

ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА КОСТНОЙ ТКАНИ КРОЛИКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ «АЛЛОГЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА»

© 2015 Е.В. Писарева¹, М.Ю. Власов², Л.Т. Волова²

¹ Самарский государственный университет

² Самарский государственный медицинский университет

Статья поступила в редакцию 23.10.2015

Создание новых кальций-фосфатных биосовместимых материалов и изучение их влияния на обменные процессы в костной ткани является одним из важных направлений в медицинской практике. В статье приводятся экспериментальные данные о влиянии внутримышечного введения гидроксиапатита естественного происхождения на некоторые показатели обмена костной ткани кроликов.

Ключевые слова: костная ткань, биоматериалы, гидроксиапатит, оксипролин

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в медицинской практике все более широкое распространение получают биосовместимые материалы, содержащие неорганические компоненты, например, искусственно синтезированный гидроксиапатит (ГАП), который может быть получен вместе с белком коллагеном и микроэлементами или в чистом виде. Относительно недавно было выявлено, что материалы на основе гидроксиапатита и его аналогов не вызывают реакции отторжения и обладают способностью активно связываться со здоровой костной тканью без каких-либо нежелательных последствий [1, 2].

Препараты, основу которых составляет ГАП, усиливают образование костной ткани, не вызывают реакции отторжения и являются биологически совместимыми с тканями организма. После введения препарата в костные полости, он не затвердевает и не рассасывается, а с течением времени замещается на полноценную и здоровую костную ткань. Установлено, что гидроксиапатит, выделенный из костной ткани человека и животных, содержит в своем составе наночастицы и микроэлементы [3, 4], в связи с чем применение натурального ГАП естественного происхождения имеет преимущества перед применением синтетического аналога. Развитие нанотехнологий способствует созданию принципиально новых веществ и наноструктур, обладающих уникальными свойствами. Биосовместимые минеральные кальций-фосфатные соединения дают новый импульс к изучению путей

и возможностей применения частиц наноразмеров в качестве новых материалов в различных областях биологии и медицины [5-7].

Для успешного применения материала, предназначенного для имплантации, необходимо изучение реакции костной системы в ответ на его введение. Особое значение имеет изучение показателей кальциевого обмена и метаболитов коллагена, в связи с чем было проведено настоящее исследование.

Цель исследования. Оценить влияние эктопического введения аллогенного гидроксиапатита на метаболические показатели костной ткани кроликов.

Материалы и методика исследований. Эксперимент проводили на 36 половозрелых кроликах (самцах) массой 3-4 кг. Их содержание и вывод из эксперимента происходили согласно биоэтическим нормам. Животные были разделены на две группы. Длительность эксперимента в первой группе составляла 14 суток, во второй – 28 суток.

В каждой группе выделяли интактных животных (контроль) и животных, которым однократно внутримышечно вводили ГАП в дозе 10 мг/кг и 100 мг/кг массы тела, а также группу плацебо – животных, которым делали инъекции физиологического раствора. Суспензии стерильного ГАП в изотоническом растворе хлорида натрия однократно вводили в бедренные мышцы кроликов с помощью одноразового шприца. ГАП получали по методике, разработанной нами ранее при значениях pH 12 из солянокислых растворов деминерализатов костной ткани [8].

В моче и сыворотке крови определяли общий оксипролин (ООП), свободный оксипролин (СОП), пептидно-связанный оксипролин (ПСОП) и белково-связанный оксипролин (БСОП).

Определение оксипролина проводили колориметрически [9]. Для проведения биохимических исследований метаболизма костной ткани у животных собирали кровь. В сыворотке крови

Писарева Елена Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии. E-mail: pella1@rambler.ru

Власов Михаил Юрьевич, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник. E-mail: mvlasov1@rambler.ru

Волова Лариса Теодоровна, доктор медицинских наук, профессор, директор Института экспериментальной медицины и биотехнологий. E-mail: csrl.sam@mail.ru

определяли содержание общего и ионизированного кальция, уровень кальцитонина, остеокальцина и активность щелочной фосфатазы.

Определение общего и ионизированного кальция в сыворотке крови проводили на ионоселективном анализаторе COBAS INTEGRA-400. Исследование уровня кальцитонина и остеокальцина было проведено на автоматическом иммунохимическом анализаторе LIAISON. Определение щелочной фосфатазы проводилось на биохимическом анализаторе COBAS INTEGRA-200.

