

УДК 1611.018.43:577.112:616.718.5/6-003.931-092.9

ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ И КОСТНЫХ ЭКСТРАКТОВ ПРИ ИНЪЕКЦИЯХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОСТНЫХ БЕЛКОВ В ЗОНУ ПЕРЕЛОМА БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ У КРЫС

А.Н. Накоскин, Н.В. Накоскина

Российский научный центр
«Восстановительная травматология и
ортопедия» им. академика
Г.А. Илизарова Министерства
здравоохранения Российской
Федерации, Россия, 640014, г. Курган,
ул. М. Ульяновой, 6
E-mail: Nakoskin_a@mail.ru,
Tatika1981@mail.ru

В данном исследовании мы изучали влияние локального введения экстракта низкомолекулярных белков костной ткани на биохимические показатели костного метаболизма у крыс. В зону смоделированного перелома голени у крыс вводился раствор низкомолекулярных белков, выделенных из костной ткани быков. Установлено, что введение низкомолекулярной фракции костных белков имеет системное действие. Изменяется активность фосфатаз, указывающая на метаболический сдвиг остеорепаративных процессов. Введение белков увеличивает количество минеральных компонентов кости в зоне перелома.

Ключевые слова: остеорепаративные процессы, перелом, низкомолекулярные костные белки.

Введение

Переломы костей голени занимают, по различным данным, первое место, составляя от 13 до 21.4% от всех травм костно-мышечной системы [1–3] или 64.3–70% от переломов костей нижних конечностей [4–6]. Сращение переломов костей является актуальной задачей [7–9]. Одним из перспективных направлений в управлении регенеративными процессами при переломе длинных трубчатых костей является использование низкомолекулярных белковых факторов. Кость благодаря своему остеогенному потенциалу, является сырьем для их получения и использования в качестве агентов для регуляции костной репарации.

Целью настоящего исследования является изучение влияния локального введения экстракта белков костной ткани на биохимические показатели костного метаболизма.

Объекты и методы исследования

Исследования проведены на 48 крысах линии Вистар в возрасте 6 месяцев. Животные были разделены на 3 группы. Первая (n=24) – контрольная группа, без применения белкового препарата, вторая (n=18) – опытная группа с введением в зону перелома белкового препарата, третья (n=6) – интактные животные. Животным контрольной и опытных групп моделировали перелом большеберцовой кости с сохранением целостности малоберцовой кости. Перелом фиксировали четырьмя консольными спицами, проведенными по две дистальнее и проксимальнее места перелома. Концы спиц армировали медной проволокой и придавали жесткость конструкции термопластичной акриловой пастой. Содержание, оперативное вмешательство и вывод из опыта проводили на различных этапах эксперимента: 7, 14, 21 и 28 сутки после операции. Эвтаназию мелких лабораторных животных проводили под рометар-золетилловым наркозом декапитацией. Все экспериментальные исследования проводили, руководствуясь требованиями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986 г.), с соблюдением этических норм и гуманного отношения к объектам изучения [10]. На седьмые сутки после операции в зону перелома животным контрольной группы вводили 0.2 мл раствор хлористого натрия в концентрации 0.9%. Опытной группе животных в зону перелома вводили 0.2 мл раствора белков, не имеющих сродства к ионообменникам, в дозе 10 мг/кг веса. Способ экстракции костных белков приведен в результатах исследования.

Исследование биохимических показателей проводили в сыворотке крови и в водном экстракте участка кости из зоны перелома и смежного участка большеберцовой кости контра-латеральной конечности. Экстракцию водорастворимых компонентов кости проводили следующим образом-навеску костной ткани растирали в ступке в присутствии 1 мл хлористого натрия в концентрации 0.9%. Полученный экстракт использовали для биохимических исследований.

В костных гомогенатах и в сыворотке крови крыс оценивали минеральный обмен по концентрации общего кальция, неорганического фосфата, магния, хлоридов. Остеорепаратив-



ные процессы в ходе эксперимента оценивали по уровню активности сывороточных ферментов: общей щелочной фосфатазы (ОЩФ) и тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы (ТрКФ). Рассчитали индекс фосфатаз (ЩФ/ТрКФ), показывающий соотношение остеосинтетической и остеолитической фазы репаративного остеогенеза. Состояние энергетического обмена оценивали по содержанию в сыворотке крови молочной кислоты (МК), активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинкиназы (КК), пирувата (ПВК), общего белка (ОБ).

