

УДК [611.018.4:612.398.12:616.001.5-003.93]-092.9

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕГЕНЕРАЦИИ
И ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ
КОСТНЫХ ЭКСТРАКТОВ В ЗОНУ ПЕРЕЛОМА**

Накоскина Н.В., Накоскин А.Н.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курган, e-mail: Tatika1981@mail.ru, Nakoskin_A@mail.ru

Выделен экстракт низкомолекулярных костных белков из костной ткани быков. В эксперименте на животных показано влияние выделенных белков на изменение биохимических показателей сыворотки крови. Рассчитан индекс фосфатаз, указывающий на преобладание процессов костеобразования над процессами резорбции, протекающих в костной ткани при сращении перелома. По содержанию кальция и неорганического фосфата проведена оценка минерального обмена, указывающая на снижение концентрации кальция в сыворотке крови на этапах эксперимента у животных опытной группы и его накопление в зоне перелома. Отмечена интенсивность углеводного обмена при травме.

Ключевые слова: перелом, остеорепаративные процессы, низкомолекулярные костные белки

**EXPERIMENTAL BIOCHEMICAL VALUES OF REGENERATION
AND ENERGY SUPPLY IN THE SERUM WITH LOCAL INTRODUCTION
OF BONE EXTRACTS INTO THE FRACTURE SITE**

Nakoskina N.V., Nakoskin A.N.

Federal State-Financed Institution «Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopedics» of the RF Ministry of Healthcare, Kurgan, e-mail: Tatika1981@mail.ru, Nakoskin_A@mail.ru

Extract of low molecular proteins was excreted from bovine bone tissue. The experiment showed changes in biochemical values of blood serum as a reaction to excreted proteins. Phosphatase index was calculated and indicated to prevalence of bone formation processes over resorption processes that occurred in the bone tissue during fracture healing. Calcium and inorganic phosphate content was assessed in mineral metabolism and indicated to decrease in calcium concentration in blood serum at stages of experiment in animals of experimental group and its increase at the fracture site. Intensity of carbohydrate metabolism in trauma cases was observed.

Keywords: fracture, osteoreparative processes, low molecular proteins

В настоящее время с каждым годом увеличивается количество и тяжесть травм, врожденных и приобретенных дефектов костей. Лечение этих заболеваний связано с регенерацией костной ткани и является длительным и дорогостоящим процессом [1, 6, 9]. Ускорение сращения переломов костей и возмещения костных дефектов является актуальной задачей современной медицины [2, 10, 3]. Одним из перспективных направлений в управлении регенеративными процессами при переломе длинных трубчатых костей является использование низкомолекулярных белковых факторов [7, 8].

Цель исследования: изучить изменения некоторых биохимических показателей в сыворотке крови крыс при локальном введении костных белков в зону перелома на различных этапах эксперимента.

Материалы и методы исследования

Биохимические исследования проведены на 42 крысах линии Вистар в возрасте 6 месяцев. Экспе-

риментальные животные были поделены на 3 группы. Первая ($n = 18$) – 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-золотиловым 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 [5]. 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 средства к ионообменникам, в дозе 10 мг/кг веса.

Объектом исследования служила сыворотка крови, которую получали центрифугированием цельной крови при 3000 об./мин.

Остеорепаративные процессы в ходе эксперимента оценивали по уровню активности сывороточных ферментов: общей щелочной фосфатазы (ОЩФ) и тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы (ТрКФ). В сыворотке крови крыс оценивали минеральный обмен по содержанию кальция и неорганического фосфата. Состояние энергетического обмена оценивали по содержанию в сыворотке крови молочной кислоты (МК), пирувата (ПВК), общего белка (ОБ).

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

Для исследования использовали экстракт низкомолекулярных костных белков, выделенных следующим образом. Кортикальную кость диафиза бедренной кости быков замораживали при -70°C и очищали от надкостницы и костного мозга, 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. Для диализа использовали диализный мешок с двумя мембранами CelluSep. Для хроматографической очистки получаемой фракции использовали систему ВЭЖХ Shimadzu с препаративными колонками для гелепроникающей хроматографии Sorex Protein KW-2002.5. Далее полученную смесь белков последовательно очищали на ионообменных колонках Shodex IEC-SP-2825 и IEC QA-2825 в трисовом буфере и градиенте концентрации натрия хлорида $0 \rightarrow 50$ мМ. При этом собирали фракцию, не

имеющую средства 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 некоторых клеточных цитокинов наборами реагентов фирмы INVITROGEN, иммунологическим методом на приборе Termo scientific (США). Биохимические показатели полученной фракции представлены: белок по Лоури 7,01 мг%, коллаген по оксипролину 71,73 мг%, уроновые кислоты 0,04 мг%, сиаловые кислоты 0,015 мг%, IGF-1 0,6 мг%, EGF 49,4 мг%. Таким образом, полученная фракция содержит в своем составе преимущественно низкомолекулярные дериваты коллагена и неколлагеновых белков костной ткани.

