

---

## БИОЛОГИЯ

---

УДК 577.3

# **ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОЗДУХА И ИНЪЕКЦИЙ ГИДРОКСИАПАТИТА НА ПОКАЗАТЕЛИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА КОСТНОЙ ТКАНИ**

© 2007 Н.В.Сундукова, В.Г. Подковкин<sup>1</sup>

Исследованы показатели минерального обмена в норме, при температурных нагрузках и внутримышечных инъекциях аллогенного гидроксиапатита. В ходе эксперимента выявлены изменения содержания некоторых микроэлементов в костной ткани. Рассмотрены возможности использования внутримышечных инъекций в лечении остеопороза.

## **Введение**

В течение последних лет остеопороз (ОП) рассматривается как одна из значимых проблем клинической медицины, что определило интенсификацию научных исследований в этом направлении [6]. Не смотря на возросший интерес к проблеме ОП, остается не решенным целый комплекс важных вопросов и практических задач. Имеются лишь отдельные исследования, характеризующие минеральный дисбаланс.

За последнее десятилетие в литературе появились экспериментальные данные демонстрирующие остеогенные свойства синтетического кальций-фосфатного соединения – гидроксиапатита (ГАП) – и биосовместимых материалов на его основе. В ряде экспериментальных моделей на животных показано, что введение ГАП в мышечную ткань влияет на остеоиндуктивные процессы. Введение гидроксиапатит-содержащих препаратов может являться одним из способов управления физиологической регенерацией соединительной ткани. В большинстве экспериментов прибегали к использованию синтетического ГАП, содержащего только кальций и фосфор. Нами разработана методика получения ГАП путем нейтрализации деминерализатов костной ткани животных и снижения его анти-

---

<sup>1</sup>Сундукова Наталья Владимировна, Подковкин Владимир Георгиевич (podkovkin@rambler.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Академика Павлова, 1.

генности за счет сжигания примесей органических веществ в муфельной печи. Преимущества данного способа получения заключаются в значительной дешевизне производства по сравнению с синтетическими аналогами ГАП. Используемый в наших экспериментах ГАП содержит кальций, магний, железо и другие микроэлементы в соотношении, близком к составу минерального компонента кости, что является немаловажным фактом, поскольку микроэлементы необходимы для нормального протекания многих физиологических и биохимических процессов.

К настоящему времени накоплены значительные литературные данные, показывающие весьма важную роль микроэлементов не только в процессах обновления кристаллической решетки, но в прямом влиянии на остеогенные клеточные элементы.

Ряд микроэлементов (Mn, Co, Cu) участвует в катализе ферментативных реакций, протекающих в остеогенных клетках, и без их присутствия нарушается, например, остеобластическая и остеокластическая дифференцировка. Кроме того, микроэлементы принимают активное участие в энзиматических процессах коллагеновых фибрилл (марганец, ванадий и др.). Гидроксиапатитовая кристаллическая решетка костной ткани имеет огромную площадь, на которой в большом количестве адсорбируются ионы, обладающие способностью обмениваться с окружающей внутритканевой средой. Все эти процессы каталитически и материально протекают с участием различных микроэлементов, особенно обладающих меняющейся валентностью.

Микроэлементы, входя в состав металлоэнзимов, витаминов и других комплексных высокоактивных биополимеров, играют важную интегрирующую функцию на различных уровнях организации [11]. Магний относится к числу важнейших минеральных веществ, универсальных регуляторов биохимических и физиологических процессов. Магний служит обязательным кофактором для более трехсот ферментов, регулирующих различные функции организма, в том числе ферментов мышечной ткани и эритроцитов [9, 16, 17]. Биологическая роль магния связана с его участием в энергетическом, пластическом и электролитном обмене [14]. Обмен магния регулируется щитовидной и паращитовидной железами и корой надпочечников.