Исследования сыворотки крови проводили с использованием автоматического биохимического анализатора HITACHI 902 (США), анализатора Stat Fax® 1904 Plus (США) и наборов фирмы «Vital Diagnostics» (Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью методов непараметрической статистики: вычисляли критерий Крускала-Уоллиса (для установления статистически значимых различий между несколькими группами), медианный тест, критерий Данна (используется при различных и одинаковых объемах выборок) [11], используя программы «Microsoft Excel – 97» и «AtteStat» Версия 1.0 [12].

Результаты и их обсуждение

Для исследования использовали фракцию костных белков, выделенных по следующей схеме. Свежую кортикальную кость диафиза бедренной кости быков замораживали при -70°C и очищали от надкостницы и костного мозга. Затем измельчали под прессом в среде жидкого азота. Для выделения белков использовали фракцию размером менее 1 мм. Навеску кости заливали 0.1 н. раствором хлороводородной кислоты, вводя в раствор 20 мг йодоуксусной кислоты для блокирования активности протеолитических ферментов, и деминерализовали при температуре 4°C до постоянного значения рН среды. Затем полученный раствор центрифугировали и диализовали против дистиллированной воды до отсутствия в противодиализате хлорид-ионов по реакции с нитратом серебра. Для диализа использовали диализный мешок с двумя мембранами CelluSep: внутренняя мембрана с диаметром пор для белков с молекулярным весом 14 кДа, внешняя с диаметром пор 3.5 кДа. Для хроматографической очистки использовали раствор из межмембранного пространства. Для хроматографической очистки получаемой фракции использовали систему ВЭЖХ Simadzu с препаративными колонками для гелепроницающей хроматографии Sorex Protein KW-2002.5. Колонку калибровали наборами маркеров молекулярного веса Sigma в диапазоне молекулярных весов 6.5–200 кДа. Хроматографическую очистку вели при давлении 5–7 МПа в буферном растворе трисоксиметиламинометан-НСI концентрацией 0.1 М и рН=7.2, собирая фракцию от 5–10 кДа. Далее полученную фракцию концентрировали лиофильным высушиванием на низкотемпературной вакуумной сушке НЕТО LyoLab 3000. Далее полученную смесь белков последовательно очищали на ионообменных колонках Shodex IEC-SP-2825 и IEC QA-2825 в том же трисовом буфере и градиенте концентрации натрия хлорида 0→50 мМ. При этом собирали фракцию, не имеющую сродства к ионообменникам. Полученную фракцию так же диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Лиофильно высушенные белки герметично упаковывали в стеклянные флаконы и перед введением экспериментальным животным стерилизовали потоком быстрых электронов дозой 18+5 кГр на ускорителе ЛУЭ-8-5М.

В используемой фракции определяли количество клеточных некоторых цитокинов наборами реагентов фирмы INVITROGEN, иммунологическим методом на приборе Tergo scientific (США). Биохимические показатели выделенной фракции представлены в таблице 1.

Таблица 1

Биохимические показатели состава полученной фракции

Биохимические показатели	мг%
Белок по Лоури	7.01
Коллаген по оксипролину	71.73
Уроновые кислоты	0.04
Сиаловые кислоты	0.015
IGF-1	0.6
EGF	49.4

По представленным данным можно заключить, что полученная фракция содержит в своем составе преимущественно низкомолекулярные дериваты коллагена и неколлагеновых белков костной ткани. Состав фракции белков представлен некоторым набором цитокинов.

Результаты биохимического исследования активности фосфатаз представлены в виде индекса фосфатаз и представлены на рисунке 1. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при введении в зону перелома крыс белкового препарата, не сорбирующегося на ионообменниках, индекс фосфатаз (ИФ = ЩФ/ТрКФ) в сыворотке крови контрольной группы был достоверно ниже экспериментальной. Данное обстоятельство свидетельствует о преобладании остеорепаративных процессов, протекающих в костной ткани, над резорбтивными.

ИФ = ЩФ/ТрКФ) в сыворотке крови контрольной группы был достоверно ниже экспериментальной. Данное обстоятельство свидетельствует о преобладании остеорепаративных процессов, протекающих в костной ткани, над резорбтивными.

