



УДК 616.379-008.64-092.9:57.01:591.471.35  
DOI: 10.35693/2500-1388-2022-7-1-9-12



## Фазовый состав биоминерала тазовой кости у белых крыс предстарческого возраста со стрептозотонин-индуцированным диабетом после хирургической перфорации большеберцовых костей

©А.В. Торба

ГУ «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки»  
(Луганск, Украина)

### Аннотация

**Цель** – установить динамику изменения фазового состава биоминерала тазовой кости у крыс предстарческого возраста со стрептозотонин-индуцированным диабетом после хирургической перфорации большеберцовых костей.

**Материал и методы.** Сахарный диабет индуцировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотонина в дозе 55 мг/кг (35 крыс с исходной массой 290–310 г в возрасте 17–18 месяцев). Хирургическую перфорацию большеберцовых костей диаметром 2,0 мм производили в проксимальном метадиафизе большеберцовых костей (35 крыс). Части животных (35 крыс) перфорацию большеберцовых костей производили после индуцирования сахарного диабета. Контролем служили интактные животные (35 крыс). Определяли содержание в биоминерале тазовой кости витлокита, кальцита и гидроксилпатита.

**Результаты.** Хирургическая перфорация большеберцовых костей приводила к дестабилизации фазового состава тазовых костей с 15 суток после операции с пиком отклонений к 90 суткам, когда доли витлокита и кальцита превышали контроль на 7,20% и 8,91%, а доля гидроксилпатита снижалась на 3,53%. При стрептозотонин-индуцированном диабете фазовый состав тазовых костей дестабилизировался с 7-х суток; к 90-м суткам доли витлокита и кальцита превышали контроль на 9,00% и 9,01%, а доля гидроксилпатита снижалась на 4,00%. Сочетание перфорации большеберцовых костей и стрептозотонин-индуцированного диабета приводило к усугублению аморфности фазового состава тазовых костей с 7-х суток, к 90-м суткам эксперимента доля витлокита превышала значения группы с изолированной перфорацией большеберцовых костей на 7,95%, а доля гидроксилпатита снижалась на 2,35%.

**Заключение.** Хирургическая перфорация большеберцовых костей при стрептозотонин-индуцированном диабете у крыс предстарческого возраста приводит к усугублению аморфности биологического минерала тазовых костей с 7-х суток после манипуляции.

**Ключевые слова:** крысы предстарческого возраста, стрептозотонин-индуцированный диабет, повреждение кости, костный биоминерал, фазовый рентгеноструктурный анализ.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

### Для цитирования:

Торба А.В. Фазовый состав биоминерала тазовой кости у белых крыс предстарческого возраста со стрептозотонин-индуцированным диабетом после хирургической перфорации большеберцовых костей. *Наука и инновации в медицине*. 2022;7(1):9-12. doi: 10.35693/2500-1388-2022-7-1-9-12

### Сведения об авторе

**Торба А.В.** – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой госпитальной хирургии, урологии и онкологии.

ORCID: 0000-0001-6341-5746.

E-mail: alexandr\_v\_torba@mail.ru

### Автор для переписки

**Торба Александр Владимирович**

Адрес: Луганский государственный медицинский университет, кв. 50-летия Обороны Луганска, 1г, г. Луганск, Украина, 91045.

E-mail: alexandr\_v\_torba@mail.ru

БМТК – биоминерал тазовой кости; СИД – стрептозотонин-индуцированный диабет; ХПБК – хирургическая перфорация большеберцовых костей; П – предстарческий (возраст крыс); К – контроль.

**Рукопись получена:** 06.10.2021

**Рецензия получена:** 13.01.2022

**Решение о публикации принято:** 14.01.2022

# Phase contents of bone mineral of the hipbone in streptozotocin-induced diabetic pre-senile rats after surgical perforation of the tibia

©Aleksandr V. Torba

Saint Luka Lugansk State Medical University (Lugansk, Ukraine)

## Abstract

**Aim** – to investigate changes in phase contents of bone mineral of the hipbone in pre-senile streptozotocin-induced diabetic rats after surgical perforation of the tibia.

