

УДК 577.

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА НА МЕТАБОЛИЗМ КОСТНОЙ ТКАНИ¹

© 2007 Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, О.В. Грибокова,
В.Г. Подковкин, Л.Т. Волова, Е.Н. Архипова²

Данная работа посвящена изучению влияния аллогенного гидроксиапатита на процессы метаболизма костной ткани у животных. Действие гидроксиапатита испытывали на двух моделях резорбции костной ткани – модели кратковременной гипертермии и гипоестрогенной модели. Полученные результаты могут служить основанием к использованию аллогенного гидроксиапатита для профилактики развития резорбции костной ткани.

Введение

В последнее время возросло количество различных заболеваний опорно-двигательного аппарата, расширился контингент лиц, страдающих нарушениями регуляции обмена костной ткани. Часто причинами подобных нарушений могут быть неблагоприятная экологическая обстановка, заболевания внутренних органов, постоянные стрессы. При снижении процессов костеобразования и усилении процессов резорбции кость подвергается атрофии, что обозначают термином «остеопороз» [1, 2]. В наших экспериментах на животных были отработаны две модели резорбции костной ткани: модель кратковременной гипертермии и модель, основанная на эффекте гипоестрогемии. С целью борьбы с потерей костной массы в медицинской практике широко используют целый ряд препаратов, регулирующих обмен кальция и фосфора в организме [3]. Весьма перспективным в этом отношении нам представляется аллогенный гидроксиапатит [4, 5]. Он получается из натуральной кости и кроме кальция и фосфора содержит микроэлементы в тех же количествах, в которых они имеются в костной ткани. Поэтому его применение способствует более эффективному протеканию процессов регенерации. В ЦНИЛ СамГМУ разработан новый способ получения аллогенного гидроксиапатита (патент на изобретение № 2168998) и способ его введения в организм путем создания эктопического депо в мышечной ткани (патент № 2219933). Для оценки активности процессов формирования и резорбции кости, а также при динамической оценке эффективности проводимого лечения при-

¹ Представлена доктором биологических наук, профессором С.А. Сачковым.

² Писарева Елена Владимировна (pella1@rambler.ru), Власов Михаил Юрьевич, Грибокова Ольга Витальевна, Подковкин Владимир Георгиевич (podkovkin@rambler.ru), Волова Лариса Теодоровна, Архипова Екатерина Николаевна, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

бегают к определению биохимических маркеров [6-9]. К маркерам резорбции костной ткани относят свободный оксипролин; концентрацию ионов кальция и неорганического фосфата в сыворотке крови; кальций и креатинин мочи; гидроксипролин мочи; пиридолин и дезоксипиридолин мочи и плазмы; устойчивая к тартрату кислая фосфатаза плазмы; продукты деградации коллагена I типа – N- и C-телопептиды; гликозиды гидроксизина. Маркеры образования костной ткани: белковосвязанный оксипролин; сывороточный остеокальцин; общая и специфическая костная щелочная фосфатаза; проколлагеновые C- и N-пептиды [7].

Целью исследования было испытание препарата на двух моделях резорбции костной ткани у животных (модель кратковременной гипертермии и гипострогенная модель) посредством определения специфических структурно-функциональных и биохимических изменений в организме экспериментальных животных при моделировании резорбции костной ткани.

Методика исследований

Эксперименты проведены на 200 белых лабораторных крысах-самках весом 180-250 г. Животные были разделены на три группы. В первой группе их подвергали воздействию повышенной температуры окружающей среды (70 °С) с ежедневными сеансами в течение нескольких дней. В эксперименте горячий воздух подавался в камеру, в которой одновременно находилось 5-6 крыс. Интенсивность нагрева регулировалась с помощью реле с контактным термометром, к которому был подключен источник тепла. Во всех частях камеры температура воздуха была одинаковая.

