

© Коллектив авторов, 2018
УДК 611.018.4:612.11:616.71-089.28-77
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13023>
ISSN – 2073-8137

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОСТЕОГЕНЕЗА И ВОСПАЛЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ КСЕНОИМПЛАНТАЦИИ

А. Н. Накоскин, М. А. Ковинька, И. А. Талашова, Н. В. Тушина, С. Н. Лунева

Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»
им. академика Г. А. Илизарова, Курган

BIOCHEMICAL MARKERS OF OSTEOGENESIS AND INFLAMMATION IN THE BLOOD SERUM IN XENOIMPLANTATION

Nakoskin A. N., Kovin'ka M. A., Talashova I. A., Tushina N. V., Luneva S. N.

Russian Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics
named after G. A. Ilizarov, Kurgan

Изучены биохимические показатели костного ремоделирования в сыворотке крови при ксеноимплантации внеклеточного матрикса в костные дефекты у кроликов. В качестве ксеноимплантов использовали материал, полученный по оригинальной технологии из костной ткани быков, лошадей, кроликов. Также изучалась возможность использования комплексных ксеноматериалов на основе костной ткани и антибиотика. Не обнаружено значимых отличий в реакции различных тканей и органов при ксеноимплантации и аллоимплантации. Установлено, что при ксеноимплантации комплексного материала на основе костной ткани и антибиотика наблюдается выраженная воспалительная реакция на имплантацию.

Ключевые слова: ксеноимплантация, щелочная фосфатаза, кислая фосфатаза, С-реактивный белок, белковые фракции, замещение дефектов костей

Biochemical indices of bone remodeling in the blood serum were studied in the case of xenoimplantation of extracellular matrix into bone defects in rabbits. The material obtained by the original technology from the bone tissue of bulls, horses, rabbits was used as xenoimplants. The possibility of using complex xenon materials based on bone tissue and antibiotic was also studied. There were no significant differences in the response of various tissues and organs with xenoimplantation and alloimplantation. It was found that with xenoimplantation of a complex material on the basis of bone tissue and an antibiotic, a pronounced inflammatory reaction to implantation is observed.

Keywords: xenograft, alkaline phosphatase, acid phosphatase, C-reactive protein, protein fractions, substitution of bone defects

Травмы и другие повреждения опорно-двигательной системы (ОДС) часто приводят к стойкой нетрудоспособности и фатальному исходу. По частоте встречаемости они уступают место только сердечно-сосудистой патологии и онкологическим заболеваниям [1]. По данным российской статистики, заболеваниями позвоночника и крупных суставов страдают до 80 % населения страны [2]. Особенно актуальна проблема заболеваний ОДС у лиц молодого трудоспособного возраста [5].

В связи с ростом числа патологии опорно-двигательной системы возрастает и количество реконструктивных операций, требующих замещения костной ткани [3]. Как правило, при реконструктивных оперативных вмешательствах используются имплантационные материалы, восполняющие дефект кости. По данным Л. М. Огородовой [6], инвестиции в разработку костных имплантатов за последние годы значительно увеличились и имеют тенденцию к росту. Поэтому разработка и внедрение в клиническую практику новых недорогих имплантационных материалов имеет и экономическое значение.

Независимо от природы своего происхождения костные имплантаты должны отвечать определенным требованиям. В частности, обладать биологической совместимостью с тканями реципиента, а также биоиндуктивными и биокондуктивными свойствами и характеризоваться отсутствием аутоиммунной реакции. Предлагаемые практикующему хирургу имплантационные материалы искусственного или природного происхождения не всегда эффективны [7]. Альтернативным решением проблем возмещения потребности в имплантационных материалах могли бы стать ксеноматериалы. Однако использование ксеноматериалов весьма ограничено. Это связано с тем, что на сегодняшний день комплексные исследования межвидовых отличий молекулярного состава костной ткани единичны. В этой связи является актуальным исследование на молекулярном уровне ответной реакции тканей и органов на ксеноимплантацию.

Цель исследования – изучить биохимические показатели регенерации костной ткани в сыворотке крови в ответ на ксеноимплантацию материалов, полученных из костной ткани различных животных.