**Material and methods.** Diabetes was induced in 35 animals with an initial weight of 290–310 g at the age of 17–18 months by a single intraperitoneal injection of streptozotocin in dosage of 55 mg per kg of body weight. Surgical perforation of the tibia was modeled as 2.0 mm opening in the proximal metadiaphysis (35 animals). Another group comprised 35 animals with both perforation and diabetes. 35 intact animals comprised the control group. The content of whitlockite, calcite and hydroxylapatite in bone mineral of the hipbone was determined.

**Results.** Surgical perforation of the tibia resulted in instability of phase contents of bone mineral of the hipbone by the 15th day of observation; peak of deviations was registered on the 90th day of observation, when the proportions of whitlockite and calcite increased by 7.20% and 8.91%, while the proportions of hydroxyapatite decreased by 3.53% in comparison with the controls. In diabetic animals, the destabilization of the phase composition of bone mineral was observed by the 7th day of the experiment. By the 90th day, the proportion of whitlockite and calcite exceeded those of the controls by 9.00% and 9.01% while the proportion of hydroxylapatite decreased by 4.00%. Surgical perforation of the tibia in diabetic pre-senile animals resulted in more marked increase of hipbone mineral amorphousness from the 7th day of observation; by the 90th day the proportion of whitlockite

exceeded this in rats with perforation by 7.95%, while the proportion of hydroxylapatite decreased by 2.35%.

**Conclusion.** Surgical perforation of the tibia in diabetic pre-senile rats results in increasing of the amorphousness of bone mineral of the hipbone, which grows starting from the 7th day after operation.

**Keywords:** pre-senile rats, streptozotocin-induced diabetes, bone fracture, bone biomineral, X-ray phase analysis.

**Conflict of interest:** nothing to disclose.

## Citation

Torba AV. Phase contents of bone mineral of the hipbone in streptozotocin-induced diabetic pre-senile rats after surgical perforation of the tibia.

*Science and Innovations in Medicine.* 2022;7(1):9-12.

doi: 10.35693/2500-1388-2022-7-1-9-12

## Information about author

**Aleksandr V. Torba** – PhD, Associate Professor, Head of the Department of Hospital Surgery, urology and oncology.

ORCID: 0000-0001-6341-5746.

E-mail: alexandr\_v\_torba@mail.ru

## Corresponding Author

**Aleksandr V. Torba**

Address: Saint Luka Lugansk State Medical University, 1g, quarter of the 50th anniversary of the Defense of Lugansk, Lugansk, Ukraine, 91045.

E-mail: alexandr\_v\_torba@mail.ru

**Received:** 06.10.2021

**Revision Received:** 13.01.2022

**Accepted:** 14.01.2022

## ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет – целый ряд метаболических расстройств, которые приводят к стойкому аномальному повышению уровня глюкозы в крови [1]. В зависимости от этиологии диабет делится на несколько типов, различающихся соответственно и по механизмам развития, и по течению заболевания. Из них чаще всего встречаются аутоиммунные формы (сахарный диабет 1 типа и латентный аутоиммунный диабет у взрослых), а также сахарный диабет 2 типа, характеризующийся инсулинорезистентностью [2–4].

По оценкам Международной федерации диабета, в мире насчитывается 463 млн человек, больных диабетом, и уже к 2040 году это число может удвоиться [5]. Около 90% всех случаев приходится на сахарный диабет 2 типа; сахарный диабет 1 типа составляет около 10%, однако заболеваемость им растет ежегодно на 2–3% [2]. Латентный аутоиммунный диабет выявляется преимущественно у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и составляет примерно 10% от ранее диагностированных случаев [5].

Осложнения сахарного диабета наблюдаются во всех органах и системах, одним из таких осложнений является диабетическая остеопатия, которая со временем приводит к остеопорозу [6].

Структурное состояние скелета при сахарном диабете 2 типа изучено достаточно полно [7]. В то же время морфогенез скелета при сахарном диабете 1 типа

и особенно при латентном аутоиммунном диабете у взрослых практически не изучен. При этом не следует забывать, что при дефиците инсулина костеобразование угнетается, а активизация костной резорбции приводит к нарушению минерализации и микроархитектуры кости, что значительно увеличивает риск развития остеопоротических переломов [6].