Животным второй группы проводили овариоэктомию, создавая, таким образом, гипострогенное состояние. Кастрация проводилась стандартным способом [10]. После овариоэктомии у животных брали влагалищные мазки каждый день в течение 7 дней. В эксперимент включали только тех крыс, у которых не было обнаружено циклических изменений во время этого периода. Срок наблюдения после овариоэктомии: 2,5 мес.

В третью группу (контроль) входили интактные животные, содержащиеся в аналогичных условиях.

Инъекции гидроксиапатита проводили половине животных из каждой экспериментальной группы, оставшиеся крысы составляли группы сравнения. Суспензии стерильного ГАП в изотоническом растворе хлорида натрия (40 мг/0,2 мл) однократно вводили с помощью одноразового шприца в бедренные мышцы крыс. Объектами исследований являлись кровь, надпочечники, печень и мышечная ткань животных. Для проведения биохимических исследований животных умерщвляли путем декапитации с помощью специально разработанного устройства “гильотины” (приказ МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.).

Для оценки метаболизма костной ткани в сыворотке крови крыс определяли: содержание свободного и белковосвязанного оксипролина, активность щелочной фосфатазы, содержание кальция и неорганического фосфата. Проводилось биометрическое измерение массы и линейных размеров костей крыс.

Результаты и их обсуждение

Результаты гистологических и биохимических исследований показали, что у животных после овариоэктомии, и у животных, подвергавшихся высокотемпературному воздействию, развиваются процессы резорбции костной ткани. Нами отмечено снижение интенсивности биосинтеза коллагена, рассасывание костных стенок гаверсовых каналов, истончение костных балок спонгиозы и появление многочисленных остеокластов в нишах резорбции. Процессы разрежения костной ткани сопровождались активизацией функции коры надпочечников, проявляющейся в виде увеличения концентрации 11-оксикортикостероидов в тканях этих желез на 17-21%. Для оценки метаболизма костной ткани в сыворотке крови крыс определяли: содержание свободного и белковосвязанного оксипролина, активность щелочной фосфатазы, содержание кальция и неорганического фосфата. Проводилось биометрическое измерение массы и линейных размеров костей крыс. Полученные результаты свидетельствуют о снижении плотности костной ткани и потере костной массы в результате усиления резорбции. У животных после высокотемпературного воздействия и овариоэктомии отмечено повышение уровня свободного оксипролина (рис. 1), маркера резорбции костной ткани, до 40 %, в то время как содержание белковосвязанного оксипролина оставалось в пределах нормы.

