

На правах рукописи

ВЛАСОВ МИХАИЛ ЮРЬЕВИЧ

**Влияние эктопической имплантации аллогенного гидроксиапатита
на показатели метаболизма костной ткани, функцию коры надпочечников
и состояние иммунокомпетентных органов у животных**

03.00.13-физиология,

03.00.04-биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Самара - 2003

Работа выполнена в Самарском государственном университете

- Научные руководители:** доктор биологических наук,
профессор Подковкин Владимир Георгиевич;
- доктор медицинских наук,
профессор Волова Лариса Теодоровна
- Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук,
профессор Боринский Юрий Николаевич;
- доктор биологических наук,
профессор Зайцев Владимир Владимирович
- Ведущая организация:** Волгоградский государственный
медицинский университет

Защита состоится "28" октября 2003 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета К212.218.02 при Самарском государственном университете по адресу: 443011, г. Самара, ул. академика Павлова, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Самарского государственного университета

Автореферат разослан

"25" сентября 2003 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук,
доцент

Ведясова О.А.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. В настоящее время заболевания опорно-двигательной системы являются широко распространенными, а проблема методов их лечения занимает одно из первых мест в медицине.

Известно, что сложные физиолого-биохимические процессы в органах зависят от функционального состояния соединительной ткани, которая, обладая механическими, защитными и пластическими свойствами, в конечном счете поддерживает гомеостаз. Поэтому главными причинами заболеваний опорно-двигательной системы являются нарушения обменных процессов в организме, сопровождающиеся деструкцией специализированного вида соединительной ткани – костной ткани. Процессы метаболизма последней обеспечиваются сложными взаимосвязанными механизмами регуляции. Наряду с местными факторами существенное значение в регуляции обмена костной ткани имеют центральные механизмы, выяснение роли которых, в частности, системы “гипоталамус-гипофиз”, имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Ключевую роль в постоянном возобновлении органического и минерального компонентов кости играют гормональные и ферментативные системы. В связи с этим актуальной представляется задача по поиску новых способов управления регенерацией костной ткани.

Для восстановления поврежденных участков кости, реконструкции ее анатомической целостности, широко используют разнообразные пластические материалы биологического (Волова Л.Т., 1986, 1988; Брус И.Г. с соавт., 1989) и неорганического (Хамраев Т.К. с соавт., 1994; Панкратов А.С., 1995; Строганова Е.Е. с соавт., 2001; Oda S. e.a., 1997; Yuan H. e.a., 2001) происхождения. Однако в ряде случаев, когда уменьшение костной массы происходит при различных нарушениях обменных процессов в организме, возникает необходимость в нормализации костного ремоделирования на системном уровне.

За последнее десятилетие в литературе появились экспериментальные данные демонстрирующие остеогенные свойства синтетического кальций-фосфатного соединения – гидроксиапатита (ГАП) – и биосовместимых материалов на его основе (Безруков В.М., Григорьян А.С., 1996; Литвинов С.Д., 1995; Снетков А.И. с соавт., 2001; Zambonin G., Grano M., 1995; Bonucci E. e.a., 1997; Goto T. e.a. 2001). В ряде экспериментальных моделей на животных показано, что эктопическое введение ГАП в мышечную ткань влияет на остеогенные процессы (Ripamonti U., 1996, 2000; Zong J. e.a., 1997; Gosain A.K. e.a., 2002). Существенным недостатком данных работ является отсутствие системного подхода в изучении реакции организма в ответ на введение композитных биоматериалов, которые существенно отличаются по химическому составу и биологическим свойствам от естественного ГАП костной ткани. Прежде всего, недостаточное внимание уделено изменениям со стороны эндокринной системы и их взаимосвязи с обменом основного белка костной ткани – коллагена – при использовании ГАП. До настоящего времени остается неясным вопрос о

регулирующем влиянии гормональных и ферментативных систем на остеогенные процессы, происходящие в костной ткани.

Вышеизложенное свидетельствует о том, что применение новых видов кальций-фосфатных препаратов и изучение их влияния на обменные процессы в настоящее время заслуживает особого внимания.