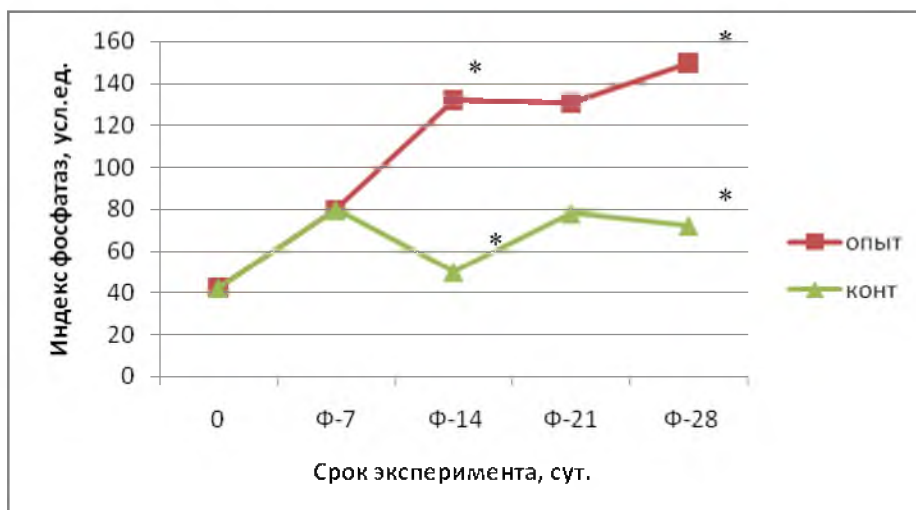


Рис. 1. Изменение индекса фосфатаз сыворотки крови крыс в ходе эксперимента:
 * – достоверные различия контрольной и опытной группы при уровне значимости $p < 0.01$ по критерию Данна

В костном водном экстракте нами также отмечены статистически значимые отличия между контрольной и опытной группами на всех сроках эксперимента: сначала резкое снижение, а затем рост активностей костных изоферментов кислой и щелочной фосфатаз с превалированием последней, соответственно рост фосфатазного индекса (ИФ = ЩФ/ТрКФ) с 14 суток иммобилизации до следующего этапа, что отражало ускорение костного ремоделирования, которое может сопровождаться потерей костной массы [13] (рис. 2).

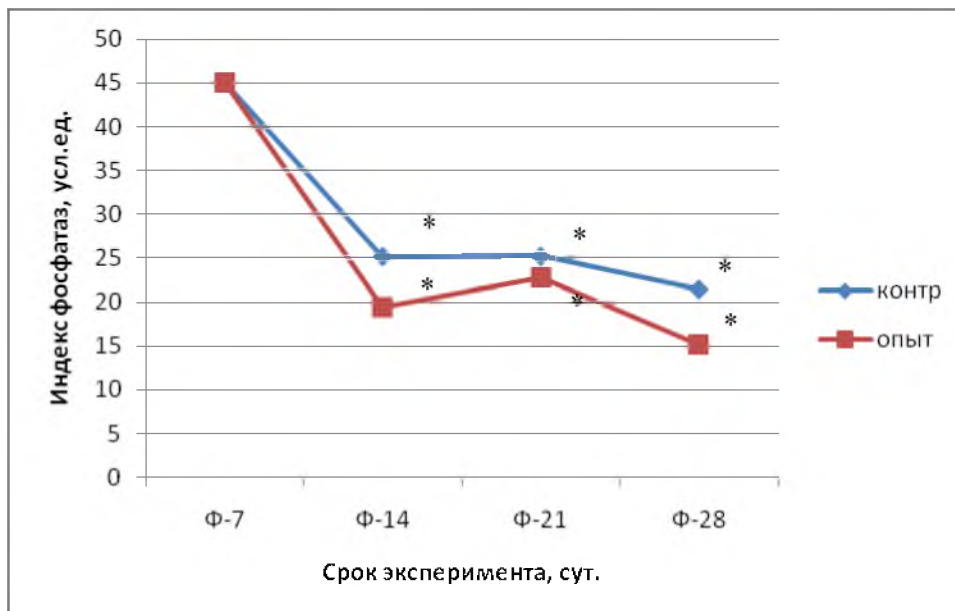


Рис. 2. Изменение индекса фосфатаз костного экстракта крыс в ходе эксперимента:
 * – достоверные различия контрольной и опытной группы при уровне значимости $p < 0.01$

Проведя анализ уровня электролитов в сыворотке крови крыс, при лечении переломов которых мы использовали белковый препарат, наблюдалось стойкое повышение концентрации неорганического фосфата, концентрация кальция оставалась практически на одном уровне. Нами выявлено статистически значимое отличие концентрации кальция и отношения Са/Р между контрольной и опытной группами (табл. 2).



