

УДК 612.751.3

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА И ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ НА СОДЕРЖАНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА И АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ У КРЫС

© 2003 М.Ю. Власов, В.Г. Подковкин, Е.Г. Гуреева¹

Исследовано влияние внутримышечных инъекций суспензии аллогенного гидроксиапатита и имплантации деминерализованной костной ткани на некоторые показатели антиоксидантной системы у крыс. Установлено, что изменения концентрации малонового диальдегида и активности каталазы в печени, мышцах и селезенке зависят от сроков имплантации и сочетания операций.

Введение

В последнее время большое развитие получила реконструктивная хирургия. Потребность в костных трансплантатах настолько возросла, что возникла необходимость в организации специализированных служб, призванных осуществлять заготовку и широкое обеспечение лечебных учреждений консервированными тканями, в том числе костными трансплантатами [1,2]. Эффективность трансплантации костной ткани объясняется двумя обстоятельствами: меньшей по сравнению с другими органами зависимостью от законов трансплантационного иммунитета и способностью изолированной кости к замещению новыми органотипическими структурами [3,4].

При трансплантации встает проблема поиска материалов для пересадки, к которым предъявляются серьезные требования: отсутствие токсических и канцерогенных свойств, слабая антигенность, длитель-

¹ Власов Михаил Юрьевич (vlam@mail333.com), Подковкин Владимир Георгиевич (podkovkin@rambler.ru), Гуреева Екатерина Геннадьевна, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

ное функционирование, устойчивость к тканевым ферментам, регулируемая скорость лизиса и многие другие. Консервированная ткань по своим трансплантационным качествам уступает аутокости [4]. Отсюда понятно стремление исследователей повысить эффективность аллогенных пересадок и получить костно-пластический материал, эквивалентный по своим свойствам ауто трансплантатам. Однако в этом случае практически невозможно создать сложную многокомпонентную систему со специфическими связями и обменом. Необходим также анализ общих и местных изменений в организме реципиента, возникающих в ответ на пересадку. Определенное значение в развитии реакции имеют процессы перекисного окисления липидов, активация которых наблюдается при стрессах различной природы [5].

В доступной нам литературе отсутствуют факты применения аллогенного гидроксиапатита (ГАП). Недостаточное внимание уделено реакции организма на подобный вид воздействия. В связи с этим целью наших исследований явилось изучение влияния трансплантации аллогенного гидроксиапатита, деминерализованной костной ткани и их сочетания на содержание малонового диальдегида (МДА) и активность каталазы в печени, мышечной ткани (мышцах) и селезенке у крыс.

Методика исследования

Эксперименты проведены 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.

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 деминерализованный костный матрикс (ДКМ). В третьей группе осуществляли одновременно трансплантацию ДКМ и инъекцию ГАП (pH 12). Крысам четвертой группы трансплантировали ДКМ и делали инъекции ГАП (pH 8). В качестве контроля служили 2 группы животных (к каждому сроку исследований), которым делали ложную операцию под наркозом и внутримышечные инъекции физиологического раствора в соответствующей дозе.

Операции проводились под эфирным наркозом в стерильных усло-

виях. 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. Концентрацию МДА и активность каталазы определяли в мышечной ткани, печени и селезенке [6,7]. Статистическую обработку полученных данных производили с использованием стандартного критерия t Стьюдента [8].

Результаты исследований и обсуждение

Содержание МДА в печени через месяц после инъекции ГАП было достоверно ниже контрольного значения (табл. 1). Аналогичная тенденция, выраженная в меньшей степени, наблюдалась и в трех других исследуемых группах. Через два месяца отмечалось повышение уровня малонового диальдегида. В четвертой группе (ДКМ, ГАП рН8) выявлено достоверное отличие от контрольного показателя. В третьей группе (ДКМ, ГАП рН12) содержание МДА оставалось несколько ниже по сравнению с контролем. В первой и второй группах наблюдалась тенденция к увеличению уровня МДА по сравнению с контрольным значением.

Динамика содержания МДА в мышечной ткани была слабо выражена. Через месяц после операции уровень МДА не отличался от контроля в трех исследуемых группах. Исключение составляла первая группа, в которой содержание МДА было достоверно выше контрольного показателя. Через два месяца после операции отмечены изменения уровня МДА в первых трех группах по сравнению с контрольным показателем. В четвертой группе выявлено достоверное снижение содержания МДА.

В изменении содержания МДА в селезенке отмечено сходство с динамикой уровня МДА в печени. Так, через месяц после операции во всех четырех группах содержание МДА было достоверно ниже контрольных значений. Наиболее отчетливо эта тенденция была выражена в первой группе (ГАП). Ко второму месяцу в первой и третьей группах отмечалось увеличение уровня МДА по сравнению с контролем. Во второй группе содержание МДА через два месяца после операции оставалось достоверно ниже контрольного значения. В третьей группе уровень МДА несколько увеличился по сравнению с показателем первого срока исследования, но также оставался ниже контрольного. Активность каталазы в печени через месяц после операции в группах, которым осуществляли одновременно пересадку ДКМ и инъекцию ГАП, была достоверно выше контрольного значения (табл. 2).