В гериатрической популяции пациентов нарушения физико-химических свойств костного минерала, связанные с сенильным остеопорозом, еще больше увеличивают риск переломов [3]. Сведения же о структурно-функциональном состоянии скелета при переломе в одном из его отделов при сахарном диабете в доступной литературе отсутствуют.

## ЦЕЛЬ

Установить динамику изменения фазового состава биоминерала тазовой кости (БМТК) у крыс предстарческого возраста со стрептозотоксин-индуцированным диабетом (СИД) после хирургической перфорации большеберцовых костей (ХПБК).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании было задействовано 140 белых крыс предстарческого возраста (при вступлении в эксперимент в возрасте 17–18 месяцев) и массой 290–310 г. Исследования были проведены с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите

позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003). На проведение исследования получено разрешение комиссии по вопросам биоэтики Луганского государственного медицинского университета имени Святителя Луки, протокол № 2 от 20.05.2019 г.

СИД индуцировали однократным внутривенным введением стрептозоцина (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, группа ПСИД) [8]. Через трое суток после инъекции диабетический статус каждого животного подтверждался путем измерения уровней глюкозы в крови из хвостовой вены, взятых через шесть часов после приема пищи. Уровень глюкозы анализировали с помощью глюкозооксидазного метода [9], используя стандартные наборы реактивов Cormay LDL Direct (Польша). В исследовании в дальнейшем были включены только крысы с уровнем глюкозы в крови  $\geq 12$  ммоль/л. ХПБК диаметром 2,0 мм при эфирной анестезии производили в проксимальном метадиафизе большеберцовых костей (35 крыс, группа ПХП). Части животных (35 крыс, группа ПХП-СИД) ХПБК производили после индуцирования СИД. Контролем служили интактные животные (35 крыс, группа ПК). Точкой отсчета начала эксперимента считали время введения стрептозоцина либо ему соответствующее. По завершении эксперимента (с 7-е по 90-е сутки) животных анестезировали эфиром и декапитировали, выделяли левые тазовые кости и исследовали с помощью дифрактометра ДРОН-2,0 и гониометрической приставки ГУР-5 с использованием  $\text{Cu K}\alpha$  излучения ( $\lambda=0,1542$  нМ).

Исследовали рефлексы гидроксилапатита с межплоскостным расстоянием 2,798 10-10 М, витлокита с межплоскостным расстоянием 2,607 10-10 М и кальцита с межплоскостным расстоянием 3,029 10-10 М [10]. Используя метод внутреннего контроля, определяли процентное содержание в биологическом минерале тазовой кости каждого из этих компонентов [11].

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

После ХПБК у крыс предстарческого возраста в группе ПХП наблюдали увеличение степени аморфности БМТК: доля гидроксилапатита была меньше группы ПК с 15-е по 90-е сутки после операции на 2,20%, 2,66%, 3,32% и 3,53% (здесь и далее по тексту все приведенные цифровые отличия являются статистически значимыми,  $p\leq 0,05$ ) (таблица 1). Одновременно с 15-х по 90-е сутки эксперимента доли аморфных составляющих — кальцита и витлокита — возрастали на 7,70%, 7,86%, 9,68% и 8,91% и на 3,29%, 4,98%, 6,00% и 7,20%.

