

УДК 612.751.3

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИМЫШЕЧНЫХ ИНЪЕКЦИЙ ГИДРОКСИАПАТИТА НА ОБМЕН КОЛЛАГЕНА¹

© 2002 М.Ю. Власов²

Исследован эффект применения костных материалов органической и неорганической природы в качестве регуляторов обмена соединительной ткани. Выявлены изменения уровня 11-оксикортикостероидов (11-ОКС), свободного и белковосвязанного (БС) оксипролина в организме крыс после внутримышечного введения суспензии аллогенного гидроксиапатита (ГАП) и аллогенного деминерализованного костного матрикса (ДКМ). Рассмотрены возможности регуляции коллагеногенеза при инъекциях аллогенного гидроксиапатита.

Введение

В последние годы проводятся эксперименты по изучению влияния на обмен соединительной ткани различных ГАП-содержащих материалов при их имплантации вне костной системы. Используется пористая и компактная керамика, полученная из различных источников. Наибольшее распространение получили композитные материалы, включающие помимо ГАП также коллаген [1], фосфат кальция, адсорбированные остеоиндуктивные факторы [2, 3], различные соединения титана [4] и алюминия [5]. Практически все виды фосфорно-кальциевых материалов синтезируются искусственно, что требует специального оборудования и строгого соблюдения условий синтеза. В данной работе был использован аллогенный ГАП, полученный непосредственно из костной ткани.

Перечисленные материалы на основе ГАП могут использоваться для лечения ортопедических заболеваний и облегчения последствий травм, а также для регуляции минерального обмена и коллагеногенеза.

В немногочисленных экспериментальных работах по изучению последствий внутримышечной имплантации недостаточное внимание уделено изменениям со стороны эндокринной системы и некоторым аспектам метаболизма соединительной ткани, прежде всего коллагена.

Целью данной работы стало изучение изменений в содержании оксипролина и глюкокортикоидов в плазме крыс при трансплантации аллогенного ДКМ и внутримышечных инъекциях суспензий аллогенного ГАП.

¹Представлена доктором биологических наук профессором В.Г. Подковкиным.

²Власов Михаил Юрьевич (vlam@mail.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Методика

Эксперименты выполнены на 62 белых беспородных половозрелых крысах массой 180–290 г. ГАП получали путем нейтрализации при значениях pH 8 и 12 солянокислых растворов после деминерализации костной ткани [6].

Животные были разделены на 4 опытные группы. В первой группе крысам с помощью одноразового шприца внутримышечно в левую бедренную мышцу делали инъекции суспензии ГАП (pH 12), 40 мг в 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Животным второй группы в правую бедренную мышцу трансплантировали стерильный ДКМ. В третьей группе осуществляли одновременно трансплантацию ДКМ и инъекции ГАП (pH 12). Крысам четвертой группы трансплантировали ДКМ и делали инъекции ГАП (pH 8). В качестве контроля служили 2 группы животных, которым делали ложную операцию под наркозом и внутримышечные инъекции физиологического раствора в соответствующей дозе.

Операции проводились под эфирным наркозом в стерильных условиях. После операции все животные содержались в аналогичных условиях вивария на стандартном рационе при комнатной температуре.

Забой животных производили через 1 и 2 месяца после операции, собирали кровь, извлекали надпочечники. В плазме и надпочечниках определяли содержание 11-ОКС [7], в плазме — свободный и БС оксипролин [8]. Статистическую обработку полученных данных производили с использованием стандартного критерия *t* Стьюдента [9].

Результаты и обсуждение

Результаты исследований представлены в таблице.

Концентрация БС оксипролина оставалась без изменений через месяц в плазме животных всех экспериментальных групп и увеличивалась спустя 2 месяца в плазме животных 2 (на 13%) и 4 (на 19%) групп по сравнению с контрольными значениями. Изменения содержания свободного оксипролина также наблюдались только через 2 месяца после операций, причем практически во всех группах происходило снижение данного показателя. Достоверное снижение концентрации стероидов было зафиксировано через месяц в надпочечниках крыс, которым делались инъекции суспензии ГАП (pH 8) с одновременной трансплантацией ДКМ. Через 2 месяца данный показатель приближался к контрольному значению. Максимальное увеличение содержания 11-ОКС (54% от контроля) выявлено через 2 месяца в надпочечниках крыс с трансплантированным в мышцу ДКМ. В плазме животных 3 группы было выявлено повышение, а в плазме крыс 4 группы — снижение содержания 11-ОКС спустя месяц после операций. Через 2 месяца данный показатель в 3 группе возвращался к контрольному значению, в то время как в 4 экспериментальной группе происходило увеличение содержания стероидов на 66% по сравнению с контрольным показателем. Аналогичное повышение наблюдалось через 2 месяца в плазме крыс 1 группы, которым делались только инъекции суспензии аллогенного ГАП (pH 12).