Широко известно, какое большое общебиологическое значение имеет железо. Установлено, что оно способно накапливаться в зонах энхондрального и периостального костеобразования, способствуя процессу стабилизации гидроксиапатита в остеонидной субстанции. Железо также служит косвенным тестом для оценки степени гемоснабжения костной ткани и регенерата, показателем компенсаторно-адаптационных потенций организма. Высокая метаболическая роль цинка обусловлена тем, что он является активатором ряда ферментов, в том числе щелочной фосфатазы костной ткани. Цинк угнетает активность железосодержащих ферментов цитохромоксидазы и каталазы, которые играют важную роль в повышении способности остеобластов к синтезу коллагена. Входя в состав ви-

тамина В<sub>12</sub> (цианкобаламина), кобальт стимулирует общий обмен, гемопоэз и, таким образом, вторично влияет на интенсивность костного метаболизма. Соединения кобальта усиливают активность щелочной фосфатазы, играющей важную роль в минерализации костной ткани. Считается, что хром способен к ионообмену с кальцием подобно ионообмену стронция и адсорбированию на поверхности кристаллической решетки гидроксиапатита [7, 1].

Одним из основных показателей метаболизма коллагена является содержание оксипролина. Оксипролин (производное пролина) – одна из основных аминокислот коллагена, что позволяет считать его маркером, отражающим катаболизм этого белка. При нарушениях синтеза коллагена уменьшаются поперечные связи в фибриллах коллагена, что приводит к возрастанию содержания легкорастворимого коллагена. Поэтому при нарушении метаболизма соединительной ткани увеличивается содержание его свободной фракции и уменьшается содержание связанной фракции. При этом выраженность биохимических изменений коррелирует с тяжестью патологического процесса [5].

Целью нашей работы было экспериментальное выявление тенденции биохимических показателей обмена костной ткани крыс в условиях усиления костной резорбции при повторяющихся температурных нагрузках и инъекциях аллогенного гидроксиапатита, осажденного в щелочной среде.

## Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 28 белых беспородных половозрелых крысах массой от 230 до 450 г. Гидроксиапатит получали путем нейтрализации при значениях pH 12 солянокислых растворов после деминерализации костной ткани [2]. Животные были разделены на две опытные группы. Животных первой группы подвергали тепловым нагрузкам в течение двух недель 70°C, 10 минут. Режим тепловых нагрузок был опробован предыдущими исследованиями. Второй группе с помощью одноразового шприца в левую бедренную мышцу делали инъекции гидроксиапатита pH 12 (40 мг в 0,2 мл стерильного физиологического раствора) и далее подвергали тепловым нагрузкам в течение двух недель 70°C, 10 минут. Контрольной группе животных делали инъекции физиологического раствора в соответствующей дозе.

После декапитации животных, бедренные кости извлекали, высушивали и сжигали в муфельной печи. Зола в дальнейшем использовалась для определения микроэлементов атомно-абсорбционным методом на приборе фирмы Varian Spectr AA 200 [4]. Концентрацию свободного и белковосвязанного оксипролина определяли в плазме по реакции с *n*-диметиламинобензальдегидом, образующим с аминокислотой окрашенное соединение [12]. Определение 11-ОКС проводили по методу Ю.А. Панкова, И.Я. Усватовой, в модификации В.Г. Подковкина (1988 а), на флуориметрическом приборе БИАН-130. Метод основан на экстракции гормонов хлороформом и измерении их флуоресценции в смеси концентри-

рованной серной кислоты и этилового спирта. Холестерин и другие липиды удаляют предварительной экстракцией гексаном, в который стероиды не переходят. Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации гормонов. Малоновый диальдегид определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, в результате которой образуется окрашенный комплекс, по методу И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили [12]. Измерения оптической плотности исследуемых проб проводили на фотоколориметре КФК-2. В гомогенатах печени определяли активность каталазы по методу М.А. Королюка и Л.И. Ивановой (1988). Статистическая обработка полученных данных осуществлялась по критерию достоверности Стьюдента [13].

## Результаты исследований

В группе, получавшей внутримышечные инъекции аллогенного ГАП и подвергшейся тепловому воздействию в течение 2 недель, мы выявили тенденцию к увеличению отношения массы сырой бедренной кости к общей массе животного на 16,36% по отношению к контролю (отличие не является статистически значимым). Тогда как в группе, на которую 2 недели действовал только температурный фактор, отношение массы сырой бедренной кости к общей массе животного достоверно уменьшалось на 12,13% по отношению к контролю. В ходе эксперимента были получены данные по содержанию серебра, кобальта, хрома, железа, магния, цинка (таблица 1).

