

УДК 616.71-002

Казбанов В.В.<sup>1</sup>, Гайдаш А.А.<sup>1</sup>, Крутько В.В.<sup>2</sup>, Мусская О.Н.<sup>2</sup>, Кулак А.И.<sup>2</sup>,  
Скроцкая К.В.<sup>3</sup>, Пашкевич Л.А.<sup>4</sup>, Чекан Н.М.<sup>5</sup>

## ОСТЕОГЕНЕЗ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОМ ОСТИТЕ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр детской хирургии, Минск; <sup>2</sup>Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск; <sup>3</sup>Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск; <sup>4</sup>Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск; <sup>5</sup>Физико-технический институт Национальной академии наук Беларуси, Минск

По данным сканирующей электронной микроскопии, рентгенофазового анализа, ИК-спектроскопии, термического анализа установлено, что при смоделированном туберкулезном остите в костном матриксе увеличивается количество нестехиометрического гидроксиапатита. Это ощелачивает межклеточное вещество, способствует осаждению аморфизированных фосфатов кальция и осложняется мелкодисперсным распадом костного матрикса. Активный рост кристаллов карбонат-гидроксиапатита чрезмерно стимулирует остеогенез, который сопровождается микрофитизацией костного матрикса, хаотичным разрастанием костных трабекул и минеральной облитерацией костных микроканалцев. Формирование в кристаллической решетке гидроксиапатита центров «известкования» повышает «вяжущие» свойства костного матрикса, что способствует иммобилизации микобактерий, препятствует диссеминации и, в конечном итоге, обеспечивает удаление бактериальных частиц в составе костных секвестров.

**Введение.** Костный матрикс – это природный твердотельный минерально-органический композит структурные и физико-химические преобразования которого в ходе распада и репаративного восстановления во многом остаются не понятыми. В отношении туберкулезных оститов это явно не способствует оптимизации тактики специфической терапии одной из самых тяжелых и опасных форм инфекционно-воспалительной деструкции костной ткани. Цель: изучить структурные и физико-химические механизмы разрушения и репаративного остеогенеза при смоделированном туберкулезном остите.

**Материал и методы исследования.** Эксперименты выполнены на половозрелых самцах кроликов породы Шиншилла в экспериментальной лаборатории Научно-исследовательского института фтизиопульмонологии (Санкт-Петербург), с этическим комитетом которого согласованы разрешительные протоколы. Контрольная 1-я группа – составлена из здоровых кроликов. У кроликов 2-й группы моделировали остит путем введения культуры туберкулезных микобактерий в метаэпифизы бедренных костей. После рентгенологической верификации первичного очага производили некрэктомию и наблюдали без специфической антибактериальной терапии в течение 1 и 2 месяцев. По окончании эксперимента из первичного очага вырезали образцы костной ткани. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде. Макросрезы и серийные сколы делали в парах жидкого азота, что препятствует перегреву и сдерживает плавление костного матрикса. Сканирующую элек-

тронную микроскопию выполнили на микроскопе ЛЕО 1420 совмещенного с приставкой элементного анализа Rontec (Германия). Спектральные анализы осуществлены на порошках костной ткани, высушенных до постоянной массы. Фазовый состав определяли методом рентгенофазового анализа (РФА) на дифрактометре ADVANCE D8 (Bruker, Германия) при  $Cu_K = 1,5405 \text{ \AA}$ . ИК-спектроскопию проводили на спектрометре Tenzor-27 (Bruker, Германия) в диапазоне  $4004000 \text{ см}^{-1}$  в среде KBr. В качестве эталона сравнения использовали синтетический аморфизированный гидроксиапатит (ГА)  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  в виде порошка, высушенного при  $60^\circ\text{C}$  до постоянной массы, максимально приближенного по структуре и свойствам к биоапатиту.

**Результаты и обсуждение.** Туберкулезный остит, смоделированный вышеописанным способом, верифицируется присутствием микобактерий с характерными формами и размерами. Бактериальные частицы в основном располагаются на свободных поверхностях фрагментов детрита, но их не мало и в просветах расширенных интерстициальных щелей и микроканалцев. Кроме типичных форм микобактерий в просветах нанопор костного матрикса выявляются также сферические частицы размерами от 15 до 50 нм, большая часть которых агрегирована в довольно крупные образования, достигающие 350-700 нм. Возможно, что это фильтрующиеся формы туберкулезных микобактерий, которые сформировались вследствие действия неблагоприятных химических факторов. Фундаментальным признаком развития туберкулезного остита является присутствие