Результаты эксперимента обрабатывались методами непараметрической статистики, для описания данных использовались медиана, 25-й...75-й перцентили [4]. Для оценки достоверности различий между выборками применяли непарный критерий Вилкоксона при уровне значимости $p < 0,01$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки остеорепаративных процессов в зоне перелома мы рассчитывали индекс фосфатаз $\text{ИФ} = \text{ЩФ}/\text{ТрКФ}$, показывающий соотношение остеосинтетической и остеолитической фазы репаративного остеогенеза. Полученные нами данные биохимического исследования активности фосфатаз указывают на то, что при введении в зону перелома крыс белкового препарата, не сорбирующегося на ионообменниках, ИФ в сыворотке крови контрольной группы был достоверно ниже экспериментальной при уровне значимости $p < 0,01$ (рис. 1).

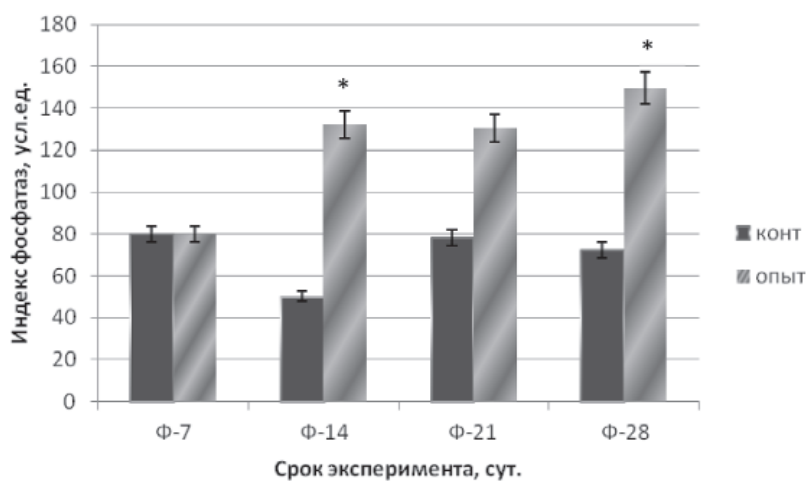


Рис. 1. Изменение индекса фосфатаз в сыворотке крови крыс.

Примечание. Конт. – контрольная группа; опыт – опытная группа; * – достоверные различия контрольной и опытной группы на одном сроке эксперимента при уровне значимости $p < 0,01$

Это обстоятельство указывает на преобладание процессов костеобразования над процессами резорбции, протекающими в костной ткани при сращении перелома.

Проведя анализ уровня электролитов в сыворотке крови крыс, авторами выявили статистически значимое отличие концентрации кальция и отношения Ca/PO_4 между контрольной и опытной группами. При применении белкового препарата наблюдалось стойкое повышение концентрации неорганического фосфата, концентрация кальция оставалась практически на одном уровне (рис. 2).

Из полученных данных видно, что индекс Ca/PO_4 в сыворотке крови контрольной группы оставался высоким на всех сроках эксперимента, в то время как в опытной группе происходило снижение этого отношения.

Снижение исследуемого индекса 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 связано с его накоплением в зоне перелома.

По изменению в сыворотке крови концентрации продуктов обмена углеводов: молочной (МК) и пировиноградной кислот (ПВК) авторы судили об интенсивности углеводного обмена. В ходе эксперимента происходило накопление данных метаболитов и достигало максимума на 28 сутки периода фиксации, как в опытной, так и в контрольной группе. Этот факт свидетельствует об увеличении интенсивности углеводного обмена в тканях при травме (рис. 3).