Таблица 2

**Изменение содержания кальция и неорганического фосфата
в сыворотке крови крыс в ходе эксперимента**

Срок эксперимента	Уровень биохимических показателей		
	Кальций, ммоль/л	Фосфат, ммоль/л	Ca/P
Интактные (n=7)	2.3 (2.2÷2.8)	2.11 (1.97÷2.20)	1.16 (1.09÷1.27)
Ф-14 сут.	К (n=6) 2.64* (2.55÷2.97)	1.96* (1.89÷2.17)	1.40* (1.29÷1.42)
	О (n=6) 3.15 (2.82÷3.26)	2.17 (2.16÷2.20)	1.46 (1.30÷1.48)
Ф-21 сут.	К (n=6) 2.92 (2.90÷2.97)	2.04 (1.96÷2.22)	1.43 (1.30÷1.50)
	О (n=6) 2.99 (2.81÷3.20)	2.43 (2.18÷2.61)	1.17 (1.10÷1.39)
Ф-28 сут.	К (n=6) 3.19* (2.89÷3.39)	2.19* (2.10÷2.52)	1.35* (1.26÷1.57)
	О (n=6) 2.91 (2.80÷3.11)	2.48 (2.40÷2.57)	1.18 (1.13÷1.21)

Примечание: К – контрольная группа; О – опытная группа; * – достоверные различия контрольной и опытной группы при уровне значимости $p < 0.01$. Значения приведены в виде медианы (25-й ÷ 75-й перцентили).

По полученным данным индекс Ca/PO_4 в сыворотке крови контрольной группы оставался значимо высоким на всех сроках эксперимента, в то время как в опытной группе происходило снижение этого отношения. Снижение исследуемого отношения происходило за счет уменьшения количества кальция в сыворотке крови при практически неизменном количестве фосфата.

Снижение концентрации кальция в сыворотке крови на этапах эксперимента у животных опытной группы может объясняться его миграцией к зоне перелома. Данное обстоятельство подтверждается исследованием водного экстракта костной ткани представленного в таблице 3. На заключительных этапах эксперимента концентрация кальция в зоне перелома животных опытной группы была значимо выше, чем в контрольной.

Таблица 3

**Изменение содержания кальция и неорганического фосфата
в водном экстракте костной ткани крыс в ходе эксперимента**

Срок эксперимента	Кальций, мг/100г				Фосфат, мг/100г			
	КО	КК	ОО	ОК	КО	КК	ОО	ОК
Ф-7 сут.	6.16 (4.91÷ 18.54) n=3	5.84 (5.75÷ 5.92) n=3	6.16 (4.91÷ 18.54) n=3	5.84 (5.75÷ 5.92) n=3	19.65 (16.51÷ 32.83) n=3	23.66 (23.26÷ 24.05) n=3	19.65 (16.51÷ 32.83) n=3	23.66 (23.26÷ 24.05) n=3
	9.37* (7.84÷ 12.47) n=3	16.40 (15.15÷ 18.73) n=4	5.64* (4.95÷ 8.16) n=6	5.19 (3.72÷ 6.29) n=6	21.29* (17.22÷ 25.69) n=3	42.12 (38.75÷ 47.45) n=4	30.93* (27.71÷ 32.17) n=6	18.76 (13.54÷ 23.28) n=6
Ф-21 сут.	8.02* (6.02÷ 8.76) n=6	9.55 (9.34÷ 9.56) n=6	8.98* (7.58÷ 9.90) n=6	6.67 (4.69÷ 8.22) n=6	20.34* (18.58÷ 22.30) n=6	27.85 (25.89÷ 33.57) n=6	42.96* (40.40÷ 46.00) n=6	23.20 (19.05÷ 26.13) n=6
	3.61* (2.91÷ 7.88) n=5	6.61 (5.32÷ 10.74) n=4	7.22* (6.77÷ 8.39) n=3	3.11 (2.16÷ 4.67) n=4	12.57* (11.02÷ 23.22) n=5	26.88 (22.48÷ 36.62) n=4	41.26* (30.48÷ 47.88) n=3	15.02 (8.02÷ 27.84) n=4

Примечание: КО – контрольная группа оперированная конечность; КК – контрольная группа контралатеральная конечность; ОО – опытная группа оперированная конечность; ОК – опытная группа контралатеральная конечность; * – достоверные различия контрольной и опытной группы при уровне значимости $p < 0.01$. Значения приведены в виде медианы (25-й ÷ 75-й перцентили).