Материал и методы. В качестве объектов исследования использовали кроликов вида *Oryctolagus cuniculus* породы «Советская шиншилла». У всех животных моделировали цилиндрический дефект дистального метафиза большеберцовой кости и тел 4 и 5 поясничных позвонков. Полученные дефекты в экспериментальных группах заполняли ксеноимплантационными материалами. Материалы для ксеноимплантации получали из губчатой костной ткани быка (*Bos Taurus taurus*) и лошади (*Equus Linnaeus*). Аллоимплантационные материалы получали из губчатой костной ткани позвонков кролика. Ксено- и аллоимплантационные материалы получали по оригинальной технологии [4]. Экспериментальные животные были распределены на следующие серии: 1 – контрольная группа (n=6) – дефект без заполнения; 2 – группа (n=6) с имплантацией алломатрикса костной ткани кролика; 3 – группа (n=6) с имплантацией ксеноматрикса костной ткани быка; 4 – группа (n=6) с имплантацией ксеноматрикса костной ткани лошади; 5 – группа (n=6) с имплантацией ксеноматрикса костной ткани лошади, инкубированного с ванкомицином.

Забор крови для биохимических исследований производили венепункцией краевой вены уха. Кровь центрифугировали на лабораторной центрифуге ЦЛ-1 (Россия). Забор крови проводили на 3, 7, 14, 30, 60, 90 сутки эксперимента. Сыворотку крови отделяли от сгустка пипеточным дозатором. В ходе эксперимента по имплантации ксеноматериалов у животных определяли содержание фракций белков сыворотки крови. Электрофоретическое разделение и идентификацию фракций белков сыворотки крови проводили с помощью автоматического электрофоретического анализатора SAS-1plus, автоматической системы обработки гелей SAS-2 (Helena Biosciences

Europe, Великобритания) и программного обеспечения Platinum III. Концентрацию кальция, фосфора, креатинина, С-реактивного белка, мочевины, активность общей щелочной фосфатазы и тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы определяли на автоматическом анализаторе Hitachi-902 (Япония) с использованием наборов реагентов фирмы Vital Diagnostics Spb.

Статистическая обработка полученных результатов включала вычисление средних значений в группах, ошибки средней. Наличие динамики исследуемых показателей определяли с использованием критерия Краскелла – Уоллиса, уровень значимости $p \leq 0,05$.

Проведенные экспериментальные исследования выполнялись в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, и с одобрения Этического комитета Центра Илизарова.

Результаты и обсуждение. Анализируя результаты измерения концентраций общего кальция в сыворотке крови экспериментальных животных, мы пришли к выводу, что каких бы то ни было изменений в его содержании на всех сроках эксперимента в большинстве групп не происходило. Исключением является экспериментальная группа, в которой в качестве ксеноимпланта использовали костный материал лошади с добавлением ванкомицина (группа 5). В этой группе мы наблюдали рост концентрации общего кальция в сыворотке крови кроликов вплоть до 14 суток эксперимента. На последующих сроках происходило ее плавное снижение. Статистический анализ показал достоверный характер этих изменений (табл. 1).

Таблица 1

Динамика концентрации общего кальция и фосфатов в сыворотке крови кроликов, ммоль/л

Группа		До опер.	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
1 (n=6)	Ca	3,7±0,2	3,6±0,2	-	3,7±0,1	3,6±0,1	3,7±0,1	3,6±0,1
	P	1,58±0,13	1,70±0,30	-	1,63±0,15	1,69±0,24	1,55±0,18	1,56±0,23
2 (n=6)	Ca	3,7±0,1	3,5±0,4	3,8±0,1	3,9±0,1	3,7±0,2	3,7±0,2	3,6±0,3
	P	1,33±0,17	1,52±0,35	1,41±0,13	1,54±0,13	1,30±0,19	1,44±0,28	1,33±0,17
3 (n=6)	Ca	3,6±0,1	3,5±0,2	3,6±0,1	3,6±0,1	3,6±0,1	3,6±0,1	3,5±0,1
	P	0,73±0,57	1,92±1,22	1,61±0,20	1,47±0,77	1,56±0,26	1,57±0,07	0,73±0,57
4 (n=6)	Ca	3,6±0,2	3,5±0,1	3,5±0,2	3,7±0,2	3,7±0,2	3,8±0,2	3,5±0,3
	P	1,70±0,16	1,33±0,53	1,56±0,15	1,67±0,21	1,70±0,16	1,60±0,11	1,70±0,16
5 (n=6)	Ca*	3,7±0,1	3,9±0,1	3,8±0,1	4,0±0,2	3,7±0,1	3,4±0,2	3,4±0,1
	P	1,40±0,17	1,46±0,10	1,41±0,12	1,56±0,21	1,42±0,17	1,42±0,20	1,40±0,17