В ЦНИЛ СамГМУ предложен и запатентован (Волова Л.Т., Подковкин В.Г., 2000), а в представленной работе детально разработан новый способ получения аллогенного ГАП путем выделения его непосредственно из костной ткани. Данный способ может стать звеном замкнутого цикла производства костно-пластических материалов, не требующим дорогостоящего оборудования, использующегося при получении синтетических аналогов. Кроме того, предполагается, что аллогенный ГАП обладает большей биосовместимостью по сравнению с искусственными препаратами. Поэтому настоящая работа была направлена на изучение физиологических и биохимических свойств аллогенного ГАП.

Цель исследования. Разработать технологию производства аллогенного ГАП и произвести в эксперименте комплексную оценку реакции организма при эктопическом введении данного препарата в сочетании с деминерализованным костным матриксом.

Основные задачи исследования.

1. Разработать технологию получения аллогенного ГАП из костной ткани.
2. Выявить влияние эктопической имплантации аллогенного ГАП на биохимические показатели метаболизма костной ткани, функционального состояния коры и мозгового слоя надпочечников, уровень кальция в крови и перекисное окисление липидов в печени, селезенке и мышечной ткани крыс.
3. Изучить реакцию организма животных на одновременную имплантацию ДКМ и аллогенного ГАП.
4. Проанализировать реакцию организма животных на имплантацию комбинированных препаратов, содержащих аллогенный ГАП и измельченный костный матрикс.

Научная новизна.

1. В проведенном исследовании впервые дана комплексная оценка реакции организма животных на эктопическую имплантацию аллогенного ГАП и его комбинации с ДКМ на ряд жизненно важных систем. Выявлены изменения биохимических показателей метаболизма костной ткани, свидетельствующие о стимуляции остеогенеза.

2. Впервые проанализированы изменения гормонального фона, характеризующие состояние САС, ГНС при внутримышечном введении ГАП и обнаружено слабовыраженное увеличение их функциональной активности.

3. Впервые изучено модифицирующее влияние ГАП на реакцию организма животных, которым был имплантирован ДКМ, проявившееся в угнетении перекисного окисления липидов в селезенке, печени и мышцах.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты проведенной работы дополняют современные представления о реакции организма на костно-пластические материалы неорганической природы.

Установлено, что реакция организма на эктопическую имплантацию ГАП и его смесь с измельченным ДКМ носит комплексный характер и включает физиологические изменения ряда систем: метаболизма костной ткани, функционального состояния САС, ГГНС, перекисного окисления липидов.

Выявлены особенности реакции ГГНС и САС на имплантацию аллогенного ГАП, а также изменения в обмене коллагена костной ткани после имплантации ГАП в зависимости от его типа и способа введения. Полученные данные дают дополнительное теоретическое обоснование для применения биопластических материалов при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Разработана технология получения ГАП из костной ткани, близкого по составу к минеральному компоненту кости. На его основе созданы новые костно-пластические материалы, которые в настоящее время применяются в практическом здравоохранении. Дано экспериментальное обоснование их эффективности. Установлено, что эктопическая имплантация этих материалов не вызывает отрицательных сдвигов в состоянии исследованных показателей метаболизма костной ткани, перекисного окисления липидов, периферических органов иммуногенеза, САС и ГГНС.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Эктопическая имплантация аллогенного ГАП вызывает изменения биохимических показателей метаболизма костной ткани, свидетельствующие об активизации остеогенеза. Эти изменения не выходят за пределы физиологической нормы и не приводят к нарушению гомеостаза кальция.

2. Гормональные показатели ГГНС и САС в ответ на имплантацию ГАП свидетельствуют о физиологической реакции организма животных, не носящей характер стрессовой.

3. Введение ГАП модифицирует системную реакцию организма при имплантации ДКМ, что проявляется в уменьшении выраженности изменений биохимических показателей свободнорадикального окисления в селезенке, печени и мышцах.