Анализ содержания основных макроэлементов костной ткани у крыс контрольной группы показал различный по абсолютной величине дефицит кальция, неорганического фосфата и магния в прооперированной конечности по сравнению с контралатеральной. В опытной группе наоборот наблюдалось накопление данных макроэлементов в прооперированной конечности, что, скорее всего, связано с действием применяемого препарата и активации процессов оссификации костной ткани.

Изменения концентрации Mg костной ткани у крыс контрольной и опытной группы однонаправлены: тенденции роста сменялись снижением. Однако, содержание Mg у крыс опытной группы было достоверно выше на всех этапах эксперимента по сравнению с кон-



трольной группой: на этапе Ф-14 сут. выше в 1.3 раза ($p < 0.01$), на этапе Ф-21 сут. в 2.4 раза ($p < 0.01$), на этапе Ф- 28 сут. в 3.2 раза ($p < 0.01$) (табл. 4).

Таблица 4

Изменение содержания магния в костной ткани крыс в ходе эксперимента

Срок эксперимента	Магний, мг/100г			
	КО	КК	ОО	ОК
Ф-7 сут.	3.23 (2.58÷4.31) n=3	4.09 (3.95÷4.23) n=2	3.23 (2.58÷4.31) n=3	4.09 (3.95÷4.23) n=2
Ф-14 сут.	3.62* (2.80÷4.30) n=3	6.05 (5.34÷7.67) n=4	4.67* (4.55÷5.43) n=6	3.73 (2.08÷4.69) n=6
Ф-21 сут.	3.16* (2.93÷4.25) n=6	4.83 (4.22÷5.39) n=6	7.69* (6.09÷9.48) n=6	5.08 (3.77÷7.79) n=6
Ф-28 сут.	2.01* (1.67÷4.07) n=5	4.61 (3.81÷6.25) n=4	6.42* (4.92÷7.93) n=3	2.24 (1.28÷3.71) n=4

Примечание: КО – контрольная группа оперированная конечность; КК – контрольная группа контралатеральная конечность; ОО – опытная группа оперированная конечность; ОК – опытная группа контралатеральная конечность; * – достоверные различия контрольной и опытной группы при уровне значимости $P < 0.01$. Значения приведены в виде медианы (25-й ÷ 75-й перцентили).

Об интенсивности углеводного обмена мы судили по изменению в сыворотке крови концентрации продуктов обмена углеводов: молочной (МК) и пировиноградной кислот (ПВК). В ходе эксперимента происходило накопление данных метаболитов и достигало максимума на 28 сутки периода фиксации, как в опытной, так и в контрольной группе. Это свидетельствует об увеличении интенсивности углеводного обмена в тканях при травме. Нами отмечено повышение концентрации креатинкиназы и лактатдегидрогеназы, особенно на 14 сутки эксперимента для ЛДГ, как в контрольной, так и в опытной группе. Динамика ферментативной активности КК и ЛДГ представлена на рис. 3.