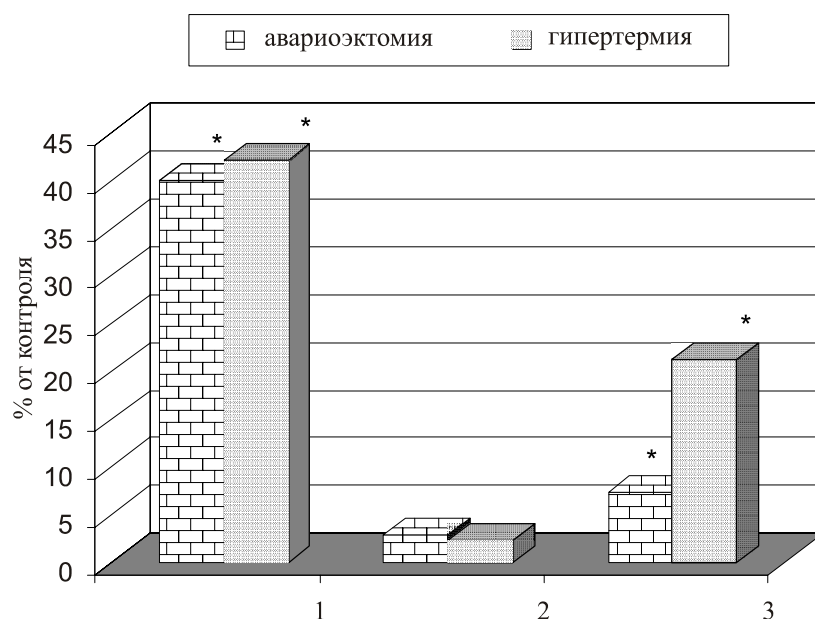


Рис. 1. Содержание свободного и белковосвязанного оксипролина в сыворотке крови крыс и 11-оксикортикостероидов в ткани надпочечников крыс после овариоэктомии и гипертермии. 1 – свободный оксипролин, 2 – белковосвязанный оксипролин, 3 – 11-оксикортикостероиды. * – отличия от контроля статистически значимы с доверительной вероятностью $p < 0,05$

Повышение активности щелочной фосфатазы, фермента разрушающего ингибиторы кальцификации и стимулирующего минерализацию костной ткани, не было отмечено в обеих экспериментальных группах. Уровень неорганического фосфата и кальция находился в основном в пределах нормы, что можно объяснить действием механизмов фосфорно-кальциевого гомеостаза. Таким образом, в исследуемых моделях выявлено повышение маркеров резорбции костной ткани.

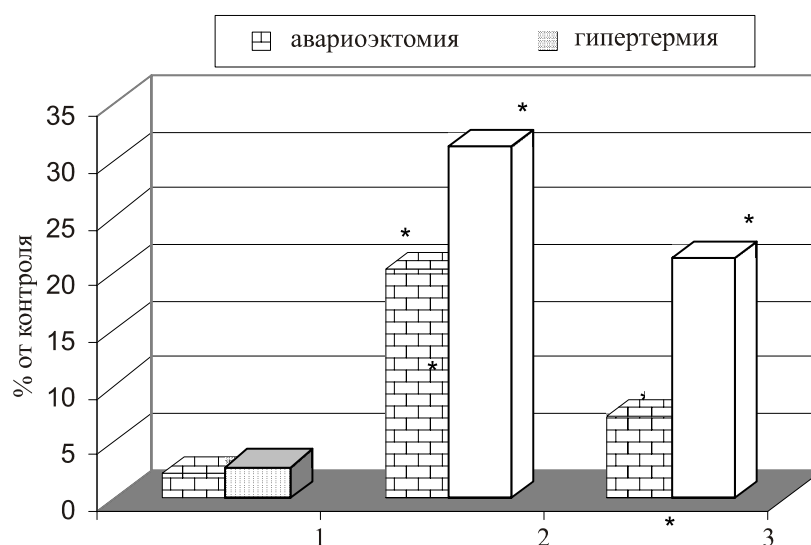


Рис. 2. Содержание свободного и белковосвязанного оксипролина в сыворотке крови крыс и 11-оксикортикостероидов в ткани надпочечников крыс после овариоэктомии и гипертермии при однократной инъекции гидроксиапатита. 1- свободный оксипролин, 2 – белковосвязанный оксипролин, 3 – 11- оксикортикостероиды. * - отличия от контроля статистически значимы с доверительной вероятностью $p < 0,05$

Выделенный по новой методике аллогенный гидроксиапатит был испытан нами в указанных моделях костной резорбции. Препарат однократно эктопически вводили в мышечную ткань животных, создавая, таким образом, депо гидроксиапатита. В результате исследований получены данные о значительных гистологических и биохимических изменениях показателей метаболизма костной ткани, свидетельствующих об активизации процессов остеогенеза [4,5], а именно, происходило увеличение концентрации белковосвязанного оксипролина в крови без изменений содержания свободного (рис.2). При этом внутримышечное введение аллогенного гидроксиапатита intactным животным не вызывало существенных морфологических изменений костной ткани. Уровень биохимических показателей метаболизма костной ткани в крови животных не выходил за пределы физиологической нормы, что не свидетельствовало о нарушении гомеостаза кальция. Никаких изменений содержания кальция и неорганического фосфора в крови не выявлено. По всей видимости, введение в мышечную ткань ГАП предположительно вызывает незначительное кратковременное повышение содержания соответ-