* Отмечена группа экспериментальных животных, в которой установлена достоверная динамика изменения показателя по критерию Краскелла – Уоллиса с уровнем значимости $p \leq 0,05$.

По полученным данным во всех экспериментальных группах на этапах эксперимента достоверных различий в концентрации фосфора не выявлено. Содержание фосфора в сыворотке крови контрольной и опытных групп кроликов колебалось в пределах физиологической нормы и не отличалось от дооперационных значений (см. табл. 1).

Во всех опытных группах не наблюдалось достоверных изменений активности щелочной фосфатазы в течение всего эксперимента. Однако можно отметить тенденцию к снижению ее активности к третьим суткам после операции. Также отмечалось увеличение активности щелочной фосфатазы во всех группах к 90 суткам эксперимента (данные не достоверны).

Достоверную отрицательную динамику активности щелочной фосфатазы наблюдали в контрольной группе (табл. 2).

Полученные данные об активности костного изофермента кислой фосфатазы в сыворотке крови кроликов на этапах эксперимента свидетельствуют о том, что у животных контрольной группы активность костного изофермента кислой фосфатазы снижалась к 90 суткам эксперимента. У кроликов с аллоимплантацией и ксеноимплантацией материала, полученного из костной ткани лошади с ванкомицином, в ранние сроки эксперимента наблюдалась повышенная активность костного изофермента кислой фосфатазы.

Таблица 2

Динамика активностей щелочной фосфатазы и тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы в сыворотке крови кроликов, ЕД/л

Группа	До опер.	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки	
1 (n=6)	ЩФ*	86±17	50±11	–	61±10	69±8	64±11	53±9
	ТрКФ	36±10	41±9	35±11	–	26±11	31±6	22±2
2 (n=6)	ЩФ	66±28	42±10	49±9	57±11	57±15	45±14	47±16
	ТрКФ*	34±10	51±9	43±8	51±10	38±8	22±5	34±10
3 (n=6)	ЩФ	94±45	53±12	64±15	60±13	82±37	70±26	65±20
	ТрКФ	31±10	37±9	32±8	33±10	28±8	19±8	31±10
4 (n=6)	ЩФ	59±20	48±22	59±39	53±23	49±14	42±16	43±6
	ТрКФ*	29±10	39±17	40±18	31±11	34±10	28±4	29±10
5 (n=6)	ЩФ	92±49	54±18	58±16	53±20	52±13	61±25	42±3
	ТрКФ*	32±5	53±10	51±8	41±17	20±10	30±9	32±5

* Отмечены группы экспериментальных животных, в которых установлена достоверная динамика изменения показателя по критерию Краскелла – Уоллеса с уровнем значимости $p \leq 0,05$.

Измерения содержания С-реактивного белка в сыворотке крови кроликов позволили сделать заключение о достаточно широких пределах вариации данного показателя. Статистический анализ не выявил достоверной динамики С-реактивного белка в сыворотке крови в контрольной группе, а также в опытных группах с аллоимплантацией костного материала кролика и ксеноимплантацией костного материала лошади. Динамика содержания С-реактивного белка с уровнем значимости $p \leq 0,05$ установлена в двух опытных группах: группа с ксеноимплантацией костного материала

быка и группа с ксеноимплантацией костного материала лошади с добавлением ванкомицина. Динамика в этих группах была несколько различной. Так, увеличение содержания С-реактивного белка в группе с ксеноимплантацией костного материала быка происходило сразу после операции к третьим суткам эксперимента. В последующем наблюдали его плавное снижение к 90 суткам эксперимента. В группе с ксеноимплантацией костного материала лошади с добавлением ванкомицина рост содержания С-реактивного белка наблюдали к 7–14 суткам эксперимента (табл. 3).