| Группа  | Сроки, сутки | Содержание в биоминерале тазовой кости |                    |              |
|---------|--------------|--|--------------------|--------------|
|         |              | Кальцит, %                             | Гидроксилапатит, % | Витлокит, %  |
| ПК      | 7            | 12,86±0,14                             | 70,94±0,19         | 16,21±0,24   |
|         | 15           | 13,04±0,18                             | 70,47±0,22         | 16,48±0,19   |
|         | 30           | 13,10±0,15                             | 70,10±0,23         | 16,80±0,16   |
|         | 60           | 13,20±0,15                             | 69,60±0,27         | 17,20±0,25   |
|         | 90           | 13,57±0,15                             | 69,23±0,23         | 17,20±0,19   |
| ПХП     | 7            | 12,93±0,16                             | 70,40±0,22         | 16,66±0,12   |
|         | 15           | 14,05±0,15*                            | 68,93±0,21*        | 17,03±0,16*  |
|         | 30           | 14,13±0,15*                            | 68,23±0,19*        | 17,64±0,08*  |
|         | 60           | 14,48±0,18*                            | 67,29±0,27*        | 18,24±0,17*  |
|         | 90           | 14,78±0,19*                            | 66,78±0,23*        | 18,44±0,08*  |
| ПСИД    | 7            | 13,43±0,19*                            | 69,78±0,20*        | 16,78±0,14   |
|         | 15           | 13,77±0,16*                            | 69,16±0,25*        | 17,07±0,15*  |
|         | 30           | 14,28±0,15*                            | 68,01±0,20*        | 17,71±0,15*  |
|         | 60           | 14,61±0,18*                            | 66,93±0,18*        | 18,45±0,14*  |
|         | 90           | 14,79±0,13*                            | 66,46±0,20*        | 18,75±0,19*  |
| ПХП-СИД | 7            | 13,54±0,19*^                           | 69,56±0,18*^       | 16,90±0,18*  |
|         | 15           | 14,26±0,16*                            | 68,44±0,22*        | 17,29±0,22*  |
|         | 30           | 14,51±0,21*                            | 66,96±0,22*^       | 18,54±0,16*^ |
|         | 60           | 14,70±0,14*                            | 65,73±0,22*^       | 19,57±0,23*^ |
|         | 90           | 14,88±0,16*                            | 65,21±0,24*^       | 19,91±0,21*^ |

Примечание. \* – различия достоверны ( $p<0,05$ ) в сравнении с группой ПК; ^ – различия достоверны ( $p<0,05$ ) в сравнении с группой ПСИД.

**Таблица 1.** Результаты фазового рентгеноструктурного анализа биоминерала тазовой кости белых крыс предстарческого возраста в зависимости от вида воздействия и длительности эксперимента

**Table 1.** Results of X-ray phase analysis of the pelvic biomineral of pre-senile white rats, depending on the type of exposure and the duration of the experiment

В группе ПСИД аморфность БМТК также возрастала. Содержание гидроксилапатита с 7-х по 90-е сутки эксперимента было меньше значений группы ПК на 1,53%, 1,87%, 2,98%, 3,83% и 4,00%. Содержание аморфных составляющих, наоборот, возрастало, и с 7-х по 90-е сутки доля кальцита была больше контроля на 4,48%, 5,62%, 9,04%, 10,71% и 9,01%, а содержание витлокита — на 3,56%, 3,54%, 5,38%, 7,26% и 9,00%.

В группе ПХП-СИД доля гидроксилапатита в БМТК была ниже значений группы ПХП к 30-м, 60-м и 90-м суткам эксперимента на 1,20%, 1,87%, 2,31% и 2,35% соответственно. Содержание аморфных компонентов, наоборот, возрастало, и доля кальцита к 7-м суткам была выше значений сравнения на 4,72%, а доля витлокита с 30-х по 90-е сутки — на 5,08%, 7,34% и 7,95%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ХПБК у крыс предстарческого возраста сопровождается увеличением аморфности БМТК в сравнении с группой ПК, которая регистрируется с 15-х суток после операции и постепенно нарастает в течение всего эксперимента. Данный факт является отражением реакции организма на повреждение костей с целью мобилизации кальция из основного депо — остальных костей скелета с подключением комплекса различных

иммунных и метаболических механизмов [12]. Одним из компонентов этих изменений является и развитие окислительного стресса, в результате чего активизируются резорбтивные процессы в скелете [13].

СИД у крыс предстарческого возраста также сопровождается увеличением степени аморфности БМТК, которая регистрируется уже с 7-х суток эксперимента, нарастает в течение всего эксперимента. Для СИД характерны гипергликемия и повышенный уровень окислительного стресса, в результате чего повышается уровень конечных продуктов гликирования белковых молекул [14]. Избыток конечных продуктов гликирования способствует повреждению кости путем образования перекрестных связей и необратимого изменения структуры белковых молекул, в том числе и коллагена, а также взаимодействию со специфическими рецепторами вследствие увеличения уровней окислительного стресса и воспалительных процессов [1, 6]. В результате создаются условия для более выраженной дестабилизации БМТК.

ХПБК на фоне СИД у животных предстарческого возраста в сравнении с группой ПХП сопровождается манифестацией дестабилизации фазового состава БМТК, которая выражена в течение всего эксперимента.