вующих минеральных компонентов в крови, что угнетает секрецию паратиреоидного гормона и приводит к снижению до уровня физиологической нормы концентрации кальция и неорганического фосфора. Морфологические исследования периферических органов иммуногенеза не обнаруживали наличия у препарата иммуногенных свойств [4]. Наряду с этим, при однократном внутримышечном введении суспензии аллогенного гидроксиапатита после многократного теплового воздействия, сохранялась повышенная активность функции коры надпочечников (на 21 %). Полученные результаты свидетельствуют о наличии неблагоприятного влияния изучаемого физического фактора на организм, что проявляется в усилении стрессовой реакции. При этом в крови животных происходили значительные изменения биохимических показателей метаболизма костной ткани в виде увеличения концентрации белковосвязанного оксипролина на 32 % при нормализации уровня свободного, что свидетельствует об усилении синтеза коллагена и замедлении процессов резорбции костной ткани.

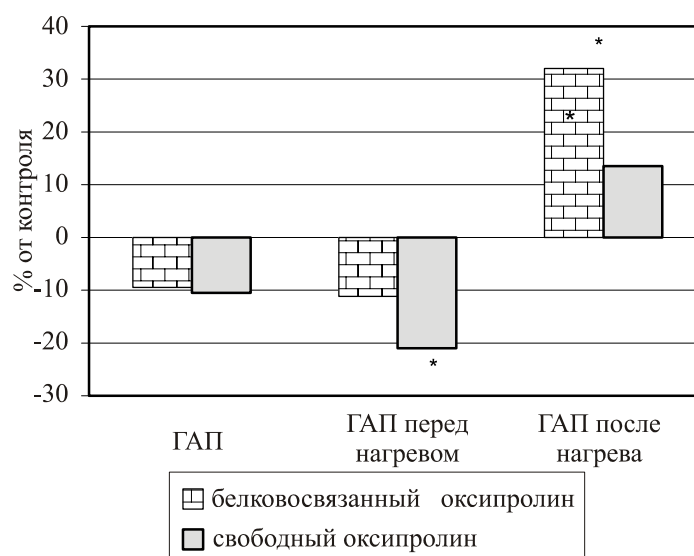


Рис. 3. Влияние введения аллогенного гидроксиапатита на уровень оксипролина в крови животных. * – отличия от контроля статистически значимы с доверительной вероятностью $p < 0,05$

Также изучалось комбинированное влияние инъекций ГАП на организм животных на фоне теплового воздействия (рис. 3). В первой серии животным однократно вводили суспензию ГАП. Через две недели нами было обнаружено, что внутримышечное введение аллогенного гидроксиапатита здоровым крысам не вызывает структурных нарушений костной ткани. Содержание оксипролина и кальция, уровень активности щелочной фосфатазы в крови животных не выходят за пределы физиологической нормы.

Во второй серии животным делали инъекции гидроксиапатита, а потом подвергали их тепловому воздействию. Спустя 2 недели после окончания термиче-

ского воздействия животных выводили из эксперимента. Было выявлено, что введение аллогенного гидроксиапатита перед началом курса тепловых процедур не вызывает изменения уровня белковосвязанного оксипролина, а уровень свободного оксипролина падает. Это свидетельствует о замедлении процессов распада коллагена.

В третьей серии суспензию ГАП животным вводили после окончания тепловых процедур. Установлено, что уже через 2 недели, происходят значительные изменения биохимических показателей в виде увеличения концентрации белковосвязанного оксипролина на 32 % при нормализации уровня свободного, что свидетельствует об усилении синтеза коллагена. Количество остеокластов снижается, а число активных остеобластов возрастает.