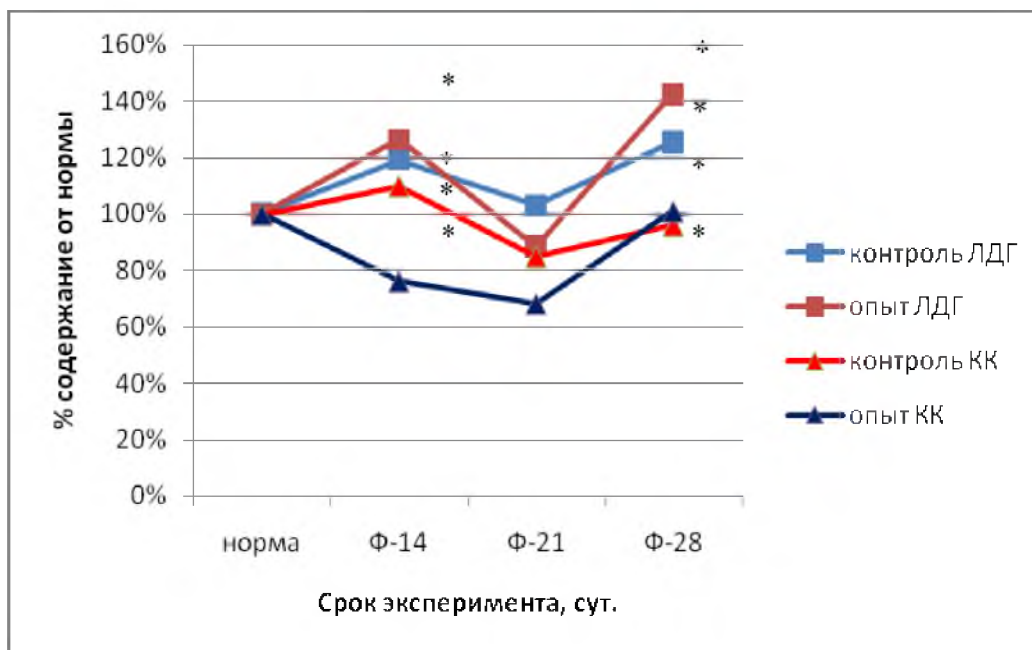


Рис. 3. Изменение активности креатинкиназы (КК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови крыс в ходе эксперимента: * – достоверные различия контрольной и опытной группы при уровне значимости $P < 0.01$

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод о положительном влиянии белкового препарата на репаративный остеогенез в зоне перелома. Максимальная активность процесса приходилась на 14 сутки этапа фиксации. Высокая интенсивность процессов репарации поддерживалась за счет активных биохимических процессов энергообеспечения.

Список литературы

1. Агаджанян В.В., Пронских А.А., Орлов А.Н. Наш опыт лечения закрытых диафизарных переломов костей голени // Травматология и ортопедия России. – 1998. – №2. – С. 7–10.
2. Сидоркина А.Н. Биохимические аспекты травматической болезни и её осложнений. – Н. Новгород: ФГБУ «ННИИТО Росмедтехнологий». – 2009. – 148 с.
3. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия. – М.: Мед. лит. – 2010. – 624 с.
4. Анкин Л.Н., Анкин Н.Л. Практическая травматология (европейские стандарты диагностики и лечения). – М.: Книга-плюс. – 2002. – 480 с.
5. Лечение больных с двойными переломами костей голени методом чрескостного остеосинтеза / С.И. Швед, А.Г. Карасев, А.А. Свешников, Л.А. Смотров // Гений ортопедии. – 1999. – №3. – С. 59–63.
6. Харкович И.И., Мухля А.М. Структура инвалидности при нарушениях репаративного остеогенеза диафизарных переломов костей голени // Мед. новости. – 1999. – №7. – С. 42–44.
7. Биохимические показатели в оценке репаративного остеогенеза у пациентов с различными типами скелетной травмы / С.Н. Лунева, Е.А. Ткачук, М.В. Стогов // Гений ортопедии. – 2010. – №1. – С. 112–115.
8. Талашова И.А., Осипова Е.В., Кононович Н.А. Сравнительная количественная оценка репаративного процесса при имплантации биокомпозиционных материалов в костные дефекты // Гений ортопедии. – 2012. – №2. – С. 68–71.
9. Власов В.В. Реакция организма на внешние воздействия: общие закономерности развития и методические проблемы исследования. – Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та, 1994. – 344 с.
10. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопр. реконструктив. и пласт. хирургии. – 2003. – №4. – С. 34–36; 2004. – №1. – С. 20–36; 2004. – №2. – С. 29–31.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
12. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel. VBA и C/C ++. – СПб.: БХВ–Петербург, 2004. – 512 с.
13. Долгов В.В., Ермакова И.П. Лабораторная диагностика обмена костной ткани // Остеопороз и остеопатии. – 2000. – №4. – С. 29–39.

CHANGES IN BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD SERUM AND BONE EXTRACTS AT INJECTION LOW-MOLECULAR BONE PROTEINS ZONE TIBIAL FRACTURES IN RATS

A.N. Nakoskin, N.V. Nakoskina

Academician Ilizarov Russian Scientific Center "Restorative Traumatology and Orthopaedics" of RF Ministry of Health, 6 M. Ulyanova St, Kurgan, 640014, Russia

*E-mail: Nakoskin_a@mail.ru;
Tatika1981@mail.ru*

In this study, we investigated the effect of topical administration of the extract of low-molecular bone proteins on bone biochemical parameters of bone metabolism in rats. Solution of low-molecular proteins isolated from the bone tissue of oxen. It has been established that the injection a low molecular weight fraction of bone proteins has a systemic effect. Phosphatase activity, indicating a metabolic shift of osteoreparative processes, changes. Injection of proteins increases the amount of mineral components of the bone in the fracture zone.

Keywords: bone, osteoreparative processes, low molecular weight proteins of bone.