

С.В.Ивашенко

Изменение костной ткани после воздействия низкочастотным ультразвуком

Белорусский государственный медицинский университет

Представлены данные о механической прочности и элементного состава костной ткани после воздействия низкочастотным ультразвуком. Ключевые слова: низкочастотный ультразвук, костная ткань, нагрузка, напряжение, элементный состав.

Ортодонтическое лечение у взрослых затруднено в связи с увеличением плотности компактной пластинки и губчатого вещества костной ткани, снижением ее пластичности, ослаблением обменных процессов. Разработано много различных методов инвазивного и неинвазивного воздействия на костную ткань с целью оптимизации ортодонтического лечения. Ни у кого не вызывает сомнения, что хорошего результата ортодонтического лечения у взрослых можно добиться только при комплексном подходе [1,3,4]. Ослабить костную ткань и сделать её более податливой к перемещению зубов можно воздействуя на костный матрикс и содержание в ней кальция и фосфора. Одним из путей решения данной проблемы является применение низкочастотного ультразвука. Он оказывает разностороннее биологическое действие: вызывает микромассаж клеточных структур, тепловой эффект, физико-химические изменения и др. Озвучивание низкочастотным ультразвуком повышает проницаемость клеточных мембран, улучшает проницаемость и введение лекарственных веществ [2,5].

Целью проведенного экспериментального исследования явилась оценка изменений состояния костной ткани альвеолярного отростка у кроликов, подвергшихся озвучиванию низкочастотным ультразвуком.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 15 кроликах породы шиншилла одинакового веса и возраста. Кроликов разделили на три группы: две опытные-по 5 особей и одну контрольную из пяти особей. В первой и второй опытной группах проводили озвучивание (10 мин.) костной ткани и слизистой альвеолярного отростка нижней челюсти в области центральных резцов ультразвуком частотой 22 кГц и 44 кГц соответственно. Всем животным проведено по 10 процедур. Животные находились на стандартном рационе вивария. После окончания эксперимента животных выводили из опыта под наркозом. Брали участок нижней челюсти в области резцов, отделяли слизистую оболочку и надкостницу и фиксировали в 10%-ном растворе формалина.

Испытание образцов костной ткани на сжатие проводили по ГОСТ 4651-82 в Испытательном Центре ГНУ «Институт порошковой металлургии» на машине Instron-1195.

Брали образец костной ткани, высоту, ширину и толщину образца измеряли с погрешностью не более 0,01 мм. не менее чем в трёх местах. Для удобства образцу придавали форму параллелограмма с размером грани 5 на 8 мм.

Скорость испытания указывали в нормативно-технической документации. Испытания проводили в условиях кондиционирования по ГОСТ 12423-66 при температуре (23 ± 2) °С и относительной влажности $(50\pm 5)\%$. Устанавливали образец между опорными площадками так, чтобы вертикальная ось образца совпадала с направлением действия нагрузки. Регулировали машину до осуществления соприкосновения образца с площадками. Устанавливали выбранную скорость сближения опорных площадок. Машину приводили в действие и записывали значения определяемых показателей или кривую «нагрузка-деформация» при сжатии (рис.1).



Рис.1. Комплекс механических испытаний на базе испытательной машины Instron-1195 и копра КМ-04

Разрушающее напряжение при сжатии (d_{cp}), напряжение сжатия при пределе текучести ($d_{ст}$), напряжение сжатия при условном пределе текучести ($d_{сту}$) и напряжение сжатия при установленной условной деформации ($d_{сд}$) вычисляют в МПа по формуле:

$$d = F / A_0,$$

где F — нагрузки, соответствующие вычислению

d_{cp} , $d_{ст}$, $d_{сту}$, $d_{сд}$, N ;

A_0 — площадь минимального начального сечения образца, мм².

За результат испытания принимают среднее арифметическое всех параллельных определений, вычисленных до третьей значащей цифры.

