

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ГЕТЕРОТОПИЧЕСКОЙ ИМПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА

© 2002 М.Ю. Власов, О.В. Грибкова, В.Г. Подковкин¹, Л.Т. Волова²

При имплантации аллогенного гидроксиапатита (ГАП) разных видов в двухглавую бедренную мышцу крыс изучены особенности фосфорно-кальциевого обмена, уровень 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в организме экспериментальных животных. Установлено, что содержание 11-ОКС в плазме, кальция и неорганического фосфора в сыворотке в целом не претерпевало изменений. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии стрессовой реакции после гетеротопической имплантации аллогенного ГАП.

Введение

Раскрытие механизмов взаимодействия органических и неорганических компонентов в костной ткани во время ее образования является ключевым моментом в создании материалов, используемых для восстановления функций опорно-двигательного аппарата. С этой целью в медицинской практике чаще всего применяется костный матрикс, получаемый по специальной технологии из кадаверного материала, лишенный минеральных веществ. Между тем известно, что микроэлементы необходимы для активации процессов оссификации костной ткани [1-3]. Поэтому некоторыми учеными [4,5] предпринимаются попытки синтезировать искусственную костную ткань, которая по своим физико-химическим, а главное биологическим свойствам не уступала бы естественной. Однако в этом случае практически невозможно создать сложную, многокомпонентную систему со специфическими связями и обменом. Еще труднее предсказать взаимодействие синтезированной *in vitro* "кости" с окружающими тканями организма после трансплантации.

В доступной литературе нам не удалось встретить фактов применения аллогенного ГАП. В большинстве экспериментов для гетеротопической имплантации применялись его синтетические аналоги. Недостаточное внимание уделено реакции организма на подобный вид воздействия. Поэтому целью настоящих исследований явилось получение аллогенного ГАП, изучение некоторых показателей метаболизма соединительной ткани у крыс, а также определение содержания глюкокортикоидов в надпочечниках и плазме при внутримышечной имплантации ГАП.

¹ Власов Михаил Юрьевич (vlam@mail.ru), Грибкова Ольга Витальевна, Подковкин Владимир Георгиевич (podkovkin@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

² Волова Лариса Теодоровна, ЦНИЛ Самарского государственного медицинского университета, 443098, г. Самара, ул. Гагарина, 20.

Материалы и методы исследований

Эксперименты по имплантации ГАП проведены на 44 половозрелых крысах. Предварительно изучали динамику выхода кальция, магния и железа из различных типов костной ткани.

Образцы компактной, губчатой (трабекулярной) и кости плода (брефокости) деминерализовали растворами HCl (2,4 н) в отношении 1:3 для определения кальция и магния, а для определения железа — растворами HCl концентрацией 0,6 н; 1,2 н; 1,8 н; 2,4 н также в отношении 1:3. Смену растворов осуществляли каждые двое суток. Исследования проводили в течение 20 дней. В растворах определяли кальций, магний [6], железо [7].

Гидроксиапатит получали из солянокислых растворов после деминерализации (первая и вторая недели) компактной костной ткани путем осаждения гидроокисью натрия при значениях pH 8 и pH 12 с добавлением фосфатного буфера (pH 7,4) и без него [8].

Образцы гранулированного ГАП массой 40–50 мг имплантировали в левую и правую двуглавые бедренные мышцы крыс. Операция проводилась под эфирным наркозом в стерильных условиях. После операции опытные животные содержались вместе с контрольными в аналогичных условиях. Через два месяца животных выводили из эксперимента путем декапитации, собирали кровь, извлекали надпочечники. В плазме и надпочечниках определяли 11-ОКС [9], в сыворотке определяли кальций [6], активность щелочной фосфатазы и неорганический фосфор [10].

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием стандартного критерия t Стьюдента [11].

Результаты исследований

На первом этапе экспериментов мы изучали динамику выхода микроэлементов из аллогенного материала разных типов (компактной, губчатой, брефокости). Результаты представлены в табл. 1.

При изучении динамики выхода кальция из губчатой костной ткани выявлено скачкообразное увеличение концентрации данного элемента в первые два дня и на 14-е сутки, а максимум выхода кальция из компактной костной ткани зафиксирован на 10-е сутки после начала деминерализации. Концентрация магния в растворах после деминерализации компактной костной ткани постепенно нарастала к 10 дню. Для процесса деминерализации губчатой костной ткани в отношении ионов магния характерна та же специфика, что и в отношении ионов кальция, то есть 2 пика повышения концентрации — в первые 2 дня и на 14 сутки.

В целом следует отметить наличие двух максимумов содержания кальция (в деминерализующем растворе компактной и губчатой костной ткани) и магния (в деминерализующем растворе губчатой костной ткани), а также 1 максимума, характерного для содержания магния в деминерализующем растворе компактной кости.