Таким образом, полученные экспериментальные результаты свидетельствуют об отсутствии нарушений метаболизма костной ткани после введения аллогенного гидроксиапатита в мышцу здоровым животным и наличии профилактического и терапевтического эффекта от его введения при повышенной костной резорбции в исследованных моделях у животных.

Заключение

Таким образом, использованные нами в опытах на животных экспериментальные модели позволили впервые оценить системные изменения в организме при эктопическом введении аллогенного гидроксиапатита, полученного по оригинальной разработке. Экспериментальные данные свидетельствуют о нормализации метаболизма и снижении процессов резорбции костной ткани, что может служить основанием к использованию этого препарата в профилактических целях при развитии резорбции костной ткани.

Литература

- [1] Франке, Ю. Остеопороз / Ю. Франке, Г. Рунге. – М.: Медицина, 1995. – 299 с.
- [2] Рожинская, Л.Я. Системный остеопороз / Л. Я. Рожинская. – М.: Мокеев, 2000. – 195 с.
- [3] Шварц, Г. Я. Фармакотерапия остеопороза / Г. Я. Шварц. – М.: Медицинское информационное агентство, 2002. – 368 с.
- [4] Изучение биохимических показателей в организме крыс при применении гидроксиапатит-содержащих препаратов / М.Ю. Власов [и др.] // Сборник тезисов и статей 36-ой итоговой научно-практической конференции Самарского военно-медицинского института. 2003. – С. 15-29.
- [5] Подковкин, В.Г. Показатели метаболизма костной ткани, функции коры надпочечников и состояния иммунокомпетентных органов у животных после эктопической имплантации аллогенного гидроксиапатита / В.Г. Подковкин [и др.] // Клинические и фундаментальные аспекты тканевой терапии. Теория и практика клеточных биотехнологий: Материалы всеросс. симпози. с междунар. участ. 2004. – С. 50-67.
- [6] Ермакова, И.П. Биохимические маркеры обмена костной ткани и их клиническое использование / И.П.Ермакова // Лаборатория. – М., 2001. – № 1. – С. 3-5.
- [7] Мазурова, В.И. Актуальные вопросы диагностики и лечения остеопороза / В.И. Мазурова, Е.Г. Зоткина. – СПб: Фолиант, 1998. – 95 с.

- [8] Лоренс Риггз, Б. Остеопороз: этиология, диагностика, лечение / Б. Лоренс Риггз. – М.: Бином, 2000. – 558 с.
- [9] Эпилтон Здоровые кости. Что необходимо знать об остеопорозе / Эпилтон, Ненси. – М.: КРОН-пресс, 1998. – 158 с.
- [10] Сергеева, Л.И. Физиология систем крови, кровообращения и внутренней секреции. Лабораторный практикум по курсу «Физиология человека и животных» / Л.И. Сергеева, В.Е. Кузьмина. – Самара: Самарский государственный университет, 1991. – 70 с.

Статья поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 26/XII/2006.

THE EFFECT OF ALLOGENIC HYDROXYAPATITE ON BONE TISSUE'S METABOLISM³

© 2007 E.V. Pisareva, M.Y. Vlasov, O.V. Gribkova, V.G. Podkovkin,
L.T. Volova, E.N. Arkhipova⁴

In the paper an allogenic hydroxyapatite's effect on process of bone tissue's metabolism into animals is studied. The effect of hydroxyapatite is tested on two models of bone's resorption – the model of transitory hyperthermia and hypoestrogenic model. The obtained data can lead to usage of allogenic hydroxyapatite in protection from development of bone tissue's resorption.

Paper received 25/IX/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

³ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. S.A. Satchkov.

⁴ Pisareva Elena Vladimirovna (pella1@rambler.ru), Vlasov Mikhail Yurievich, Gribkova Olga Vitalievna, Podkovkin Vladimir Georgievitch (podkovkin@rambler.ru), Volova Larisa Teodorovna, Arkhipova Ekaterina Nickolaevna, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.