4. Морфологические исследования периферических органов иммуногенеза при имплантации смеси ГАП и измельченной деминерализованной кости не обнаруживают наличия у имплантатов иммуногенных свойств.

Апробация работы. Апробация работы проведена на кафедрах биохимии и физиологии Самарского государственного университета. Материалы диссертации доложены на международном симпозиуме по проблемам тканевых банков "Биоимплантология на пороге XXI века" (Москва, 2001); на 68-й итоговой научной сессии Курского государственного медицинского университета (Курск, 2002); на итоговых научных конференциях Самарского государственного университета и Самарского военно-медицинского института (Самара, 2002, 2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, получено положительное решение на выдачу патента.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных методов, результатов собственных исследований, анализа и обсуждения полученных данных, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Работа содержит 32 рисунка и 13 таблиц. Список литературы включает 176 источников, в том числе 105 зарубежных.

Эксперименты на животных выполнены на базе ЦНИЛ СамГМУ.

Список использованных сокращений

ГАП – гидроксиапатит

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ДКМ – деминерализованный костный матрикс

САС – симпато-адреналовая система

11-ОКС – 11-оксикортикостероиды

ЩФ – щелочная фосфатаза

Материалы и методы исследований

Исследования проведены на 126 белых беспородных половозрелых крысах (самцах) массой 180-290 г. Все опытные животные были разделены на 3 основные группы, соответствующие следующим сериям экспериментов:

1. Изучение функции надпочечных желез и показателей обмена костной ткани при внутримышечных инъекциях суспензии аллогенного ГАП и имплантации ДКМ;

2. Изучение состояния функции надпочечных желез, показателей обмена костной ткани и морфо-функционального состояния селезенки и лимфатических узлов после эктопической имплантации комбинированных препаратов, содержащих ГАП и измельченную деминерализованную кость.

3. Изучение влияния внутримышечной имплантации гранулированного ГАП на исследуемые показатели функции надпочечных желез и показатели обмена костной ткани.

Схема экспериментов представлена в табл. 1.

Животным вводили ГАП (суспензии в физиологическом растворе 40 мг/0,2 мл; гранулы массой $44,8 \pm 0,9$ мг) и ДКМ в виде блоков (диафизные участки длинных трубчатых костей), а также комбинированные гранулированные имплантаты массой $41,6 \pm 1,2$ мг, содержащие ГАП и измельченную кость. Под эфирным наркозом в стерильных условиях рассекали кожу и фасции бедра с внешней стороны на 0,5 см, тупо раздвигали мышечные волокна, глубоко в рану помещали стерильные (обработанные ионизирующим излучением) имплантаты, после чего рану ушивали единичными швами и обрабатывали 3% раство-

ром йода. Инъекции суспензий стерильного ГАП в физиологическом растворе делали однократно с помощью одноразового шприца в бедренные мышцы.

Таблица 1

Схема экспериментов

№ серии и условия эксперимента	Группы животных, вид имплантатов		Срок выведения животных из экспериментов	Количество животных в группах
	Левая бедренная мышца	Правая бедренная мышца		
1. Эктопическое (внутримышечное) введение инъекций суспензии аллогенного ГАП и имплантация ДКМ	<ul style="list-style-type: none"> • ГАП pH 12 • ГАП pH 12 • ГАП pH 7 • Ложная операция 	Ложная операция ДКМ ДКМ ДКМ	1 месяц и 2 месяца	12
	• Контроль (ложнооперированные животные)			12
2. Внутримышечная имплантация комбинированных препаратов (ГАП/измельченная кость) и ДКМ	<ul style="list-style-type: none"> • ГАП/измельченная кость 1:1 • ГАП / измельченная кость 2:1 	ГАП/ измельченная кость 1:1 ДКМ	2 месяца	6
	• Контроль			6
3. Внутримышечная имплантация гранулированного ГАП.	ГАП pH 12 + фосфат	из раствора первой недели деминерализации	2 месяца	8
	• ГАП pH 7			8
	± ГАП pH 7 + фосфат	из раствора второй недели деминерализации		8
	• ГАП pH 12			6
	• ГАП pH 12 + фосфат	8		
	• Контроль	6		
Итого животных			126	

После операции все животные содержались в одинаковых условиях вивария на стандартном рационе при комнатной температуре. Каждая экспериментальная серия содержала контрольную группу животных, которые не подвергались описанным выше воздействиям.