Зависимость содержания железа в деминерализующих растворах от концентрации соляной кислоты отражена в табл. 2. Различия в содержании железа в растворах в зависимости от концентрации соляной кислоты незначительны. Характерно, что полная деминерализация компактной костной ткани в отношении железа происходила быстрее и завершалась к 10 дню, а трабекулярной — к 14 дню. При этом подавляющая часть железа (90 %) элюировалась из компактной костной ткани в первые 4 дня, в то время как максимум выхода железа из образца трабекулярной

Таблица 1

Содержание кальция и магния в деминерализующих растворах компактной и губчатой костной ткани, мг/мл

	Компактная костная ткань		Губчатая костная ткань	
дни	кальций	магний	кальций	магний
2	11,49 ± 0,09	0,12 ± 0,01	11,41 ± 0,19	1,18 ± 0,05
4	10,75 ± 0,13	0,12 ± 0,01	9,02 ± 0,09	0,94 ± 0,08
6	10,00 ± 0,29	0,34 ± 0,08	8,21 ± 0,13	0,59 ± 0,02
8	6,29 ± 0,24	0,67 ± 0,16	8,03 ± 0,10	0,11 ± 0,01
10	14,50 ± 0,07	0,85 ± 0,04	5,86 ± 0,17	0,38 ± 0,02
12	11,87 ± 0,06	0,34 ± 0,03	6,00 ± 0,05	0,34 ± 0,06
14	12,75 ± 0,06	0,32 ± 0,02	8,88 ± 0,13	0,95 ± 0,04
16	10,63 ± 0,05	0,38 ± 0,02	7,75 ± 0,09	0,36 ± 0,01
18	7,64 ± 0,05	0,29 ± 0,01	5,87 ± 0,07	0,32 ± 0,04
20	6,92 ± 0,03	0,22 ± 0,01	3,37 ± 0,02	0,33 ± 0,02

Таблица 2

Зависимость содержания железа в деминерализующих растворах компактной и губчатой костной ткани от концентрации соляной кислоты, мкг/мл

	Концентрация соляной кислоты, н							
	0,6		1,2		1,8		2,4	
дни	комп. костная ткань	губч. костная ткань	комп. костная ткань	губч. костная ткань	комп. костная ткань	губч. костная ткань	комп. костная ткань	губч. костная ткань
2	47,7 ± 0,2	13,8 ± 0,1	48,1 ± 0,2	13,9 ± 0,1	48,2 ± 0,2	14,2 ± 0,1	48,7 ± 0,2	14,7 ± 0,1
4	49,0 ± 0,2	11,7 ± 0,1	49,3 ± 0,2	11,9 ± 0,1	49,5 ± 0,2	12,3 ± 0,1	49,9 ± 0,2	12,8 ± 0,1
6	11,7 ± 0,2	20,0 ± 0,1	12,8 ± 0,1	20,8 ± 0,1	12,9 ± 0,1	21,0 ± 0,1	13,0 ± 0,1	21,4 ± 0,1
8	0,6 ± 0,0	10,6 ± 0,2	0,6 ± 0,0	10,9 ± 0,2	0,6 ± 0,0	11,1 ± 0,1	0,6 ± 0,0	11,4 ± 0,1
10	0	8,5 ± 0,1	0	8,8 ± 0,1	0	9,2 ± 0,1	0	9,3 ± 0,1
12	0	0,6 ± 0,0	0	0,6 ± 0,0	0	0,6 ± 0,0	0	0,6 ± 0,0
14	0	0	0	0	0	0	0	0

кости приходился на 6-е сутки.

Процесс деминерализации костной ткани плода полностью завершался в течение первых двух дней. Концентрации кальция, магния и железа составляли $15,0 \pm 0,18$ мг/мл; $0,13 \pm 0,01$ мг/мл и $22,03 \pm 0,07$ мкг/мл соответственно.

На втором этапе исследований мы определяли влияние имплантации полученных образцов ГАП в двуглавую бедренную мышцу крыс на следующие биохимические показатели: активность щелочной фосфатазы, уровни кальция и неорганического

фосфора в сыворотке крови, 11-ОКС в надпочечниках и плазме (табл. 3).

Повышение концентрации 11-ОКС в надпочечниках (в 1,4–2,5 раза больше контрольного) наблюдалось только у тех животных, в мышцы которых имплантировались образцы ГАП с добавлением фосфатного буфера. В плазме уровень кортикостероидов практически во всех группах не отличался от контрольного, то есть содержание 11-ОКС в надпочечниках не коррелировало с содержанием гормонов в плазме.

