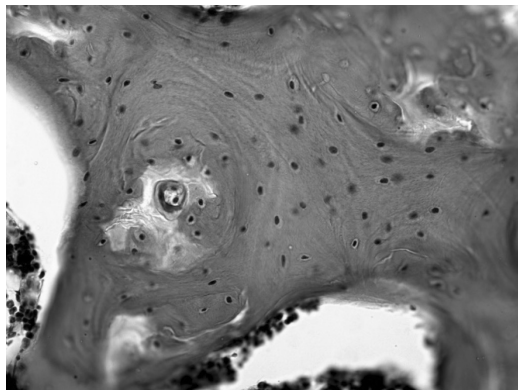
не изменен и имел типичное трехслойное строение. Высота суставного хряща  $275,6 \pm 39,7$ . Трабекулы эпифиза хорошо выражены, не истончены. Средняя толщина трабекул составила  $129 \pm 9,4$  мкм. Относительная плотность костной ткани -  $1059,7 \pm 174$ . Относительная плотность остеоцитов -  $206 \pm 18$ . Эпифизарная пластинка не изменена (рис. 1).



**Рис.1. Структура эпифиза ложно-оперированных животных. Окраска пикрофуксин по Ван Гизон. Ув. 100**

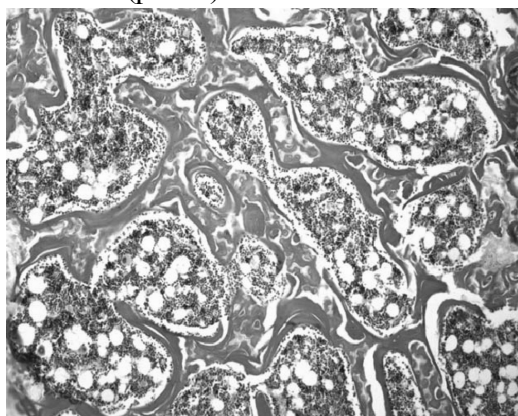
В группе ОЭ животных суставной гиалиновый хрящ истончен, толщина его  $142 \pm 21,3$  мкм. Хондроциты, формирующие его структуру с явлениями выраженной дистрофии. Трабекулы деформированы, утолщены. Средняя толщина трабекул составила  $151 \pm 23$  мкм. Остеоциты в их структуре различные по величине с базофильными ядрами и цитоплазмой. Относительная плотность их составила  $481 \pm 26$  мкм. Гаверсовы каналы резко расширены. Преобладают признаки выраженного остеолитического остеолита. Остеокласты единичные. Межтрабекулярное пространство заполнено костным мозгом, встречаются очаги жировой дегенерации. Относительная плотность костной ткани  $850,3 \pm 33,3$  (рис. 2).

<sup>6</sup> Sinnigen K., Albus E., Thiele S., Grossklaus S., Kurth T., Udey M.C., Chavakis T., Hofbauer L.C., Rauner M. Loss of milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFG-E8) in mice leads to low bone mass and accelerates ovariectomy-associated bone loss by increasing osteoclastogenesis. - Bone, 2015. P.107-114.



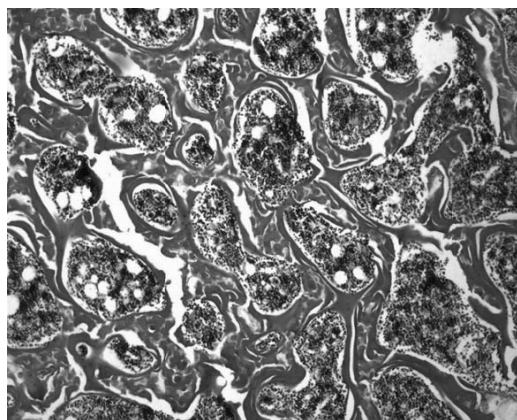
**Рис. 2. Группа ОЭ. Микроструктура Гаверсова канала и морфология остеоцитов. Окраска пикрофуксин по Ван Гизон. Ув. 400**

Гистологическое исследование костной ткани в группе ОЭ+С показало, что гиалиновый хрящ с выраженными признаками дегенеративных изменений, высота его составила  $139+18$  мкм. Толщина трабекул –  $135+24$  мкм. Остеоциты с признаками дистрофии. Относительная плотность остеоцитов –  $436+27$ . Большая часть Гаверсовых каналов по-прежнему остается расширенной. Межтрабекулярные пространства широкие, содержимое их костный мозг с явлениями жировой дегенерации. Относительная плотность костной ткани  $892+111$ . (рис. 3).



**Рис. 3. Группа ОЭ+С. Микроструктура эпифиза крысы после лечения. Окраска пикрофуксин по Ван Гизон. Ув. 100**

Морфологическое исследование в группе ОЭ+ГАП позволило выявить дегенеративные изменения гиалинового хряща, при этом высота его составила  $210+39$  мкм. Толщина трабекул –  $135+33$ . Остеоциты с признаками дистрофии. Относительная плотность остеоцитов –  $405+34$ . Гаверсовы каналы расширены. Межтрабекулярные пространства широкие, содержимое их костный мозг с явлениями очаговой жировой дегенерации. Относительная плотность костной ткани  $989+42$  (рис. 4).



**Рис.4. Группа ОЭ+ГАП. Микроструктура эпифиза крысы после лечения. Окраска пикрофуксин по Ван Гизон. Ув. 100**

Механические показатели костной ткани у животных в исследуемых группах представлены в таблице 2.