Относительную деформацию сжатия при разрушении ($e_{ср}$) и относительную деформацию сжатия при пределе текучести ($e_{ст}$) вычисляют в процентах по формуле

$$e_{ст} = (Dh/h_0) \times 100,$$

где Dh — уменьшение высоты образца в момент разрушения или при пределе текучести, мм;

h_0 — начальная высота образца, мм.

За результат испытания принимают среднее арифметическое всех параллельных определений, вычисленных до второй значащей цифры.

Стандартное отклонение (S) вычисляют по ГОСТ 14359 — 69, если в нормативно-технической документации на конкретную продукцию нет других указаний,

Результаты испытания записывают в протокол, который должен содержать следующие данные:

количество образцов;
способ кондиционирования и условия испытания в случаях, отличающихся от предусмотренных в настоящем стандарте;
способ измерения деформации;
скорость испытания.

Анализ элементного состава костной ткани проводили при помощи сканирующего электронного микроскопа (рис.2). Сканирующий электронный микроскоп-это прибор с большими возможностями, которые позволяют на высоком уровне характеризовать неоднородные материалы и поверхности. В сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) исследуемая поверхность облучается тонкофокусированным электронным пучком, который может либо покоиться, либо развертываться в растр по поверхности образца. В результате взаимодействия возникают вторичные электроны, отраженные электроны, характеристическое рентгеновское излучение, оже-электроны и фотоны различных энергий. Они рождаются в определенных объемах (областях генерации внутри образца) и используются для измерения многих его характеристик (состава, топографии поверхности, кристаллографической ориентации и т. д.).



Рис.2. Сканирующий электронный микроскоп CamScan 4 с микрорентгеноспектральным анализатором AN 10000

Сканирующий электронный микроскоп является одним из наиболее универсальных приборов для исследования и анализа микроструктурных характеристик твердых тел. Основной причиной широкого использования СЭМ является высокое разрешение при исследованиях массивных объектов, достигающее на сегодня 10-15 нм (100-150 А).

Одна из важных особенностей СЭМ состоит в том, что она позволяет наблюдать топографию твердого тела с разрешением и глубиной резкости, значительно превосходящим соответствующие показатели световых микроскопов.

Информация при исследовании поверхности переносится отраженными вторичными электронами и другими имитирующими сигналами. Толщина образца не имеет особого значения, как это имеет место в просвечивающей электронной микроскопии, где информация переносится прошедшими электронами, которые проникают в образец не более чем на 0,1 мкм.

Диэлектрические материалы представляют особую сложность при исследовании в СЭМ. Когда электронный зонд попадает на диэлектрик, на

его поверхности из-за отсутствия стекания заряда на землю накапливаются поглощенные электроны. Накопление электронов приводит к появлению на поверхности образца заряженных областей, которые при последующем сканировании могут нерегулярным образом отклонять первичный пучок, приводя к серьезным искажениям. Кроме того, наличие поверхностного заряда сильно изменяет вторичную электронную эмиссию. От эффекта зарядки можно избавиться нанесением на поверхность образца токопроводящего покрытия.

Критерием выбора материала для напыления обычно является получение максимального количества вторичных электронов. Основываясь на рассмотрении физических аспектов вторичной электронной эмиссии, был сделан вывод, что покрытие из золота толщиной 8-10 нм (80-100 Å) должно дать оптимальную вторичную электронную эмиссию. Поэтому для получения высококачественного изображения образец лучше всего покрывать пленкой из золота. В установке «Sputter coater» токопроводящий слой создается катодным распылением золота. Биологические объекты, нанесенные на предметные стекла помещались в камеру для образцов вакуумного поста «Sputter coater». Камера откачивалась на предварительный вакуум до давления $6-8 \cdot 10^{-2}$ атм. Время устанавливалось 2 мин., подавалось напряжение 10 кВ, затем с помощью игольчатого клапана устанавливался ток 30 мА. За 2 минуты создавалось сплошное проводящее покрытие из Au толщиной 100 Å, дающее качественное изображение.

Препарированные образцы помещают в камеру сканирующего электронного микроскопа и проводят съемку при различных увеличениях.