Объектом исследований являлись кровь, надпочечники, печень, селезенка мышечная ткань и лимфатические узлы животных. В экспериментах изучали содержание 11-ОКС (Подковкин В.Г., 1988) в надпочечниках, печени и плазме; адреналина (Подковкин В.Г., 1988) в надпочечниках; белковосвязанного и свободного оксипролина (Крель А.А., Фурцева Л.Н., 1968) в плазме; активность ЩФ (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982) в сыворотке крови; концентрацию неорганического фосфата (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982) и Ca^{2+} (Вишневская Т.М., Ляшевская Т.Н., 1976) в сыворотке крови; содержание малонового диальдегида (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., 1977), диеновых кетонов и конъюгатов (Костюк В.А., 1991), активность каталазы (Королюк М.А. с соавт., 1988) в печени, мышечной ткани и селезенке.

В образцах ГАП количественно определяли Ca^{2+} , Mg^{2+} (Крешков А.П., Ярославцев А.А., 1968), PO_4^{3-} (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982), Fe^{3+} (Асатиани В.С., 1965); качественно – Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , F^- (Алексеев В.Н., 1973).

Препараты селезенки и лимфоузлов для морфологических исследований приготавливали общегистологическими методами, окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по ван-Гизон (Меркулов Г.А., 1969). Исследование препаратов проводили светооптически на микроскопе МБИ-11. Определяли размеры лимфоидных узелков и их реактивных центров.

Полученные в экспериментах результаты подвергали статистической обработке стандартным способом, используя t критерий Стьюдента (Фролов Ю.П., 1996). Изменения исследуемых показателей считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

1. Технология получения аллогенного ГАП.

Исходя из цели работы, задачей первого этапа стала разработка метода получения аллогенного ГАП. Известно, что при деминерализации ДКМ, широко используемого в качестве остеопластического материала, из костной ткани в процессе деминерализации вымываются все минеральные вещества (Савельев В.И., Родюкова Е.Н., 1992; Urist M.R., 1968). Поэтому ГАП получали из солянокислых растворов после деминерализации компактной костной ткани путем осаждения гидроокисью натрия при значениях pH 7 и pH 12 с добавлением фосфатного буфера ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$; 0,1 М; pH 7,4) и без него.

Деминерализацию кадаверной костной ткани (диафизные участки бедренной кости) осуществляли путем обработки соляной кислотой (3,6 н) при $+4^\circ\text{C}$ после предварительной механической очистки и промывания в 7 % перекиси водорода. Отношение массы обрабатываемой ткани к массе кислоты 1:5. Смену экстрагирующих растворов производили ежедневно до выхода минеральных элементов.

Деминерализацию трубчатых костей крыс после предварительной обработки проводили в растворе соляной кислоты (1,8 н) в течение 24 часов до вы-

хода минеральной фазы. После деминерализации костный матрикс подвергали лиофилизации на установке LZ-9С фирмы Фригера и в дальнейшем использовали в качестве имплантационного материала.

После осаждения из деминерализатов и центрифугирования суспензию ГАП промывали пятикратным объемом воды, вновь центрифугировали. Осажденный ГАП высушивали (20 часов 150 °С) и использовали на следующих этапах исследований. Полученный препарат содержал Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , Fe^{3+} в соотношениях, близких к составу минерального компонента кости (табл. 2). Путем качественного анализа выявлено наличие ионов Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , F^- .