Таблица 3

Влияние вида имплантируемого аллогенного гидроксиапатита на некоторые биохимические показатели у крыс

		11-ОКС		Активность щелочной фосфатазы	Фосфор неорганический	Кальций
Вид ГАП		в плазме, $\text{мкМ}/\text{л}$	в надпочечниках, $\text{мкг}/\text{г}$	в сыворотке, $\text{мМ}/\text{ч.л}$	в сыворотке, $\text{мМ}/\text{л}$	в сыворотке, $\text{мМ}/\text{л}$
pH8	+ (8)	$1,38 \pm 0,22^*$	$134 \pm 7^*$	$7,74 \pm 0,28$	$2,14 \pm 0,10^*$	$2,91 \pm 0,09$
	– (8)	$0,86 \pm 0,08$	89 ± 9	$5,02 \pm 0,35^*$	$1,66 \pm 0,16$	$2,82 \pm 0,03$
pH12	+ (8)	$1,25 \pm 0,24$	$167 \pm 11^*$	$6,68 \pm 0,52$	$1,64 \pm 0,08$	$3,06 \pm 0,07$
	– (6)	$1,20 \pm 0,23$	119 ± 10	$7,04 \pm 0,25$	$1,90 \pm 0,21$	$3,01 \pm 0,07$
	+** (8)	$1,05 \pm 0,15$	$230 \pm 21^*$	$5,42 \pm 0,54^*$	$1,56 \pm 0,16$	$3,00 \pm 0,09$
Контроль (6)		$0,73 \pm 0,07$	93 ± 9	$7,04 \pm 0,46$	$1,50 \pm 0,08$	$2,86 \pm 0,09$

Примечания: * — отличия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$);

“+” — образцы ГАП с добавлением фосфатного буфера;

“–” — образцы ГАП без буфера;

** — образец ГАП, полученный из раствора первой недели деминерализации.

В скобках указано количество животных.

Обсуждение результатов

Поскольку для получения аллогенного ГАП мы использовали солянокислые растворы после деминерализации костной ткани, то вполне естественным представляется изучение динамики выхода наиболее важных элементов — кальция, магния и железа, — участвующих в обменных процессах соединительной ткани.

Анализ данных, полученных на первой стадии экспериментов, показал, что динамика деминерализации компактной и губчатой костных тканей в целом имеет вол-

нообразный характер в отношении содержания кальция, магния и железа. Известно, что минеральные вещества составляют примерно 70 % массы компактной кости и 35–40 % губчатой (трабекулярной) [12]. Поэтому различия в содержании кальция и магния в деминерализующих растворах обусловлены разной степенью обызвествления двух основных видов костной ткани. Более длительный по времени процесс выхода железа из губчатой костной ткани объясняется, по-видимому, ее большей метаболической активностью по сравнению с компактной. В связи с этим можно предположить, что ионы железа, адсорбированные на поверхности кристаллов ГАП, играют важную роль, в частности, в процессах кроветворения в красном костном мозге, который заполняет ретикулум губчатой костной ткани.

Весьма перспективной для использования в травматологии является костная ткань плода. Брефотрансплантанты обладают большей пластичностью и регенеративной способностью, чем обычные костные материалы. Это объясняется наличием в остеοидном матриксе брефокости подавляющей части растворимого аморфного фосфорнокислого кальция, в то время как в костной ткани взрослого организма преобладает менее растворимый кристаллический ГАП, размещенный в матрице коллагеновых волокон и протеогликанов [2]. В наших экспериментах деминерализация компактной и трабекулярной костной ткани полностью не завершалась к 20-му дню, тогда как этот же процесс в отношении брефокости проходил в первые два дня. Все перечисленные преимущества позволяют расширить область применения брефоматериалов в пластике дефектов костной системы.

Изменения активности щелочной фосфатазы, концентраций свободного кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови не были столь существенными. Отсутствие статистически значимых изменений уровня кальция в сыворотке крови всех групп опытных животных через 2 месяца после имплантации ГАП может объясняться срабатыванием механизмов поддержания фосфорно-кальциевого гомеостаза. Одну из основных ролей в этих процессах выполняет гипокальциемический гормон кальцитонин, регулирующий также обмен фосфора и выделяемый преимущественно парафолликулярными клетками щитовидной железы. По всей видимости, введение в мышечную ткань гидроксиапатита и связанное с этим кратковременное повышение уровня кальция и фосфора в крови индуцируют секрецию кальцитонина по принципу обратной связи, что приводит к снижению уровня двух основных элементов ГАП.

Нами отмечено достоверное ($p < 0,05$) снижение активности щелочной фосфатазы в двух группах животных (табл. 3), что может быть связано с угнетением синтеза фермента в остеобластах под действием кальцитонина.