Полученные в работе данные были статистически обработаны при помощи программы Microsoft Excel. Обработка результатов включала в себя: вычисление средней арифметической, среднего квадратического отклонения, ошибки средней арифметической и критерия достоверности. Для оценки достоверных различий средних значений применяли t-критерий Стьюдента. Различие между средними величинами считали достоверным при $p \leq 0,05$ [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оксипролин является чувствительным тестом поврежденной костной ткани. Повышение оксипролина с мочой обуславливается главным образом деструкцией и усилением костного метаболизма. Поскольку половина всего количества коллагена находится в костях, где его метаболизм происходит быстрее, чем в других тканях, предполагается, что экскреция оксипролина с мочой отражает процесс резорбции кости. Исследование содержания его фракций в биологических жидкостях является доступным маркером оценки состояния коллагена [11].

Продукты деградации коллагена можно определять как в моче, так и в сыворотке крови. Распад коллагена – единственный источник свободного оксипролина в организме. Преобладающая часть оксипролина подвергается катаболизму, а часть выделяется с мочой. Поэтому содержание оксипролина в крови и моче отражает баланс скорости катаболизма коллагена [12].

При изучении содержания оксипролина в сыворотке крови исследуемых животных были получены следующие данные.

Уровень СОП на 14 и 28 сутки в контрольных группах составил $13,1 \pm 1,8$ и $15,7 \pm 2,3$ мкг/мл соответственно. Внутримышечное введение ГАП при этом не вызывало достоверных изменений содержания СОП во всех группах животных. Максимальная концентрация свободной аминокислоты составила $16,9 \pm 3,2$ мкг/мл через 28 дней в сыворотке кроликов, которым вводили ГАП в дозе 100 мг/кг.

Концентрация ПОП в контрольных группах составила $19,6 \pm 2,4$ и $33,3 \pm 2,7$ мкг/мл. Введение ГАП в дозе 100 мг/кг приводило к повышению ПОП до $42,8 \pm 3,4$ и $40,2 \pm 2,9$ мкг/мл, однако эти изменения не являлись статистически достоверными. У кроликов, которым делали внутримышечные инъекции ГАП в дозе 10 мг/кг, уровень ПОП изменялся еще незначительнее.

Через 14 суток отмечено достоверное увеличение концентрации ООП по сравнению с показателями контрольной группы на 18% при введении гидроксипатита в дозе 100 мг/кг, которое происходит за счет фракции БСОП (табл. 1, 2). Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными и свидетельствуют о преобладании процесса синтеза коллагена в костной ткани над процессами его биодеградации [13].

Таблица 1. Содержание общего оксипролина в сыворотке крови кроликов после внутримышечного введения гидроксипатита, (мкг/мл)

Срок эксперимента	контроль	10 мг/кг	100 мг/кг
14 суток	$539,3 \pm 19,7$	$547,4 \pm 27,7$	$637,3 \pm 21,7^*$
28 суток	$604,6 \pm 22,7$	$531,1 \pm 11,5^*$	$571,9 \pm 23,1$

*- отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,05$

Таблица 2. Содержание белково-связанного оксипролина в сыворотке крови кроликов после внутримышечного введения гидроксипатита, (мкг/мл)

Срок эксперимента	контроль	10 мг/кг	100 мг/кг
14 суток	$506,5 \pm 10,7$	$506,5 \pm 36,2$	$580,1 \pm 15,2^*$
28 суток	$555,6 \pm 19,7$	$490,2 \pm 17,7$	$514,7 \pm 11,7$

*- отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,05$

Количество ООП в моче кроликов при введении гидроксиапатита в дозе 10 и 100 мг/кг массы тела не отличалось от показателей контрольной группы через 14 суток после введения препарата. Через 28 суток нами отмечено достоверное увеличение содержания ООП до $147,1 \pm 8,5$ мкг/мл при контрольном значении $122,1 \pm 6,8$ мкг/мл в группе кроликов, которым делали инъекции ГАП в дозе 100 мг/кг. Уровень БСОП у кроликов, которым делали инъекции ГАП в дозе 10 мг/кг, также возрос по сравнению с контролем через 28 суток. Показатели составили $106,2 \pm 5,1$ и $86,6 \pm 6,3$ мкг/мл (рис. 1).