Таблица 2

Содержание микроэлементов в образцах ГАП, полученных из компактной костной ткани крыс, мг/г

способ получения ГАП		микро- элементы			
		PO_4^{3-}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Fe^{2+}
рН 7	с фосфатом, n=5	384,8±6,7	454,3±8,2	16,90±1,67	8,74±0,43
	без фосфата, n=5	295,0±5,3	480,1±10,0	13,55±2,02	8,94±0,40
рН 12	с фосфатом, n=5	358,0±4,5	421,2±7,3	17,31±3,04	10,17±0,36
	без фосфата, n=5	257,0±6,8	465,4±7,5	15,28±2,94	11,45±0,39

На основании анализа данных литературы (Торбенко В.П., Касавина Б.С., 1977; Nielsen F.H., 1992; Pallares I., 1996; Campos M.S. e.a., 1998) можно предположить, что минеральный состав естественного ГАП костной ткани может влиять на обменные процессы, поэтому следующий этап наших исследований был направлен на изучение влияния однократных инъекций аллогенного ГАП.

2. Влияние инъекций суспензии ГАП в сочетании с имплантацией деминерализованного костного матрикса на показатели метаболизма костной ткани, уровень гормонов коры и мозгового слоя надпочечников.

Реакция организма на внутримышечное введение суспензии аллогенного ГАП носила комплексный характер и включала изменения физиологического состояния ряда систем. В первую очередь необходимо отметить выраженную ответную реакцию костной ткани, отмеченную в основном через 2 месяца после операций. В наших экспериментах отмечено изменение метаболизма коллагена, проявляющееся в колебаниях уровня свободного и белковосвязанного оксипролина.

Как видно на рис. 1, концентрация белковосвязанного оксипролина в плазме крови незначительно повышалась в первый месяц, оставаясь на уровне контрольного значения во всех экспериментальных группах. Весьма несущественными оказались колебания концентрации свободной аминокислоты (рис. 2), единственное достоверное снижение уровня которой в плазме на 30% наблюдалось при этом же сроке исследований в группе крыс, подвергавшихся комбинированной операции.

рованному воздействию (имплантация ДКМ и инъекции щелочного ГАП). Следовательно, подобный вид операций, в целом, не оказывает существенного влияния на обмен коллагена костной ткани, по крайней мере, через месяц.

По прошествии двух месяцев нами обнаружено достоверное повышение уровня связанного с белком оксипролина в плазме крыс с имплантированным ДКМ, а также у животных, которым на фоне введения ДКМ делали однократные инъекции нейтрального ГАП. Содержание свободного оксипролина через 2 месяца уменьшалось (в 1,4 – 1,8 раза) в плазме всех крыс, причем достоверные результаты отмечены нами в трех группах.

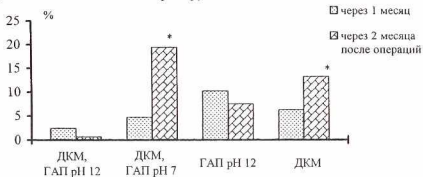


Рис. 1. Изменение уровня белковосвязанного оксипролина (в % от контроля) в плазме крыс после инъекций суспензии аллогенного ГАП и имплантации ДКМ

*Примечание: * - отличие от контроля достоверно ($p < 0,05$)*

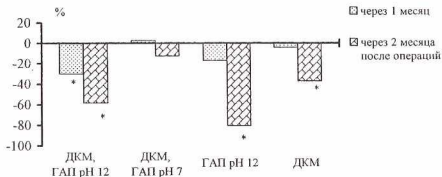


Рис. 2. Изменение уровня свободного оксипролина (в % от контроля) в плазме крыс после инъекций суспензии аллогенного ГАП и имплантации ДКМ

*Примечание: * - отличие от контроля достоверно ($p < 0,05$)*

Как известно, уровень оксипролина характеризует интенсивность процессов костного ремоделирования (Мазуров В.И., 1974; Kivirikko K.I., Risteli L., 1976). Функциональное состояние костной ткани в наших экспериментах характеризовалось снижением катаболических процессов, что проявлялось в уменьшении содержания свободного оксипролина в плазме.