Единственным белком, в состав которого оксипролин входит в значительных количествах, является коллаген. Поэтому основным маркером обмена коллагена считается уровень оксипролина. Чаще всего повышение уровня свободного оксипролина свидетельствует о процессах деструкции коллагена, осуществляемой тканевой коллагеназой, а увеличение концентрации БС оксипролина отражает усиление коллагеногенеза фибробластами и остеобластами [10]. Поскольку в состав аллогенно-

Таблица

Содержание оксипролина в плазме и 11-ОКС в плазме и надпочечниках крыс после инъекций суспензий аллогенного ГАП и внутримышечной трансплантации аллогенного ДКМ

Исследуемые показатели	Экспериментальные группы и способ воздействия				
	Контроль (12)	1 (12)	2 (14)	3 (12)	4 (12)
		ГАП рН 12	ДКМ	ДКМ +ГАП рН 12	ДКМ +ГАП рН 8
Белковосвязанный оксипролин, мкМ/л	$\frac{254 \pm 4}{308 \pm 8}$	$\frac{230 \pm 12}{331 \pm 17}$	$\frac{270 \pm 8}{348 \pm 17^*}$	$\frac{260 \pm 23}{310 \pm 6}$	$\frac{266 \pm 11}{368 \pm 6^*}$
Свободный оксипролин, мкМ/л	$\frac{12,0 \pm 0,6}{19,5 \pm 1,8}$	$\frac{10,2 \pm 0,3}{10,8 \pm 0,9^*}$	$\frac{11,5 \pm 0,7}{14,2 \pm 0,9^*}$	$\frac{9,20 \pm 1,0}{12,3 \pm 1,9^*}$	$\frac{12,3 \pm 0,9}{17,3 \pm 3,5}$
11-ОКС в надпочечниках, мкг/г	$\frac{157 \pm 8}{135 \pm 5}$	$\frac{145 \pm 15}{175 \pm 7^*}$	$\frac{121 \pm 15}{208 \pm 24^*}$	$\frac{174 \pm 25}{111 \pm 13}$	$\frac{103 \pm 10^*}{137 \pm 23}$
11-ОКС в плазме, мкМ/л	$\frac{2,83 \pm 0,15}{4,90 \pm 0,76}$	$\frac{3,21 \pm 0,39}{7,17 \pm 0,62^*}$	$\frac{2,38 \pm 0,6}{6,62 \pm 1,05}$	$\frac{3,69 \pm 0,35^*}{4,83 \pm 0,39}$	$\frac{1,72 \pm 0,27^*}{8,12 \pm 0,81^*}$

Примечание. * — отличия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Над чертой — концентрации веществ через месяц, под чертой — через 2 месяца после операций. В скобках указано количество животных.

го ГАП входят самые различные микроэлементы, являющиеся как индукторами, так и ингибиторами оксификации [11], можно предположить, что именно микроэлементный состав обуславливает понижения в содержании прежде всего свободного оксипролина, выявленные в результате собственных исследований. Проведенные нами предыдущие исследования [12] показали, что при введении в мышцы животных гранулированных имплантатов ГАП в целом происходила интенсификация обмена оксипролина.

Общепризнанным является факт, что реализация гормональных реакций в ответ на изменение гомеостаза происходит в первую очередь с участием гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. По мнению ряда авторов [13,14], патологические сбои в работе именно этой системы являются основной причиной заболеваний, в частности, опорно-двигательного аппарата. К изменениям уровня глюкокортикоидов в крови приводит развитие иммунологических феноменов клеточного типа, в том числе трансплантационный иммунитет, противоопухолевые реакции. Недостаточно ясным представляется вопрос о механизмах, приводящих к освобождению кортикотропин-рилизинг-фактора в гипоталамусе, а затем кортикотропина в гипофизе в ответ на антигенные стимулы.