Можно предположить, что при сочетании ХПБК и СИД на фоне старения организма прогрессирует нарастание уровней конечных продуктов гликирования и окислительного стресса, что ведет к усугублению

повреждений в скелете и к более грубому нарушению процессов минерализации и костеобразования.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хирургическая перфорация большеберцовых костей у белых крыс предстарческого возраста сопровождается дестабилизацией фазового состава минерала тазовых костей с пиком отклонений к 90-м суткам после операции.

Стрептозотоцин-индуцированный диабет у белых крыс предстарческого возраста также сопровождается дестабилизацией фазового состава минерала тазовых костей в период с 7-х по 90-е сутки эксперимента, а амплитуда отклонений нарастает с увеличением срока эксперимента. Сочетание перфорации большеберцовых костей и стрептозотоцин-индуцированного диабета у животных предстарческого возраста приводит к усугублению нарушений фазового состава минерала тазовых костей с 60-х суток после манипуляции, а к 90-м суткам эксперимента выявленные изменения нарастают.

Дестабилизация фазового состава костного минерала отражается в снижении прочностных характеристик костей, поэтому у геронтологических больных с сахарным диабетом и переломом одной из костей значительно возрастает риск развития повторных переломов. ■

**Конфликт интересов:** автор заявляет об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Romero-Díaz C, Duarte-Montero D, Gutiérrez-Romero SA, Mendivil CO. Diabetes and Bone Fragility. *Diabetes Ther.* 2021;12(1):71–86. doi: 10.1007/s13300-020-00964-1. PMID: 33185853
2. Zhukouskaya VV, Eller-Vainicher C, Shepelkevich AP, et al. Bone health in type 1 diabetes: focus on evaluation and treatment in clinical practice. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(9):941–950. doi: 10.1007/s40618-015-0284-9. PMID: 25863666
3. Kanazawa I, Sugimoto T. Diabetes Mellitus-induced Bone Fragility. *Intern Med.* 2018;57(19):2773–2785. doi: 10.2169/internalmedicine.0905-18. PMID: 29780142
4. Laugesen E, Østergaard JA, Leslie RDG. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabet Med.* 2015;32(7):843–852. doi: 10.1111/dme.12700. PMID: 25601320
5. Fadiga L, Saraiva J, Catarino D, et al. Adult-onset autoimmune diabetes: comparative analysis of classical and latent presentation. *Diabetol Metab Syndr.* 2020;12:107. doi: 10.1186/s13098-020-00616-1. PMID: 33292447
6. Shah VN, Carpenter RD, Ferguson VL, Schwartz AV. Bone health in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2018;25(4):231–236. doi: 10.1097/MED.0000000000000421. PMID: 29794498
7. Costantini S, Conte C. Bone health in diabetes and prediabetes. *World J Diabetes.* 2019;10(8):421–445. doi: 10.4239/wjd.v10.i8.421. PMID: 23798298
8. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005;22(4):359–370. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x. PMID: 15787657
9. Kolb VG, Камышников VS. *Clinical Chemistry Handbook*. Minsk, 1982. (In Russ.). [Колб В.Г., Камышников В.С. *Справочник по клинической химии*. Минск, 1982].
10. Mirkin LI. *X-ray analysis. Indexing radiographs*. Moscow, 1981. (In Russ.). Миркин Л.И. *Рентгеноструктурный анализ. Индексирование рентгенограмм*. М., 1981].
11. Luzin VI. Application of X-ray analysis to study the phase composition of bone mineral. *Ukrainian morphological almanac.* 2005;3(4):61–64. (In Russ.). [Лузин В.И. Применение рентгеноструктурного анализа для исследования фазового состава костного минерала. *Український морфологічний альманах*. 2005;3(4):61–64].
12. Emami AJ, Toupadakis CA, Telek SM, et al. Age dependence of systemic bone loss and recovery following femur fracture in mice. *J Bone Miner Res.* 2019;34(1):157–170. doi: 10.1002/jbmr.3579. PMID: 30189111
13. Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2017;14(2):209–216. doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.209. PMID: 29263736
14. Yamamoto M, Sugimoto T. Advanced glycation end products, diabetes, and bone strength. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(6):320–326. doi: 10.1007/s11914-016-0332-1. PMID: 27704396