Таким образом, введение щелочного ГАП способствовало замедлению процессов биодеградации костной ткани, что проявлялось в значительном снижении уровня свободного оксипролина. В то же время следует отметить, что внутримышечная имплантация костного матрикса, широко используемого в качестве костно-пластического материала, вызывала усиление биосинтеза коллагена, выявленное по увеличению концентрации белковосвязанного оксипролина с одновременным снижением свободной фракции аминокислоты. Этот факт представляет значительный интерес, поскольку подтверждает остеогенные свойства деминерализованных костных имплантатов (Волова Л.Т., 1988; Iwata H. e.a., 2002; Mott D.A. e.a., 2002).

Об изменении реактивности костной ткани свидетельствуют изменения активности ЩФ, играющей ключевую роль в процессах физиологической регенерации костной ткани. Повышение показателя через месяц после операций происходило только в первой группе животных, которым имплантировали ДКМ и делали инъекции щелочного ГАП (рис. 3). В трех других группах происходило снижение (на 32,5 %-80,1 %) активности фермента. Через два месяца активность ЩФ, напротив, возрастала во всех группах на 46,4%-108,7% по сравнению с контрольным значением. Наименьшие изменения касались группы крыс с имплантированным ДКМ. Следовательно, введение ГАП способствовало активации активности ЩФ, что может быть связано с действием ионов Mg^{2+} и Zn^{2+} , являющихся активаторами фермента (PetitClerc C. e.a., 1975).

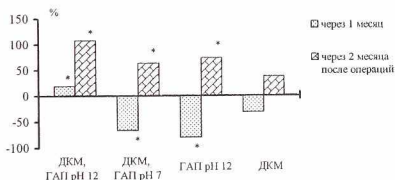


Рис. 3. Изменение активности щелочной фосфатазы (в % от контроля) в сыворотке крыс после инъекций суспензии аллогенного ГАП и имплантации ДКМ

*Примечание: *- отличие от контроля достоверно ($p < 0,05$)*

Снижение активности фермента по истечении первого месяца происходило на фоне незначительных изменений коллагенсинтетических процессов, проявляющихся, как указывалось выше в слабых колебаниях уровня свободного и белковосвязанного оксипролина. Повышение активности ЩФ через два месяца совпало с повышением содержания белковосвязанного оксипролина в плазме крови крыс, которым делали инъекции нейтрального ГАП на фоне имплантации ДКМ. Следовательно, обнаруженные изменения свидетельствуют о возможном усилении процессов минерализации костной ткани через 2 месяца после операций.

В то же время нами не были зафиксированы изменения в содержании неорганического фосфата в сыворотке крови практически всех животных. Данный факт может объясняться ускорением процессов иммобилизации неорганических фосфатов в костной ткани.

В регуляции неспецифических адаптивных реакций организма важную роль играет САС. В ответ на различные воздействия происходит усиление секреторной деятельности мозгового слоя надпочечников, что приводит к биохимическим и физиологическим изменениям, направленным на восстановления гомеостаза (Кассиль Г.Н., Матлина Э.Ш., 1973).

Состояние САС характеризовалось нарастанием в первый месяц содержания адреналина в надпочечниках животных, которым изолированно делали инъекции ГАП и имплантировали костный матрикс до $4,46 \pm 0,09$ мкмоль/г и $4,10 \pm 0,10$ мкмоль/г соответственно при контроле $3,41 \pm 0,07$ мкмоль/г. Через два месяца показатель в этих группах возвращался к норме. То есть, реакция САС оказалась более выраженной через месяц после операций. Вероятно, реализация в этот период адренергических механизмов способствовала обеспечению биосинтетических процессов в организме пластическим и энергетическим материалом, поскольку САС является главным фактором срочной мобилизации защитных сил организма для восстановления нарушенного гомеостаза и обеспечивает преодоление неблагоприятного воздействия. Возвращение к норме уровня адреналина через два месяца свидетельствует о завершении ответной реакции организма на введение препарата.

Наряду с изменением реактивности костной ткани необходимо отметить выраженную ответную реакцию ГГНС на введение имплантатов, что свидетельствует о комплексной реакции организма.