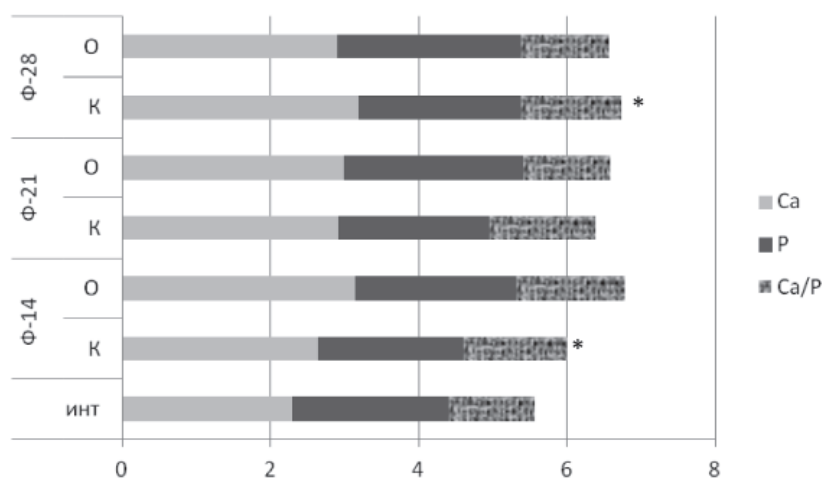


Рис. 2. Изменение содержания электролитов в сыворотке крови крыс в ходе эксперимента. Примечание. К – контрольная группа; О – опытная группа; Инт. – интактные животные; * – достоверные различия контрольной и опытной группы при уровне значимости $p < 0,01$

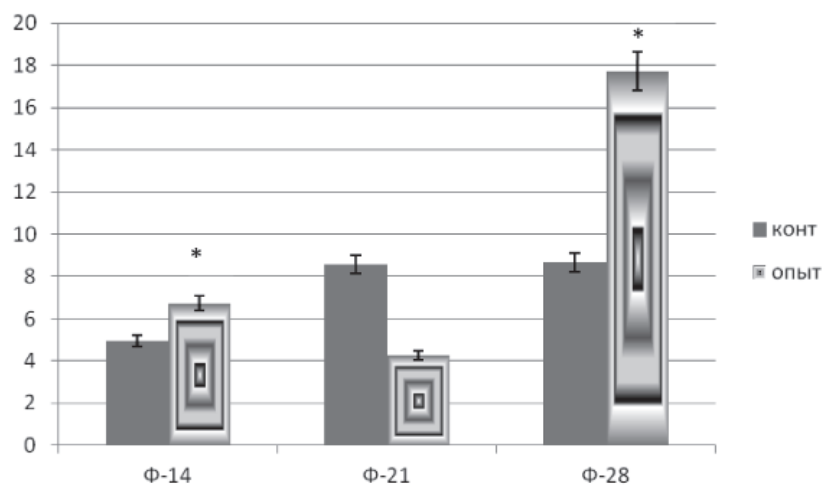


Рис. 3. Изменение содержания МК/ПВК в сыворотке крови крыс в ходе эксперимента. Примечание. * – достоверные различия контрольной и опытной группы при уровне значимости $p < 0,01$

Выводы

1. В опытной группе изменение активности фосфатаз сыворотки крови при локальном введении костных белков в зону перелома указывает на преобладание процессов костеобразования над процессами резорбции по сравнению с контрольной группой при $p < 0,01$.

2. Накопление МК и ПВК свидетельствует об интенсивности энергообмена в тканях при травме. Активные биохимические процессы энергообеспечения способствуют более интенсивному восстановительному процессу.

3. Локальное введение костных белков в зону перелома у животных опытной группы приводит к снижению концентрации кальция в сыворотке крови на этапах эксперимента и активному накоплению его в зоне перелома.

Список литературы

1. Анкин Л.Н., Анкин Н.Л. Практическая травматология (европейские стандарты диагностики и лечения). – М.: Книга-плюс. – 2002. – 480 с.
2. 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.
3. Власов В.В. Реакция организма на внешние воздействия: общие закономерности развития и методические проблемы исследования. – Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та, 1994. – 344 с.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
5. 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; № 2. – С. 29–31.
6. 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.
7. Лунева С.Н. Комплекс низкомолекулярных белков костной ткани и его влияние на регенерацию кости / С.Н. Лунева, А.Н. Накоскин, И.А. Талашова, Е.В. Осипова, Е.Н. Овчинников // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. XX, № 1. – С. 28–31.
8. Мельников С.А., Накоскин А.Н., Лунева С.Н. Исследование изменений биохимических маркеров остеогенеза при внутрибрюшинном введении препаратов низкомолекулярных белков костной ткани быка на разных этапах сращения перелома голени у лабораторных мышей // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2014. – № 1. Публикация 2–102. – URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4940.pdf>.
9. Структура инвалидности при нарушениях репаративного остеогенеза диафизарных переломов костей голени / И.И. Харкович, А.М. Мухля // Мед. новости. – 1999. – № 7. – С. 42–44.
10. 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.