Полученные результаты позволили установить, что выполнение овариоэктомии у экспериментальных животных стока Sprague Dawley приводит к развитию остеопороза, способствует увеличению массы тела. Длительное применение препарата кальций Сандоз и аллогенного гидроксиапатита достоверно не влияет на массу тела.

Введение кальций содержащий препаратов животным в группах

**Механические показатели костной ткани экспериментальных животных**

№	Группы	Предельная сила, Н	Предельный изгибающий момент, Н*мм	Максимальный прогиб, мм	Предел прочности на изгиб, МПа	p
1.	ЛО	96,57±16,1	377,0±9,4	0,63±0,12	38±14,5	<0,05
2.	ОЭ	72±9,3	466±19,2	0,47±0,2	21±3,6	<0,05
3.	ОЭ+С	76,1±4,5	423±11,7	0,49±0,15	25,9±4,8	<0,05
4.	ОЭ+ГАП	81±7,7	401±24,8	0,52±0,1	28±6,5	<0,05

ОЭ+С и ОЭ+ГАП на протяжении 90 суток не способствовало увеличению относительного содержания кальция в костной ткани, в группе ОЭ имело место достоверное увеличение относительного содержания кальция. Данные различия обусловлены тем, что определенное снижение уровня эстрогена вызывает остеоцитарный апоптоз<sup>7</sup>, что сопровождается гиперминерализацией окружающих тканей<sup>8</sup>.

Морфологический анализ эпифизов бедренных костей показал, что развитие остеопороза у животных в эксперименте не сопровождается истончением трабекул и формированием глубоких полостей резорбции, преобладают явления остеоцитарного остеолита. По данным литературы показано, что данные признаки являются обязательными и необратимыми

ми при верификации остеопороза<sup>9</sup>. Последние исследования *in vivo* с применением нового поколения микро-КТ-сканеров показали, что при развитии остеопороза происходит увеличение толщины большинства трабекул<sup>10</sup>.

Морфологический анализ архитектуры костной ткани экспериментальных крыс группы ОЭ показал, что относительная плотность остеоцитов увеличена по сравнению с группой ЛО, а относительная плотность костной ткани на единицу площади снижена. Длительное введение препарата кальций Сандоз несколько снижает показатель относительной плотности остеоцитов ( $p > 0,05$ ) и значительно снижает относительную плотность костной ткани ( $p < 0,05$ ). Аллогенный ГАП также способствует небольшо-

7 Tomkinson A., Reeve J., Shaw R. W., Noble B. S. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1997; 82. P.3128–3135.

8 Kingsmill V. J., Boyde A. Mineralisation density of human mandibular bone: quantitative backscattered electron image analysis // J. Anat., 1998; 192. P. 245–256.

9 Compston J. E., Mellish R. W., Croucher P., Newcombe R., Garrahan N. J. Structural mechanisms of trabecular bone loss in man // Bone Miner. –1989; 6. P.339–350.

10 Waarsing J. H., Day J. S., Verhaar J. A., Ederveen A. G., Weinans H. Bone loss dynamics result in trabecular alignment in aging and ovariectomized rats // J. Orthop. Res. –2006; 24. P.926–935.

му снижению плотности остеоцитов ( $p > 0,05$ ), но относительная плотность костной ткани при этом увеличивается ( $p < 0,05$ ).

Изменения архитектоники костной ткани при остеопорозе происходят за счет увеличения плотности остеоцитов, что свидетельствует о снижении их функциональной активности, что сопровождается снижением доли костного матрикса на единицу площади<sup>11</sup>. Эти процессы изменяют механические характеристики костной ткани<sup>12,13</sup>. Так у экспериментальных животных на фоне развившегося остеопороза имело место снижение показателей предельной силы, максимального прогиба и предела прочности кости на изгиб, что подтверждалось характером морфологических изменений в ее структуре.

В группе крыс ОЭ+ГАП в отличие от группы ОЭ+С имело место достоверное повышение предельной силы, максимального прогиба и предела прочности кости на изгиб. Такие результаты возможно объяснить наличием органической составляющей в

составе ГАП, что требует дальнейшего изучения.

**Заключение.** Овариоэктомия является эффективной моделью гипострогенного остеопороза у экспериментальных животных.

Длительная монотерапия препаратом «Кальций-Сандоз» в условиях экспериментального остеопороза способствует ухудшению механических показателей костной ткани, что подтверждается характерными морфологическими изменениями (выраженные дегенеративные изменения гиалинового хряща, дистрофия остеоцитов, высокая относительная плотность остеоцитов, расширение Гаверсовых каналов, снижение относительной плотности костной ткани)

Применение аллогенного ГАП у экспериментальных животных путем создания эктопического депо улучшает механические и морфологические показатели костной ткани, что обусловлено, вероятнее всего органической составляющей изучаемого вещества.

---

11 Mullender M. G., Vandermeer D. D., Huiskes R., Lips P. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis // *Bone* 1996;18. P.109–113.

12 Tatsumi S., Ishii K., Amizuka N., Li M., Kobayashi T., Kohno K., Ito M., Takeshita S., Ikeda K. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction // *Cell Metab.* – 2007; 5. P.464–475.

13 Martin A., Xiong J., Koromila T., Ji J.S., Chang S., Song Y.S., Miller J.L., Han C.Y., Kostenuik P., Krum S.A., Ching N.O., Gabet Y., Frenkel B. Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. –*Bone*, 2015. P.96–104.