Таблица 1

### Влияние стрессовых температурных нагрузок и инъекций гидроксиапатита на содержание минеральных элементов в костной ткани крыс

|         | Экспериментальные группы и способ воздействия |                  |                            |
|---------|-----------------------------------------------|------------------|----------------------------|
|         | Контроль                                      | Нагрев           | Нагрев и ГАП крысиный ph12 |
| Ед. изм | МГ/Г СЫРОЙ КОСТИ                              | МГ/Г СЫРОЙ КОСТИ | МГ/Г СЫРОЙ КОСТИ           |
| Ag      | 0,00997 ±0,0005                               | 0,00749±0,0004*  | 0,00942±0,00046            |
| Co      | 0,00826±0,0003                                | 0,00693±0,0006*  | 0,00853±0,0003             |
| Cr      | 0,00811±0,00027                               | 0,00634±0,00049* | 0,00806±0,00039            |
| Fe      | 0,01964±0,00134                               | 0,01302±0,00218* | 0,01688±0,00086            |
| Mg      | 2,61531±0,05989                               | 1,7488±0,1313*   | 2,20474±0,07487*           |
| Zn      | 0,2831±0,0177                                 | 0,21618±0,0146*  | 0,26756±0,01259            |

Тепловая нагрузка в течение двух недель вызывала уменьшение содержания магния на 33,2%, а при тепловом стрессе, сопровождаемом инъекциями гидроксиапатита – на 15,7%. Отличия достоверны по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Содержание серебра, кобальта, хрома, железа и цинка достоверно снижалось соответственно на 24,9%, 16,1%, 21,8%, 33,7%, 23,6% при тепловых нагрузках. В группе животных подвергавшихся нагреву с инъекциями ГАП содержание микроэлементов не значительно отличалось от контроля. Ниже предела обнаружения оказались: медь, кадмий, свинец и мышьяк.

Свободный и белковосвязанный оксипролин мы определяли в плазме крови (таблица 2). После двухнедельного воздействия мы отмечали тенденцию к уменьшению содержания свободного и белковосвязанного оксипролина соответственно на 35% и 26,6% (отличия не являются статистически значимыми). Нами не было выявлено существенных нарушений в обмене коллагена после двух недель температурных воздействий с инъекциями гидроксиапатита. Содержание свободного и связанного оксипролина в плазме колебалось в пределах 15%, причем в обоих случаях отличие не является статистически значимым. Активность каталазы в печени не значительно отличалась от контроля (на 4,01%), содержание малонового диальдегида достоверно снизилось на 25,04% по сравнению с контролем.

Мы также предприняли попытку выявить биохимические изменения в уровне глюкокортикоидов. Известно, что глюкокортикоиды снижают синтез коллагена в костях, способствуют потере кальция и остеопорозу. В реализации гормонального ответа при стрессовом воздействии непосредственное участие принимает кора надпочечников. Клетки пучковой зоны коры надпочечников синтезируют у крыс преимущественно кортикостерон. Нами было исследовано содержание 11-ОКС в надпочечниках; в плазме крови, осуществляющей связывание гормонов белками и их транспорт к тканям-мишеням; в печени, где в основном все глюкокортикоиды подвергаются инактивации. Нам не удалось выявить достоверных изменений концентраций кортикостероидов приповторяющихся температурных воздействиях. В группе животных, подвергавшихся нагреву в течение двух недель, уровень гормонов слегка увеличился. В группе, где температурные нагрузки сопровождались инъекциями гидроксиапатита рН 12, выявлена тенденция к повышению уровня глюкокортикоидов в надпочечниках и плазме на 2,55% и 28,72% соответственно (отличия не достоверны по сравнению с контролем), в печени 11-ОКС выросли на 87,18% (отличия достоверны по сравнению с контролем).