Возможным объяснением различий в уровне стероидов в надпочечниках и плазме является связывание значительной части синтезированных в надпочечниках гормонов плазменным белком транскортином. В комплексе с белком гормоны не обладают активностью, следовательно, не оказывают угнетающее действие на рост и пролиферацию фибробластов, клеток предшественников остеобластов, биосинтез проколлагена и протеогликанов. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о регулирующем влиянии гидрокортизона (основного глюкокортикоида крыс) на синтез гликопротеинов в культурах остеобластов [13], коллагена I и III в культурах фибробластов [14] и данные о поддержании остеобластической активности физиологическими дозами глюкокортикоидов [15].

Полученные данные позволяют предположить, что гетеротопическая имплантация гидроксиапатита в мышечную ткань не вызывает серьезных нарушений фосфорно-кальциевого обмена в организме опытных животных. Уровень 11-окси-

кортикостероидов в плазме, близкий к контрольным показателям, свидетельствует об отсутствии стрессовой реакции через 2 месяца после операции.

Выводы

1. Разработана технология получения аллогенного гидроксиапатита, который может использоваться в качестве костно-пластического материала.
2. Внутримышечная имплантация аллогенного гидроксиапатита не вызывает стрессовую реакцию у экспериментальных животных через 2 месяца после операции.

Литература

- [1] Seto H., Aoki K., Kasugai S., Ohya K. Trabecular bone turnover, bone marrow cell development, and gene expression of bone matrix proteins after low calcium feeding in rats// Bone. 1999. V. 25. No. 6. P. 687–695.
- [2] Савельев В.И., Родюкова Е.Н. Трансплантация костной ткани. Новосибирск: Наука, 1992. 220 с.
- [3] Ma Z., Yamaguchi M. Role of endogenous zinc in the enhancement of bone protein synthesis associated with bone growth of newborn rats// J. Bone Miner. Metab. 2001. V. 19. No. 1. P. 38–44.
- [4] Dalkyz M., Ozcan A., Yapar M., Gokay N., Yuncu M. Evaluation of the effects of different biomaterials on bone defects// Implant. Dent. 2000. V. 9. No. 3. P.226–235.
- [5] Itoh S., Kikuchi M., Tanaka J., Ichinose S., Shinomiya K. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo// Biomaterials. 2001. V. 22. No. 13. P. 1705–1711.
- [6] Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник/ Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 366 с.
- [7] Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука, 1965. С.436–437.
- [8] Волова Л.Т., Подковкин В.Г. Способ получения аллогенного гидроксиапатита: Патент на изобретение № 2168998. Приоритет от 14.02.2000 г. РФ.
- [9] Биохимические и иммунологические методы оценки регулирующих систем организма/ Под ред. М.В. Угловой. Куйбышев, 1989. С. 17–18.
- [10] Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982. С. 121–125.
- [11] Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: Теоретические основы и практикум. Самара: Изд-во СамГУ, 1997. 265 с.
- [12] Торбенко В.П., Касавина Б.С. Функциональная биохимия костной ткани. М. : Медицина, 1977. 272 с.
- [13] Sodek J., Kim R.H., Ogata Y., Li J., Yamauchi M., Zhang Q., Freedman L.P. Regulation of bone sialoprotein gene transcription by steroid hormones// Connect. Tissue Res. 1995. V. 32. No.14. P. 209–217.
- [14] Fernandez M., Minguell J.J. Hydrocortisone regulates types I and III collagen gene expression and collagen synthesis in human marrow stromal cells// Biol. Re. 1997. V. 30. No.2. P.85–90.

- [15] Fujieda M., Takao N., Kiri M., Mizuochi S., Kaneki H., Ide H.J. Age-dependent decline in bone nodule formation stimulating activity in rat serum is mainly due to the change in the corticosterone level// Cell Biochem. 2001. V. 81. No.3. P. 547–556.

METABOLISM FEATURES OF THE RATS' CONJUNCTIVE TISSUE AFTER HETEROTOPIC IMPLANTATION OF ALLOGEN HYDROXYAPATITE

© 2002 M.Yu. Vlasov, O.V. Gribkova, V.G. Podkovkin,³ L.T. Volova⁴

We investigated phosphoric-calcium metabolism features and glucocorticoid level in rats with different types of allogen hydroxyapatite implanted in biceps femoris muscle. The lack of essential glucocorticoids' level changes in rats' plasma, free calcium and nonorganic phosphate contents in serum was detected. We supposed that hydroxyapatite heterotopic implantation did not induce stress reaction of the operated animals.

Поступила в редакцию 5/IV/2002;
в окончательном варианте — 28/V/2002.

³Vlasov Mikhail Yurievich (vlam@mail.ru), Gribkova Olga Vitalievna, Podkovkin Vladimir Georgievich (podkovkin@rambler.ru), Dept. Of Biochemistry, Samara State University, 443011, Samara, Russia.

⁴Volova Larisa Theodorovna, Central Scientific Research Laboratory, Samara State Medicine University, 443098, Samara, Russia.