Таблица 1

Влияние инъекции аллогенного гидроксиапатита, трансплантации деминерализованной костной ткани и их сочетания на содержание малонового диальдегида в печени, мышцах и селезенке у крыс

Исследуемые показатели		Условия эксперимента				
		ГАП pH12, n=12	ДКМ n=14	ДКМ, ГАП pH12, n=12	ДКМ, ГАП pH8, n=12	Контроль n=12
МДА в печени, нмоль/г	1 мес.	14,51 ±0,51*	20,48 ±1,94	17,60 ±0,77*	20,91 ±2,23	24,75 ±2,16
	2 мес.	24,32 ±1,33	28,16 ±2,54	19,41 ±1,33	29,55 ±1,54*	22,29 ±0,91
МДА в мышцах, нмоль/г	1 мес.	11,31 ±0,25*	10,35 ±0,50	10,45 ±0,54	10,77 ±0,51	10,13 ±0,20
	2 мес.	14,40 ±1,15	13,92 ±1,14	13,44 ±1,03	12,37 ±0,46*	13,97 ±0,53
МДА в селезенке, нмоль/г	1 мес.	4,27 ±0,36*	6,19 ±0,23*	5,23 ±0,31*	5,12 ±0,44*	7,25 ±0,21
	2 мес.	8,32 ±0,39*	5,60 ±0,37	7,79 ±0,38	5,55 ±0,65	6,61 ±0,59

Примечание: * — отличия от контроля достоверны для $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние инъекции аллогенного гидроксиапатита, трансплантации деминерализованной костной ткани и их сочетания на активность каталазы в печени, мышцах и селезенке у крыс

Исследуемые показатели		Условия эксперимента				
		ГАП pH12, n=12	ДКМ n=14	ДКМ, ГАП pH12, n=12	ДКМ, ГАП pH8, n=12	Контроль n=12
Активность каталазы в печени, нмоль/мл-мин	1 мес.	99,11 ±7,01	107,14 ±3,42	119,46 ±1,93*	123,75 ±1,81*	102,86 ±5,34
	2 мес.	94,29 ±7,17	99,64 ±4,10	88,93 ±2,87*	123,75 ±6,38	103,93 ±5,67
Активность каталазы в мышцах, нмоль/мл-мин	1 мес.	39,06 ±4,78	24,68 ±3,76*	37,36 ±3,28	39,62 ±4,36	40,19 ±3,55
	2 мес.	48,89 ±4,19	30,83 ±2,87	33,22 ±10,91	28,89 ±3,06	36,67 ±7,89
Активность каталазы в селезенке, нмоль/мл-мин	1 мес.	161,38 ±2,78	170,69 ±3,89	163,97 ±3,04	150,52 ±2,37*	171,21 ±4,42
	2 мес.	172,80 ±7,83	171,00 ±5,67	174,60 ±3,69	177,60 ±3,04	166,80 ±5,47

Примечание: * — отличия от контроля достоверны для $p < 0,05$.

В первых двух группах исследуемый показатель отличался от контроля недостоверно. Через два месяца после операции у животных третьей группы обнаружено достоверное снижение, а в четвертой группе увеличение активности каталазы по сравнению с контрольным показателем.

Таким образом, в третьей группе ко второму сроку исследования наблюдалось значительное уменьшение активности фермента по сравнению с первым месяцем. Аналогичные показатели в первых двух группах недостоверно отличались от контрольных значений. Однако в первой группе тенденция к снижению активности фермента была более выражена по сравнению со второй группой, как и через месяц после операции.

В мышечной ткани через месяц после операции была отмечена тенденция снижения активности каталазы, особенно выраженная во второй группе. В остальных случаях изменения были незначительными. Ко второму сроку исследований во второй группе активность каталазы повышалась по сравнению с первым сроком исследования, но оставалась ниже контрольного значения. В третьей и четвертой группах усиливалась тенденция снижения активности фермента, отмеченная через месяц после операции.

Изменения активности каталазы в селезенке в течение обоих сроков исследования носили недостоверный характер.