Таблица 3

Динамика концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови кроликов, ммоль/л

Группа	До операции	3 сутки	7 сутки	14 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
1 (n=6)	4,9±3,7	11,2±10,2	–	7,7±5,5	5,3±4,7	2,2±2,7	7,7±7,7
2 (n=6)	14,4±10,4	21,8±9,7	9,2±6,7	7,0±5,5	6,2±3,2	10,7±7,2	–
3 (n=6)	12,8	25,6±15,6	9,6±2,4	2,7±2,1	2,8±2,0	9,4±6,4	3,0±2,2
4* (n=6)	2,1±3,4	13,1±8,2	12,1±4,0	11,4±7,5	13,2±7,8	7,0±6,8	6,0±4,8
5* (n=6)	3,1±2,9	2,9±4,6	8,7±7,1	8,8±6,6	3,8±3,0	5,9±4,4	2,8±1,9

* Отмечены группы экспериментальных животных, в которых установлена достоверная динамика изменения показателя по критерию Краскелла – Уоллеса с уровнем значимости $p \leq 0,05$.

Анализ белковых фракций белков сыворотки крови показал, что во всех группах в первую неделю после имплантации наблюдалось статистически значимое снижение содержания альбуминов по сравнению с дооперационными значениями. Содержание белков, мигрирующих в зону $\alpha 1$ -глобулинов, было сниженным относительно дооперационного уровня. В эти же сроки концентрация фракции $\alpha 2$ -глобулинов статистически значимо превышала дооперационные значения. Соотношение альбумин/глобулины было ниже дооперационного в первые две недели эксперимента.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что реакция воспаления, характерная для оперативного вмешательства, в частности имплантации ксеноматериалов, проявилась в повышенном содержании белков, мигрирующих при электрофорезе в зону $\alpha 2$ -глобулинов. Среди них С-реактивный белок – главный модератор воспаления, компонент неспецифического иммунного ответа; белок острой фазы гаптоглобин, защитное действие которого проявляется в связывании свободного гема

и уменьшением оксидативного стресса; ингибитор протеиназ $\alpha 2$ -макроглобулин, компенсаторно повышающийся при гипоальбуминемии; церулоплазмин, участвующий в регуляции окислительно-восстановительного потенциала.

Колебания концентраций биохимических маркеров костеобразования, которые наблюдались на начальных сроках эксперимента, происходили либо в пределах физиологической нормы, либо отражали реакцию организма на повреждение костной ткани и не отличались в зависимости от типа ксеноимплантата. Все значимые изменения концентраций биохимических маркеров происходили в экспериментальной группе, в которой в составе костного ксеноимплантата применялся ванкомицин. Иными словами, в этой группе мы наблюдали реакцию организма на введение антибиотика, а не на ксеноимплантацию.

Таким образом, результаты проведенных исследований указывают на отсутствие значимых различий в реакции организма на имплантацию ксеноматериалов.

Литература

1. Бюллетень ВОЗ № 310: Десять ведущих причин смерти в мире // Всемирная организация здравоохранения: сайт, 2014 г. – Режим доступа: <http://>

www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/index2.html.
2. Исмагилов, М. Ф. Издержки современной практической неврологии / М. Ф. Исмагилов, Н. И. Галиуллин,

- Д. Р. Мингалева // Неврологический вестник. – 2005. – Т. XXXVII, вып. 1–2. – С. 105–107.
3. Кирилова, И. А. Костная ткань как основа остеопластических материалов для восстановления кости / И. А. Кирилова // Хирургия позвоночника. – 2011. – № 1. – С. 68–74.
 4. Лунева, С. Н. Способ получения и консервации минерализованного костного матрикса / С. Н. Лунева, А. Н. Накоскин, М. А. Ковинька. – Патент РФ на изобретение № 2495567. 29.03.2012.
 5. Миронов, С. П. Организационные аспекты проблемы остеопороза в травматологии и ортопедии / С. П. Миронов, С. С. Родионова, Т. М. Андреева // Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. – 2009. – № 1. – С. 3–6.