Ускоряющее напряжение является одним из основных параметров съемки в СЭМ. Съемка проводилась при ускоряющем напряжении 20 кВ, что для биологических объектов предпочтительнее, так как при этом напряжении меньше ток пучка электронов, поверхность меньше заряжается и соответственно качество изображения выше.

Рабочее расстояние (WD) – расстояние от образца до конечной линзы составляет 19-25 мм в зависимости от размера образца и угла наклона.

Угол наклона образца подбирается опытным путем по качеству изображения отдельно в каждом конкретном случае.

Фокусное расстояние (focus) берется 2 и является постоянной величиной для рабочего расстояния 19-25 мм.

Ток катода ([A]) выставляется по насыщению и равен 2,59-2,3 А в зависимости от времени работы катода (чем больше время работы, тем меньше ток насыщения).

Эмиссия катода 150 мА – величина постоянная.

Разрешение (resolution) имеет диапазон значений от 5 до 11. Чем меньше это значение, тем лучше разрешение структурных составляющих на поверхности образца

Препарированные образцы помещают в камеру сканирующего электронного микроскопа и проводят съемку при различных увеличениях.

Исследование элементного состава проводилось на сканирующем электронном микроскопе «CamScan 4» с энергодисперсионным микрорентгеноспектральным анализатором «INCA 350» фирмы «Oxford Instruments» (Англия).

Определяемые элементы от В до U.

Минимальный предел обнаружения элемента-0.5%. Точный количественный анализ при содержании элемента от 1%..

Разрешающая способность данного СЭМ по паспорту – 40 А.

Глубина проникновения электронного пучка в образец 1 мкм, область возбуждения 0.5мкм.

Погрешность метода 3-5 относительных процентов

Результаты и обсуждение

Данные исследования образцов костной ткани челюстей кроликов на сжатие приведены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели максимальной нагрузки и напряжения контрольных и опытных образцов костной ткани челюсти кролика

Образцы костной ткани	F _{max} , Н	δ _{сж} , МПа
контроль	293,8±0,5*	9,3±0,53*
Опыт 22кГц	187,1±0,42*	5,1±0,33*
Опыт 44кГц	168,7±0,34*	4,6±0,28*

Примечание:

F_{max} –максимальная нагрузка, предшествующая разрушению

δ_{сж}-напряжение, соответствующее наибольшей нагрузке, предшествующей разрушению.

*- статистически достоверные различия (p<0,05) при сравнении с группой «контроль».

Как видно из представленных выше данных, максимальная нагрузка, предшествующая разрушению, у всех образцов различна. Так по сравнению с контролем у кроликов, подвергшихся воздействию ультразвуком частотой 22 кГц, этот показатель меньше в 1,57 раза, а у кроликов, подвергшихся воздействию ультразвуком частотой 44 кГц-в 1,74 раза.

Напряжение, соответствующее наибольшей нагрузке, у всех образцов так же различно.

По сравнению с контролем, у кроликов, подвергшихся воздействию ультразвуком частотой 22 кГц, этот показатель меньше в 1,82 раза, а у кроликов, подвергшихся воздействию ультразвуком частотой 44 кГц-в 2,02 раза.

Можно отметить, что с увеличением частоты озвучивания прочностные показатели костной ткани уменьшаются.

Электронное изображение компактной пластинки костной ткани челюсти кролика контрольной группы приведено на рисунке 3.

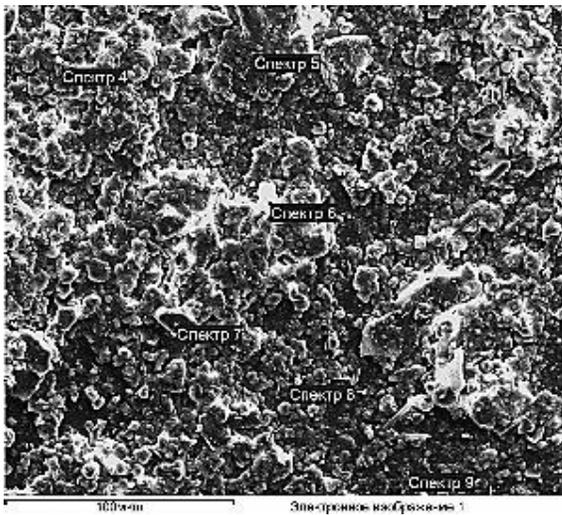


Рис.3. Контроль.Компактная пластинка.Ув.530.