Влияние имплантации можно рассматривать с двух позиций. Во-первых, с позиции непосредственного влияния на обмен соединительной ткани. Во-вторых, животные подвергаются также травматическому стрессу, вызываемому повреждением мягких тканей бедра. По имеющимся литературным данным [15], подобного рода воздействие вызывает значительное, но кратковременное повышение уровня глюкокортикоидов в плазме крови животных. Приведенные собственные эксперименталь-

ные данные свидетельствуют о сохранении глюкокортикоидной реакции в организме крыс через 2 месяца после инъекций аллогенного ГАП и введения в бедренные мышцы ДКМ. Можно утверждать, что увеличение содержания 11-ОКС в плазме и надпочечниках определяется именно присутствием в мышечной ткани имплантатов, а не стрессовым травматическим воздействием, наносимым животным при повреждении мышц, поскольку сравнение происходит с контрольными животными, которым делалась ложная операция. Таким образом, глюкокортикоидная реакция также находится в зависимости от вида трансплантируемого материала. Данное обстоятельство представляет особый интерес, поскольку первопричиной большинства патологий соединительной ткани являются нарушения гормонального гомеостаза.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют об активирующем влиянии внутримышечных инъекций суспензии аллогенного ГАП на метаболизм соединительной ткани, основным компонентом которой является коллаген. Введение аллогенного ГАП позволяет более эффективно регулировать гомеостаз и управлять процессами регенерации при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Литература

- [1] 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.
- [2] Jin Q.M., Takita H., Kohgo T., Atsumi K., Itoh H., Kuboki Y.J. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation// *Biomed. Mater. Res*. 2000. V. 51. No. 3. P. 491–499.
- [3] Oda S., Kinoshita A., Higuchi T., Shizuya T., Ishikawa I. Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)// *J. Med. Dent. Sci*. 1997. V. 44. No. 3. P. 53–62.
- [4] Takeshita F., Ayukava Y., Suetsugu T., Akedo H., Iyama S. Study of bone formation around dense hydroxyapatite implants using light microscopy, image processing and confocal laser scanning microscopy// *Biomaterials*. 1997. V. 18. No. 4. P. 317–322.
- [5] Benghuzzi H.A., England B.G., Bajpai P.K. Controlled release of hydrophilic compounds by resorbable and biodegradable ceramic drug delivery devices// *Biomed. Sci. Instrum*. 1992. V. 28. P. 179–182.
- [6] Волова Л.Т., Подковкин В.Г. Способ получения аллогенного гидроксиапатита: Патент на изобретение № 2168998. Приоритет от 14.02.2000г. РФ.
- [7] Биохимические и иммунологические методы оценки регулирующих систем организма/ Под ред. М.В. Угловой. Куйбышев, 1989. С. 17–18.
- [8] Современные методы в биохимии/ Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 262–264.
- [9] Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: Теоретические основы и практикум. Самара: Изд-во СамГУ, 1997. 265 с.
- [10] Мазуров В.И. Биохимия коллагеновых белков. М.: Медицина, 1974. 248 с.
- [11] Скоблин А.П., Белоус А.М. Микроэлементы костной ткани. М.: Медицина, 1968. 232 с.

- [12] Власов М.Ю., О.В. Грибкова, В.Г. Подковкин, Л.Т. Волова. Особенности обмена соединительной ткани крыс при гетеротопической имплантации аллогенного гидроксиапатита// Вестник Самарского государственного университета. 2002. № 2 (24). С. 137-143.
- [13] Vrkljan M., Thaller V., Lovricevic I., Gacina P., Resetic J., Bekic M., Sonicki Z. Depressive disorder as possible risk factor of osteoporosis// Coll. Antropol. 2001. Vol. 25. No. 2. P. 485-492.
- [14] Bockman R.S., Weinerman S.A. Steroid-induced osteoporosis// Orthop. Clin. North. Am. 1990. V. 21. No. 1. P. 97-107.
- [15] Александров В.Н. Гуморальный иммунный ответ после травмы различной тяжести// Патол. физиология и эксперим. терапия. 1983. № 4. С. 70-73.

THE INFLUENCE OF HYDROXYAPATITE INTRAMUSCULAR INJECTIONS ON COLLAGEN METABOLISM³

© 2002 M.Yu. Vlasov⁴

The purpose of the present study is to investigate the effect of organic and mineral bone materials on the conjunctive tissue's metabolism. Both intramuscular injection of allogenic hydroxyapatite and transplantation of allogenic demineralized bone matrix induce partial alterations of total hydroxyprolin in rats plasma and glucocorticoids content in adrenal glands and plasma. The possibility of collagenogenesis stimulation by injections of allogenic hydroxyapatite is discussed in the paper.

Поступила в редакцию 26/X/2002;
в окончательном варианте — 2/XI/2002.

³Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. V.G. Podkovkin.

⁴Vlasov Mikhail Yurievich (vlam@mail.ru), Dept. Of Biochemistry, Samara State University, 443011, Samara, Russia.