После нагрузки кальцием количество оксипролина в моче снижается и коррелирует со степенью деструкции кости и интенсивностью ее метаболизма.

Известно, что только 1 % оксипролина находится в моче в свободном виде, а остальные 99 % являются компонентами пептидов [14]. Поэтому при нарушении метаболизма соединительной ткани увеличивается экскреция оксипролина с мочой и содержание его свободной фракции, уменьшается содержание связанной фракции. Поскольку в нашем эксперименте количество ПОП

значительно выше, чем СОП, мы можем говорить о отсутствии патологического процесса (рис. 2).

Коллаген – основной компонент соединительной ткани, биохимическим маркером которого является оксипролин. Уровень БСОП отражает активность пролиферативных процессов в соединительнотканной строме органов, а увеличение концентрации СОП и ПОП свидетельствует о выраженных процессах разрушения коллагеновых структур внеклеточного матрикса в печени. Так как содержание СОП и ПОП достоверно не отличаются от контроля, можно сделать вывод об отсутствии разрушения коллагеновых структур.

Показатели ООП при введении ГАП не отличались от контроля через 14 суток, лишь наблюдается его небольшой рост, который не является достоверным. Увеличение общего оксипролина происходит за счет фракции связанного, что свидетельствует о преобладании процессов синтеза над процессами резорбции при remodelировании кости.

Показатели группы плацебо не отличались от показателей животных, находящихся в контрольной группе.

Содержание общего кальция в контрольных и экспериментальных группах статистически

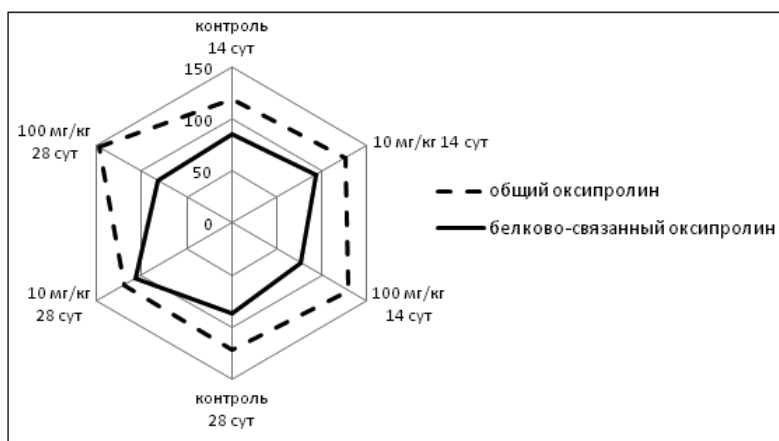


Рис. 1. Содержание белково-связанного и общего оксипролина в моче кроликов после введения гидроксиапатита, мкг/мл

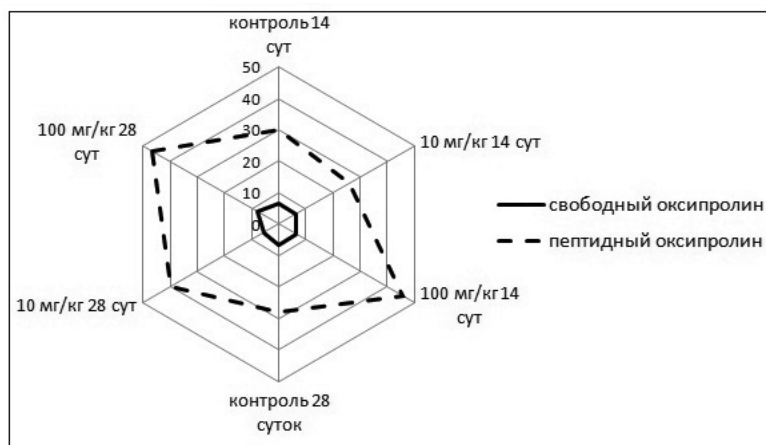


Рис. 2. Содержание свободного и пептидно-связанного оксипролина в моче кроликов после внутримышечного введения гидроксила, мкг/мл

значимо не отличалось на всем протяжении эксперимента и находилось в пределах нормы. У контрольных животных данный показатель составил $3,44 \pm 0,32$ и $3,90 \pm 0,33$ ммоль/л.