Данные элементного состава компактной пластинки костной ткани в контрольной и опытных группах представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание (в весовых %) кальция и фосфора в образцах компактной пластинки костной ткани

Образец	Са	Р
контроль	19,16±1,45*	10,6±0,83*
Опыт 22кГц	11,53±1,09*	6,22±0,37*
Опыт 44кГц	9,46±0,23*	5,76±0,38*

Примечание:

*- статистически достоверные различия ($p < 0,05$) при сравнении с группой «контроль».

Как видно из представленных в таблице данных, отмечается достоверное снижение уровня кальция и фосфора в опытных группах по сравнению с контролем. Так концентрация кальция в компактной пластинке костной ткани кроликов, подвергшихся воздействию ультразвуком частотой 22 кГц и 44 кГц, уменьшилась соответственно в 1,7 и 2 раза. Одновременно отмечается снижение уровня фосфора в 1,7 и 1,8 раза соответственно.

Электронное изображение губчатого вещества костной ткани челюсти кролика контрольной группы приведено на рисунке 4.

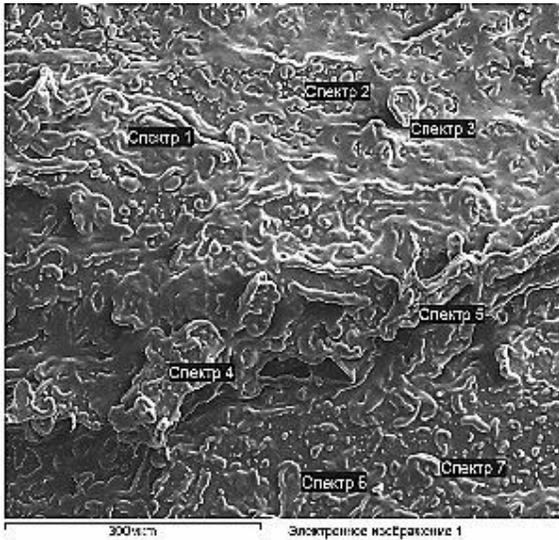


Рис.4. Контроль.Губчатое вещество.Ув.200.

Данные элементного состава губчатого вещества костной ткани в контрольной и опытных группах представлены в табл.3.

Таблица 3

Содержание (в весовых %) кальция и фосфора в образцах губчатого вещества костной ткани

Образец	Са	Р
контроль	14,36±0,78*	9,36±1,26*
Опыт 22кГц	8,24±0,84*	5,3±0,29*
Опыт 44кГц	7,86±0,26*	4,73±1,98*

Примечание:

*- статистически достоверные различия ($p < 0,05$) при сравнении с группой «контроль».

Электронное изображение компактного и губчатого вещества костной ткани челюсти кроликов опытных групп приведено на рис.5 и рис.6 соответственно. На представленных рисунках отмечается более сильное разрыхление и реструктуризация поверхности образцов опытных групп по сравнению с контролем.

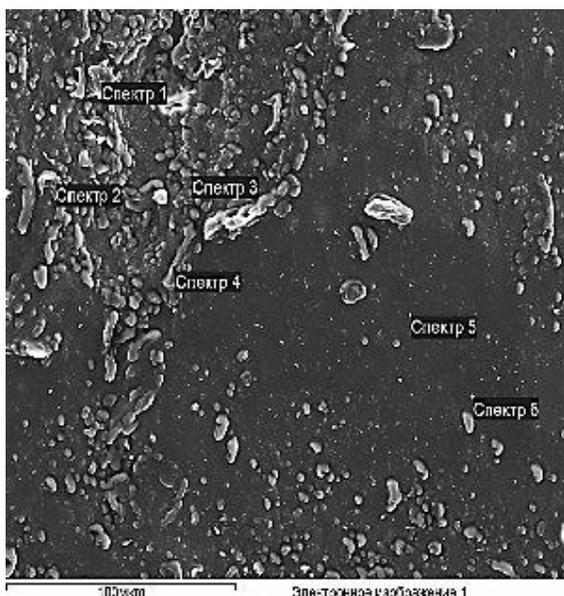


Рис.5. Опыт 44 кГц. Компактная пластинка. Ув.530.