References

1. Bülleten' VOZ № 310: Desjat' vedushhih prichin smerti v mire. 2014. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/index2.html>.
2. Ismagilov M. F., Galiullin N. I., Mingaleev D. R. *Neurologicheskij vestnik*. – *Neurological Bulletin*. 2005;XXXVII(1-2):105-107.
3. Kirilova I. A. *Hirurgija pozvonochnika*. – *Spine surger*. 2011;1:68-74.
4. Luneva S. N., Nakoskin A. N., Kovin'ka M. A. Patent RU 2495567. 29.03.2012.
5. Mironov S. P., Rodionova S. S., Andreeva T. M. *Vestnik*

6. Огородова, Л. М. Растущая роль имплантов и малоинвазивной хирургии в развитии современной медицины / Л. М. Огородова // Технологическая платформа «Медицина будущего». – 2013. – Режим доступа: http://2013.forinnovations.ru/_src/ForumEvents.Report/40_file/64-62_oiforum2013_ludmila_ogorodova.pdf.
7. Тер-Асатуров, Г. П. Сравнительное экспериментально-морфологическое исследование эффективности биологических остеопластических материалов в замещении костных дефектов / Г. П. Тер-Асатуров, М. В. Лекишвили, А. Т. Бигваева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – № 1. – С. 81–85.

travmatologii i ortopedii. im. N. N. Priorova. – *Reporter of Traumatology and Orthopedics named Priorov*. 2009;1:3-6.

6. Ogorodova L. M. Tehnologicheskaja platforma «Medicina budushhego». 2013. Available at: http://2013.forinnovations.ru/_src/ForumEvents.Report/40_file/64-62_oiforum2013_ludmila_ogorodova.pdf.
7. Ter-Asaturov G. P., Lekishvili M. V., Bigvaeva A. T. [et al.]. *Cell Transplantation and Cellular Engineering*. 2012;1:81-85.

Сведения об авторах:

Накоскин Александр Николаевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии; тел.: 89058505831; e-mail: nakooskin_a@mail.ru

Ковинька Михаил Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; тел.: 89226700346; e-mail: mkovinika@mail.ru

Талашова Ирина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; тел.: 89097256342; e-mail: i_talashova@mail.ru

Тушина Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник; тел.: 89128346190; e-mail: ntushina76@mail.ru

Лунева Светлана Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией; тел.: 89129713710; e-mail: luneva_s@mail.ru

© Коллектив авторов, 2018

УДК 612.673.9

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13024>

ISSN – 2073-8137

ВЛИЯНИЕ ПИТЬЕВОГО РАЦИОНА С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА И АДАПТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОРГАНИЗМА У КРЫС-САМОК В ПРЕДСТАРЧЕСКОМ ВОЗРАСТЕ

А. И. Шихлярова¹, Г. В. Жукова¹, О. И. Кит¹, Т. А. Куркина¹,
Е. А. Ширнина¹, Т. П. Протасова¹, А. А. Елкина², М. Г. Барышев²

¹ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт,
Ростов-на-Дону, Россия

² Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

INFLUENCE OF DRINKING DIET WITH LOW CONTENT OF DEUTERIUM ON THE INDICATORS OF THE ESTROUS CYCLE AND THE ADAPTIVE CAPABILITIES OF THE ORGANISM IN FEMALE RATS IN THE PRESENILE AGE

Shikhliarova A. I.¹, Zhukova G. V.¹, Kit O. I.¹, Kurkina T. A.¹,
Shirнина E. A.¹, Protasova T. A.¹, Elkina A. A.², Baryshev M. G.²

¹ Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

² Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Установлено наличие геропротекторного эффекта у воды с модифицированным изотопным D/H составом со сниженным содержанием дейтерия (–704 ‰), проявляющегося в изменении продолжительности отдельных стадий эстрального цикла (dioestrus, prooestrus и meta oestrus) и соотношения длительности ста-