Содержание в крови ионизированного кальция адекватнее отражает метаболизм кальция в организме по сравнению с общей фракцией и является основным регулятором клеточного метаболизма костной ткани. Следует отметить, что уровень ионизированного кальция в экспериментальных группах также не отличался от контрольных групп животных и находился в пределах нормы.

Как говорилось ранее, выработка кальцитонина зависит от уровня ионизированного кальция в крови. Так как уровень кальция находился в пределах нормы, следует отметить, что и уровень кальцитонина в различных группах экспериментальных и контрольных животных находился в пределах нормы.

Отмечено незначительное увеличение кальцитонина в группе животных, которым однократно был введен препарат в дозе 100 мг/кг массы тела (табл. 3), что, вероятно, связано с применением ГАП, так как в его состав входят ионы кальция. Уровень кальцитонина при введении кроликам гидроксиапатита в дозе 10 мг/кг и 100 мг/кг массы тела через 14 суток составлял 1,34 пг/мл и 1,44 пг/мл, а уровень остеокальцина – 6,33 нг/мл и 6,25 нг/мл соответственно, что соответствует значениям нормы.

В связи с тем, что остеокальцин напрямую отражает интенсивность костного обмена, результаты его количественного определения хорошо коррелируют с текущим статусом костного метаболизма кроликов. По результатам проведенного анализа уровень остеокальцина в крови экспериментальных и контрольных животных также оказался в пределах нормы. Уменьшение уровня остеокальцина у животных с различной дозой введенного препарата по сравнению с контрольной группой свидетельствует о том, что не нарушена работа остеобластов и не происходит резорбции костной ткани.

Преимуществом остеокальцина перед другими биохимическими маркерами является его

специфичность по отношению к заболеваниям костной ткани. Его концентрация может служить полезным показателем эффективности лечения заболеваний, связанных с разрушением структуры костной ткани.

Определение активности щелочной фосфатазы имеет дифференциально-диагностическое значение. В крови щелочная фосфатаза представлена смесью различных изоферментов, самыми важными из которых являются печеночный и костный. Так как эксперимент проводился на здоровых животных, следует исключить заболевания печени, и в таком случае повышение активности ЩФ может указывать на изменение в костной ткани.

При определении щелочной фосфатазы было установлено, что активность фермента в контрольных и экспериментальных группах значительно не изменяется, что в свою очередь может свидетельствовать о том, что введенный препарат негативно не влияет на изменения метаболизма костной ткани животных на данных сроках эксперимента.

Из литературных данных известно, что изофермент щелочной фосфатазы присутствует на клеточной поверхности остеобластов. При увеличенном синтезе фермента клетками костной ткани повышается его количество и в крови, поэтому определение активности щелочной фосфатазы, является информативным показателем костного ремоделирования [16]. При введении кроликам гидроксиапатита в дозе 10 мг/кг и 100 мг/кг через 14 дней эксперимента активность щелочной фосфатазы оставались в пределах нормы и составляла соответственно $81,5 \pm 6,6$ МЕ/л и $83,0 \pm 5,2$ МЕ/л. Через 28 суток после начала эксперимента показатели также оставались в границах нормы. Показатели группы плацебо, которым в том же режиме, что и опытным животным, вводили физиологический раствор, не отличались от результатов контрольной группы.

Проанализировав показатели метаболизма костной ткани, можно сказать о том, что эктопическое введение аллогенного ГАП не несет отрицательного воздействия на организм, и, в частности, на костную ткань животных на данных сроках эксперимента.

Таблица 3. Уровень кальцитонина и остеокальцина в сыворотке крови кроликов после внутримышечного введения гидроксиапатита

Доза ГАП	Кальцитонин, пг/мл		Остеокальцин, нг/мл	
	14 суток	28 суток	14 суток	28 суток
контроль	$1,40 \pm 0,05$	$1,32 \pm 0,05$	$6,20 \pm 0,39$	$5,10 \pm 0,11$
10 мг/кг	$1,34 \pm 0,02$	$1,30 \pm 0,01$	$6,33 \pm 0,40$	$4,80 \pm 0,15$
100 мг/кг	$1,44 \pm 0,04$	$1,39 \pm 0,04$	$6,25 \pm 0,14$	$5,95 \pm 0,21^*$
Норма [15]	0 – 4,80		0 – 22,00	

* - отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,05$

Заключение. В результате проведенного исследования нами установлено, что внутримышечное введение гидроксиапатита кроликам в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг не приводит к существенным нарушениям обмена костной ткани. Увеличение содержания белковосвязанного оксипролина и остеокальцина через 14 суток после инъекций гидроксиапатита в дозе 100 мг/кг свидетельствует о преобладании процессов остеосинтеза в костной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бычкова В.И., Смирнова Б.И., Лесничук Л.В. Биохимические показатели соединительной ткани в диагностике начальной стадии цирроза печени // Клин. лаб. диагностика. 2003. № 1. С. 10–14.
2. Замараева Т.В. Метод определения содержания коллагеновых белков по оксипролину // Современные методы в биохимии [под ред. В.Н. Ореховича]. – М.: Медицина, 1977. С. 262–264.
3. Карпенко Л.Ю., Бахта А.А., Капай Н.А., Славецкая М.Б. Нарушение метаболизма костной ткани: диагностика, биохимические маркеры, способы // Гомеопатический ежегодник. – СПб: Издательство ФГБОУ ВПО «СПбГБВМ», 2011. С. 23–26.
4. Писарева Е.В., Волова Л.Т., Власов М.Ю., Соколовская А.Б. Нанобиматериал на основе минерального компонента костной ткани // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13. № 4 (4). С. 1203–1207.
5. Писарева Е.В., Власов М.Ю., Грибкова О.В., Подковкин В.Г. и др. Влияние аллогенного гидроксиапатита на метаболизм костной ткани // Вестник Самарского государственного университета. 2007. № 8. С. 191–197.
6. Писарева Е.В., Волова Л.Т., Тихонова Т.В., Власов М.Ю., Соколовская А.Б., Голуб Ю.В. Применение наноструктурного аллогенного гидроксиапатита для коррекции остеорезорбции // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. СПб, 2012. С. 20–22.
7. Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: Теоретические основы и практикум. – Самара: СамГУ, 1997. 266 с.
8. Чурилина А.В., Москалюк О.Н. Нарушение метаболизма соединительной ткани при некоторых патологических состояниях у детей. // Здоровье ребенка, 2006. № 1. URL: www.mif-ua.com (дата обращения 20.09.2015).
9. Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови // Лабораторное дело. 1990. № 5. С. 283–285.
10. Barbara L. Oglesbee. The 5 – minute veterinary Consult: Ferret and Rabbit – Blackwell Publishing, UK. 2006. – 432 pp.
11. Kaparissides C., Alexandridou S., Kotti K., Chaitidou S. Recent Advances in Novel Drug Delivery Systems // J. Nanotechnology Online, 2006. – 84 p.
12. Hestehave Pedersen R., Rasmussen M., Overgaard S., Ding M. Effects of P-15 peptide coated hydroxyapatite on tibial defect repair in vivo in normal and osteoporotic rats // Biomed. Res. Int. 2015. P.2538–2558.
13. Nosouhian, S., Razavi M., Jafari-Pozve N., Rismanchian M. Comparative evaluation of hydroxyapatite and nano-bioglass in two forms of conventional micro- and nano-particles in repairing bone defects (an animal study) // Indian J. Dent. Res. 2015. Vol. 26. № 4. P. 366–371.
14. Патент РФ № 2012150149/05, 26.11.2012.
15. Патент РФ № 2013145222/10, 09.10.2013.
16. Патент РФ № 2008124263/14, 16.06.2008.

RABBITS BONE TISSUE METABOLISM AFTER INJECTION OF ALLOGENIC HYDROXYAPATITE

© 2015 E.V. Pisareva¹, M.Yu. Vlasov², L.T. Volova²

¹ Samara State University

² Samara State Medicine University

Making a new calcium-phosphorous biocompatible substances and research of its influence on metabolism is the most significant branch in medical practice. The article deals with the experimental data about the influence of natural hydroxyapatite intramuscular injection on some indexes of rabbits bone tissue turnover
Keywords: bone tissue, biomaterials, hydroxyapatite, oxyproline

Elena Pisareva, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of Department of Biochemistry, Biotechnology and Bioengineering. E-mail: pella1@rambler.ru

Mikhail Vlasov, Candidate of Biological Sciences, junior research scientist. E-mail: mvasov1@rambler.ru

Larisa Volova, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Institute of Experimental Medicine and Biotechnologies. E-mail: csrl.sam@mail.ru