Таблица 2

**Влияние температурных воздействий, сопровождаемых  
инъекциями аллогенного ГАП на обмен коллагена,  
содержание МДА и активность каталазы**

|                                                        | Контроль n=8 | Нагрев и аллогенный<br>ГАП pH 12n=8 |
|--------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| Свободный оксипролин<br>в плазме, мкмоль/л             | 11,602±2,800 | 10,573±1,386                        |
| Связанный с белком<br>оксипролин в плазме,<br>мкмоль/л | 76,755±6,812 | 88,435±14,229                       |
| МДА в печени,<br>мкмоль/г                              | 13,085±1,091 | 9,809±0,950*                        |
| Активность каталазы<br>в печени, нмоль/г/мин           | 14,977±1,790 | 15,577±2,448                        |

Примечание: \* – отличие от контроля статистически значимо ( $p < 0,05$ ).

## Обсуждение результатов

В последнее время весьма актуальной в практической медицине стала проблема регуляции регенерации соединительной ткани с помощью кальций-содержащих препаратов. Можно предположить, что введение гидроксиапатита, полученного из естественного материала и содержащего помимо кальция и фосфора сбалансированное количество микроэлементов, необходимых для функционирования костной ткани, благотворно отразится на костеобразовании. Инъекции ГАП создают своеобразное депо минеральных веществ в организме, независимо от уровня всасывания кальция и фосфора в кишечнике.

Известно, что стрессовые раздражители различной природы вызывают нарушение гомеостаза организма. Чем более сильным и продолжительным будет воздействие, тем отчетливей и дольше будет ответная реакция организма на повреждающее влияние внешнего (или внутреннего) неблагоприятного фактора. Стрессовые воздействия способны снижать скорость синтеза коллагена при усилении его деструкции, вызывать активный выход минеральных веществ из кости, изменять соотношение функций клеток остеобластического ряда. При продолжительном неблагоприятном воздействии в костной ткани появляются первые признаки усиления ее резорбции, что выражается в снижении плотности костей и содержания минеральных веществ в них, нарушении биосинтетических процессов.

Наиболее часто дефицит магния сопровождается развитием стрессовых состояний. Стрессы различной природы (физические, психические) увеличивают потребность в магнии и служат причиной внутриклеточной магниевой недостаточ-

ности. Стресс и магниевая недостаточность являются взаимно обуславливаемыми процессами, обоюдно усугубляющими друг друга. В условиях стресса выделяется повышенное количество адреналина и норадреналина, способствующих выведению магния из клеток. Длительные тепловые нагрузки приводят к разрушению костной ткани [10], что подтверждается нашими морфологическими и биохимическими исследованиями. При продолжительном тепловом воздействии в костной ткани появляются первые признаки усиления ее резорбции, что выражается в снижении плотности костей и содержания минеральных веществ в них. Так, после двух недель температурных нагрузок мы отмечали статистически значимое уменьшение отношения массы сырой бедренной кости к общей массе животного на 12,3%. Депо микроэлементов создаваемое в мышечной ткани инъекциями ГАП может влиять на обмен кальция, магния, фосфора, а также на обмен коллагена в костной ткани. В то же время избыток ряда микроэлементов и их сочетаний угнетает метаболизм, усвояемость питательных веществ, в том числе и минеральных, в желудочно-кишечном тракте (стронций, бериллий, магний, медь, алюминий). Действуя по принципу обратной связи, микроэлементы, гормоны, ферменты, витамины, медиаторы и другие биологически активные вещества, как при физиологическом остеогенезе, так и при регенерации обеспечивают анаболическую направленность костного метаболизма. Так, продукция анаболических гормонов происходит при мобилизации меди, кобальта, марганца и др. Активизация ферментов и энзиматических систем также происходит с участием микроэлементов. Ряд авторов указывают на отсутствие корреляции между сывороточным и внутритканевым содержанием магния [3, 7]. Возможно, этим обусловлено отсутствие достоверных различий между показателями в первой и во второй группах, т.е. находящийся в мышечной ткани гидроксипатит лишь частично способен компенсировать состояние гипомagneмии в костной ткани в условиях повторяющихся температурных воздействий.

## **Выводы**

1. Повторяющиеся температурные нагрузки вызывают усиление процессов костной резорбции, подтверждающиеся морфологическими и биохимическими методами.