клеток Ланханса, основная часть которых обнаруживается в секвестрате. Клетки имеют типичный вид – по периферии цитоплазмы располагаются бактериальные частицы в виде полулуний. На остальном протяжении цитоплазма макрофагов истончена и фенестрирована. Выявляются клетки Ланханса чаще вблизи микроканалцев, просвет которых могут перекрывать. Выпуская множественные цитоплазматические отростки клетки прикрепляются к свободным поверхностям матрикса. Рядом с клетками Ланханса нередко располагаются частицы разрушенных микобактерий. Среди других отростчатых клеток достаточно надежно выявляются остеоциты. По данным СЭМ – это крупные клетки диаметром до 150-200 мкм с полиморфными цитоплазматическими отростками. Рядом с клетками Ланханса нередко выявляются остеоциты. Посредством тонких отростков остеоциты прикрепляются к шероховатым поверхностям матрикса, местами по спайновым линиям распадающихся остеонов. Не менее важным компонентом развивающегося туберкулезного остита является остеопоротическая трансформация костного матрикса. Это касается как собственно стенок первичного очага, так и матрикса секвестратов. Электронно-микроскопически остеопороз проявляется разрежением межклеточного вещества и обнажением коллагенового каркаса. При этом ослабевают адгезивные взаимодействия между костными ламеллами и они отслаиваются пластинами, состоящими из полиморфных, костных пластинок с типичными отверстиями гаверсовых каналов.

В эксперименте по данным РФА установлено, что минеральная составляющая здоровой костной ткани представлена в значительной степени аморфизированным гидроксиапатитом (ГА). Причем минеральная компонента костной ткани представлена нестехиометрическим ГА (н-ГА)  $\text{Ca}_{9,868}(\text{PO}_4)_{5,586}(\text{OH})_{4,006}$  и карбонат ГА (к-ГА)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$ , которые находятся при соотношении н-ГА / к-ГА равном 1,4.

При туберкулезном остите происходит значительное уменьшение органической фазы на фоне существенного увеличения количества н-ГА и уменьшения размера кристаллитов вследствие разупорядочивания структуры ГА.

1. По данным СЭМ-морфометрии, отношение объемов регенерирующей костной ткани к плотной фракции костного матрикса варьирует в близких вышеуказанным пропорциях. Такое совпадение не случайно и позволяет предположить, что «кислый» к-ГА сосредоточен преимущественно в очагах регенерации, а более «щелочной» н-ГА накапливается в плотных участках костного матрикса. О «защелачивании» плотных участков свидетельствуют, в том числе, локальное осаждение кальция - прогрессирующе и устойчивое к специфической терапии увеличение количества н-ГА, что сопровождается «защелачиванием» межклеточного вещества, осаждением аморфизированных фосфатов кальция, охрупчением и мелкодисперсным распадом костного матрикса;

2. ослабление химических связей кристаллов ГА с коллагеновыми волокнами, лизис и обнажение фибриллярного каркаса с остеопоротической трансформацией костного матрикса;

3. избыточный рост кристаллов к-ГА, что разбалансирует процессы ремоделирования и осложняется чрезмерным остеогенезом, который сопровождается хаотичным разрастанием костных трабекул, облитерацией микропор и микрофитизацией костного матрикса;

4. дислокации в кристаллической решетке ГА в виде «известкования», что усиливает «вяжущие» свойства минеральной фазы костного матрикса и способствует химической иммобилизации и адгезии микобактерий на их поверхности.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программы ГПНИ «Химические технологии и материалы» (задание 1.04).*

*V.V. Kazbanov<sup>1</sup>, A.A. Gaidash<sup>1</sup>, V.V. Krutko<sup>2</sup>, O.N. Musskaya<sup>2</sup>, A.I. Kulak<sup>2</sup>, K.V. Skrotskaya<sup>3</sup>, L.A. Pashkevich<sup>4</sup>, N.M. Chekan<sup>5</sup>*

#### **OSTEOGENESIS IN TUBERCULOSIS OSTHITE: PHYSICAL AND CHEMICAL AND STRUCTURAL MECHANISMS**

*<sup>1</sup>The Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Surgery, Minsk; <sup>2</sup>The Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk; <sup>3</sup>Establishment of the Belarusian State University The Scientific Research Institute of Physical and Chemical Problems, Minsk; <sup>4</sup>Republican Scientific and Practical Center of Traumatology and Orthopedics, Minsk; <sup>5</sup>Physical and Technical Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk*

#### **Summary**

According to scanning electron microscopy, X-ray phase analysis, IR spectroscopy, thermal analysis, it was found that with simulated tuberculous osteitis in the bone matrix, the amount of non-stoichiometric hydroxyapatite increases. This alkalizes the intercellular substance, contributes to precipitation of amorphized calcium phosphates and is complicated by the finely dispersed disintegration of the bone matrix. Active growth of crystals of carbonate hydroxyapatite over-stimulates osteogenesis, which is accompanied by microfittization of bone matrix, chaotic overgrowth of bone trabeculae and mineral obliteration of bone microtubules. Formation in the crystal lattice of hydroxyapatite «liming» centers increases the «astringent» properties of bone matrix, which promotes immobilization of mycobacteria, prevents dissemination and, ultimately, ensures the removal of bacterial particles in the composition of bone sequestrers.