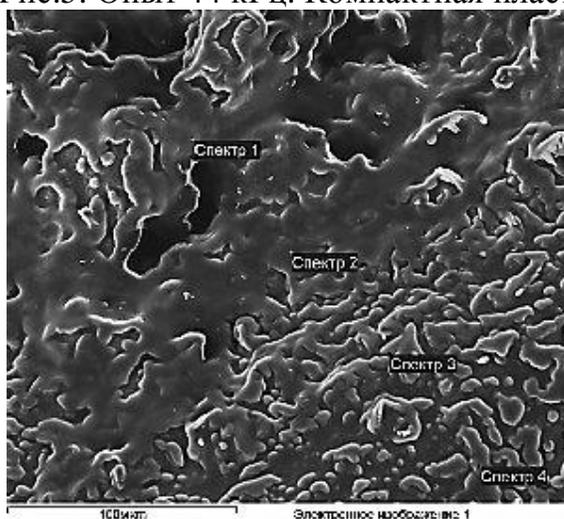


Рис.6. Опыт 44 кГц. Губчатое вещество. Ув.520.

Как видно из представленных в таблице данных, отмечается достоверное снижение уровня кальция и фосфора в опытных группах по сравнению с контролем. Так концентрация кальция в губчатом веществе костной ткани кроликов, подвергшихся воздействию ультразвуком частотой 22 кГц и 44 кГц уменьшилась соответственно в 1,7 и 1,8 раза. Одновременно отмечается снижение уровня фосфора в 1,7 и 1,9 раза соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение низкочастотного ультразвука вызывает локальную деминерализацию костной ткани и снижение её механической прочности.

Выводы

1. Применение ультразвука частотой 22 кГц и 44 кГц приводит к уменьшению механической прочности компактной пластинки и губчатого вещества костной ткани.

2. Воздействия ультразвуком низкой частоты вызывали локальную деминерализацию костной ткани, характеризующуюся снижением в ней кальция и фосфора, а также её разрыхление и реструктуризацию.

3. Полученные результаты позволяют рекомендовать апробировать применение низкочастотного ультразвука в активном периоде ортодонтического лечения зубочелюстных аномалий и деформаций с целью ослабления костной ткани и ускорения перемещения зубов.

Литература

1. Гунько И.И. Клинико-экспериментальное обоснование применения физиотерапевтических методов в комплексном лечении зубочелюстных аномалий сформированного прикуса: Автореф. дис..... д-ра мед. наук. – Минск, 2004.-43с.

2. Котляров В.С. Экспериментально-морфологическое исследование сравнительного действия ультразвуков разной частоты на уровне гистофизиологической микросистемы: Автореф. дис. на соиск. учён. степ. д-ра мед. наук. Киев, 1990.-36с.

3. Наумович С.А. Особенности ортодонтического лечения зубочелюстных аномалий при сформированном прикусе // Здравоохранение Беларуси.-1994-№6.-С.12-15.

4. Наумович С.А. Повышение эффективности комплексного (ортопедо-хирургического) лечения аномалий и деформаций зубочелюстной системы в сформированном прикусе: Автореф. дис. ...д-ра мед. наук: 14.00.21/ Бел.гос.мед.ун-т.-Минск, 2001.-42с.

5. Улащик В.С. Низкочастотный ультразвук: действие на организм, лечебное применение и перспективы исследования // Вопр. курортологии, физиотерапии и леч. физкультуры.-2000.-№6.-С. 3-8.