2. Повторяющиеся температурные нагрузки вызывают достоверное снижение содержания серебра, кобальта, хрома, железа и цинка соответственно на 24,9%, 16,1%, 21,8%, 33,7%, 23,6%.

3. Инъекции гидроксипатита сопровождающие температурные нагрузки частично компенсируют дефицит магния, серебра, кобальта, хрома, железа и цинка.

4. Температурные нагрузки в течение двух недель и инъекции гидроксипатита не оказывают существенного влияния на обмен коллагена в костной ткани.

## Литература

- [1] Микроэлементозы человека (этиология, классификация, органопатология) / А.П. Авцын [и др.] – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
- [2] Волова, Л.Т. Способ получения аллогенного гидроксиапатита / Л.Т. Волова, В.Г. Подковкин. – Патент на изобретение № 2168998, 2000 г. – РФ. – 4 с.
- [3] Гринштейн, Б. Наглядная биохимия / Б. Гринштейн, А. Гринштейн. – М.: Медицина, 2000. – С. 68-69.
- [4] Ермаченко, Л.А. Атомно-адсорбционный анализ в санитарно-гигиенических исследованиях / Л.А. Ермаченко под ред. Подуновой Л.Г. М., 1997 г.
- [5] Кадурина, Т.И. Наследственные коллагенопатии. Клиника, диагностика, лечение, диспансеризация / Т.И. Кадурина. – СПб.: Невский диалект, 2000. – 270 с.
- [6] Лоренс, Риггс Б. Остеопороз. Этиология. Диагностика. Лечение / Риггс Б. Лоренс, Мелтон Джозеф. – М.: БИНОМ, 2000. – 558 с.
- [7] Мари, Р. Биохимия человека: В2-х т.Т.1. / Р. Мари, Д. Греннер, П. Мейес и др. – пер с англ.: – М.: Мир, 1993. – 384 с.
- [8] Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – М.: Медицина, 1969.
- [9] Павлов, О.Б. Нарушения водно-электролитного обмена и кислотно-основного состояния. Инфузионная терапия / О.Б. Павлов, В.М. Смирнов. – Мн.: БГМУ, 2003. – 45 с.
- [10] Подковкин, В.Г. Модификация влияния повышенной температуры окружающей среды на биохимические процессы с помощью искаженного геомагнитного поля / В.Г. Подковкин, Е.В. Писарева, Н.В. Аленина // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т.40. – № 1. – С. 130-132.
- [11] Скоблин, А.П. Микроэлементы в костной ткани / А.П. Скоблин, А.М. Белоус. – М.: Медицина, 1968. – 217 с.
- [12] Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
- [13] Фролов, Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование / Ю.П. Фролов. – Самара: Изд-во СамГУ, 1997. – 265 с.
- [14] Чекман, И.С. Магний в медицине / И.С. Чекман, Н.А. Горчакова, С.Л. Николай. – Кишинев, 1992. – 101 с.
- [15] Метаболизм магния и терапевтическое значение его препаратов: пособие для врачей / М.А. Школьников [и др.] – М: Медпрактика, 2002.
- [16] Altura, B.M. Basic biochemistry and physiology of magnesium: a brief review / B.M. Altura // Magnesium & Trace Elements. – 1991. – V.10. – P. 167-171.
- [17] Ebel, H. Magnesium metabolism: a review / H. Ebel, T. Gunther. // J. Clin. Chem. & Clin. Biochem. – 1998. – V.18. – P. 257-270.

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

**EFFECT OF HYDROXYAPATITE INTRAMUSCULAR  
INJECTION AND HIGH TEMPERATURES ON MODEL  
OF MINERAL METABOLISM**

© 2006 N.V. Sundukova, V.G. Podkovkin<sup>1</sup>

In the paper a model of mineral metabolism in normal conditions, under high temperature and intramuscular injection of allogenic hydroxyapatite is studied. The variation in concentration of mineral elements at bone tissue is found. The possibility of osteoporosis treatment by intramuscular injections is considered.

Paper received 26/XII/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

---

<sup>1</sup> Sundukova Natalia Vladimirovna, Podkovkin Vladimir Georgievich (podkovkin@rambler.ru), Dert. Of Biochemystry of Samara State University, 443011, Samara, Russia.