Таким образом, трансплантация ДКМ, инъекция ГАП и их сочетание приводят к снижению содержания МДА в печени и селезенке через месяц после операции. Через два месяца после операции уровень МДА превышал контрольное значение или отличался от него недостоверно. В печени эти изменения в третьей и четвертой группах сопровождались повышением активности каталазы через месяц после операции и ее снижением ко второму сроку исследования. В мышцах изменения уровня МДА и активности каталазы были в целом незначительными.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии имплантации ГАП, ДКМ на содержание МДА. Отсутствие значительного роста содержания МДА свидетельствует о высокой биосовместимости материала. Повышение содержания МДА отмечалось через два месяца после операции, что свидетельствует об интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), приводящей к ускорению обмена фосфолипидов, изменению их относительного состава, к изменению липид-белковых отношений и, как следствие, к изменению структуры и проницаемости мембраны. Интенсификация ПОЛ приводит к уменьшению времени обновления липидов мембран [9]. Большое чис-

ло работ показывает липид-зависимость мембранных белков-ферментов, рецепторов, каналообразователей, транслокаторов. Поэтому изменение состава липидов, вызванное изменением скорости перекисного окисления, меняет и активность этих мембранных белков. Возможно, изменение содержания малонового диальдегида носит волнообразный характер. Подобная закономерность была выявлена в иммунологических исследованиях при оценке факторов естественной резистентности, когда на организм воздействуют два фактора — операционная травма и костный трансплантат [3].

Отсутствие существенных изменений уровня МДА и активности каталазы в бедренных мышцах свидетельствует в пользу применения ГАП, так как указывает на невыраженность воспалительной реакции и слабо отражается на динамике ПОЛ.

Слабо выраженная корреляция между содержанием МДА и активностью каталазы предполагает значительное участие в процессах ПОЛ других антиокислительных систем, в частности, системы глутатиона — в тех случаях, когда содержание первичных продуктов ПОЛ в исследуемых группах превышает контрольное значение одновременно с уровнем МДА, не превышающим контроль.

Комбинированная с инъекцией ГАП трансплантация ДКМ в обоих вариантах усиливает в отдельных случаях реакцию со стороны организма. Исследуемые показатели по сравнению с контрольными значениями достоверно отличаются. Сходство динамики показателей содержания МДА и активности каталазы в третьей и четвертой группах показывает незначительное влияние роли рН при совместной трансплантации ДКМ с инъекцией ГАП.

Выводы

1. При имплантации аллогенного гидроксиапатита через месяц после операции наблюдаются достоверное снижение содержания малонового диальдегида в печени и селезенке и увеличение его уровня в мышцах по сравнению с контролем. Ко второму месяцу в селезенке отмечается повышенный уровень малонового диальдегида; в печени и мышцах исследуемый показатель не отличается от контроля.

2. При трансплантации деминерализованной костной ткани отмечается снижение содержания малонового диальдегида в печени и селезенке через месяц после операции. Через два месяца уровень малонового диальдегида в исследуемых органах не отличается от контроля.

3. Комбинированная с инъекцией гидроксиапатита трансплантация деминерализованной костной ткани приводит к снижению содержания

малонового диальдегида в печени. В мышцах изменения носят менее выраженный характер.

4. Инъекции гидроксиапатита не влияют на активность каталазы в селезенке, печени и мышцах у крыс в течение обоих исследуемых сроков.

5. При комбинированной с инъекцией гидроксиапатита трансплантации деминерализованной костной ткани в первый месяц после операции наблюдается увеличение активности каталазы в печени, которое сохраняется и через два месяца при инъекции гидроксиапатита с рН8. При инъекции гидроксиапатита с рН12 активность каталазы через два месяца снижается.

Литература

- [1] Студницкий А.Н. Тканевые взаимодействия при регенерации и трансплантации костей и мышц // Регуляторные механизмы регенерации. М.: Медицина, 1973. 180 с.
- [2] Трансплантология: Руководство / Под ред. В.И. Шумакова. М.: Медицина; Тула: Репроникс, 1995. 391 с.
- [3] Савельев В.И., Родюкова Е.Н. Реакция организма на трансплантацию костной ткани. Новосибирск: Наука, 1985. 168 с.
- [4] Савельев В.И., Родюкова Е.Н. Трансплантация костной ткани. Новосибирск: Наука, 1992. 220 с.
- [5] Перекисное окисление и стресс / В.А. Барабой, И.И. Брехман, В.Г. Глотин, Ю.Б. Кудряшов. СПб.: Наука, 1992. 148 с.
- [6] Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–19.
- [7] Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 63–66.
- [8] Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: теоретические основы и практикум. Самара: Изд-во СамГУ, 1997. 265 с.
- [9] Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. 1985. № 9. С. 1540–1557.

**THE EFFECT OF ALLOGENIC
HYDROXYAPATITE AND DEMINERALIZED
BONE TISSUE ON MALONYL DIALDEHYDE
CONTENT AND KATALASE ACTIVITY**

© 2003 M.Yu. Vlasov, V.G. Podkovkin, E.G. Gureeva²

The effect of allogenic hydroxyapatite intramuscular injections and demineralized bone matrix implantation on some antioxidant indexes in rats is investigated. It was found that a variation of malonyl dialdehyde level and katalase activity in the liver, muscle and spleen depends on implantation period.

Поступила в редакцию 14/V/2003.

² Vlasov Michail Yurievich (vlam@mail333.com), Podkovkin Vladimir Georgievich (podkovkin@rambler.ru), Gureeva Ekaterina Gennadievna, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.