У животных, которым имплантировали костный матрикс и делали инъекцию нейтрального ГАП, наблюдалось угнетение глюкокортикоидной реакции по истечении месяца, выразившееся в уменьшении уровня 11-ОКС в надпочечниках (рис. 4) и плазме (рис. 5), в то время как имплантация костного матрикса без инъекций достоверных изменений глюкокортикоидов не вызывала. На основании этого можно заключить, что введение ГАП вызывает угнетение ответной реакции ГГНС на введение остеопластических материалов. В некоторых случаях это способствует их замещению собственной костной тканью реципиента.

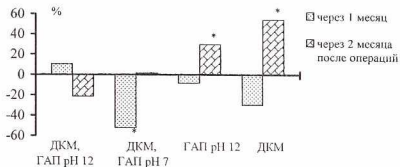


Рис. 4. Изменение уровня 11-ОКС (в % от контроля) в надпочечниках крыс после инъекций суспензии аллогенного ГАП и имплантации ДКМ

Примечание: * - отличие от контроля достоверно ($p < 0,05$)

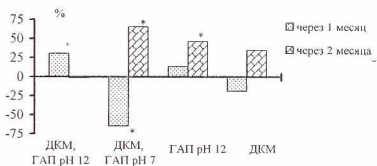


Рис. 5. Изменение уровня 11-ОКС (в % от контроля) в плазме крыс после инъекций суспензии аллогенного ГАП и имплантации ДКМ

Примечание: * - отличие от контроля достоверно ($p < 0,05$)

Возрастание содержания 11-ОКС в надпочечниках и плазме животных, которым вводили щелочной ГАП, происходило спустя 2 месяца. Известные биохимические и физиологические эффекты глюкокортикоидов в данных условиях могут увеличить обеспечение регенерирующих тканей пластическим и энергетическим материалом.

В связи с вышеизложенным, необходимо подчеркнуть стимулирующее действие физиологических концентраций глюкокортикоидов на метаболизм костной ткани, что подтверждается данными исследований Delany A.M., e.a. (1994). Мы полагаем, что данный эффект гормонов, по-видимому, является системным и осуществляется не столько за счет их прямого действия на ткань,

сколько через регуляторные оси организма и функциональную активность других эндокринных желез.

При исследовании процессов свободнорадикального окисления нами получены следующие данные. Уровень первичных продуктов (диеновых кетонов и конъюгатов) перекисного окисления липидов в мышцах достоверно снижался через месяц на 15,8 % и 13,1 % соответственно. Об усилении антиоксидантной защиты свидетельствует увеличение активности каталазы в печени как через месяц, так и через два месяца после эктопического введения суспензии ГАП на фоне имплантации ДКМ.

Концентрация малонового диальдегида в печени достоверно снижалась через месяц на 49,3%-107,8 % в трех группах животных, которым делали инъекции суспензии ГАП как отдельно, так и на фоне имплантации ДКМ. Полученные результаты позволяют заключить, что ингибирование процессов перекисного окисления липидов в клетках печени происходило преимущественно в первый месяц имплантации костного матрикса при введении суспензии ГАП в мышечную ткань, а через два месяца показатели возвращались к контрольным значениям.

Следует подчеркнуть, что инъекции аллогенного ГАП, осажденного при щелочном значении pH, способствовали нормализации процессов перекисного окисления в печени крыс через два месяца.

Инъекции щелочного ГАП способствовали снижению уровня кальция в крови через месяц, спустя два месяца показатель возвращался к контрольным значениям. Следует отметить, что снижение показателя было в пределах допустимых отклонений, следовательно, не вызвало существенных физиологических нарушений. В то же время, в других группах изменений не наблюдалось. В целом, введение ГАП и ДКМ не приводит к нарушениям кальциевого гомеостаза, что выражается в отсутствии существенных изменений концентрации кальция в крови животных. Это обстоятельство имеет важное физиологическое значение, поскольку ионы кальция участвуют в регуляции нервно-мышечной активности, процессов свертываемости крови, ферментативной активности и ряда других функций организма.

3. Эффект применения комбинированных препаратов, содержащих ГАП и измельченную кость.

Оценив влияние отдельного введения аллогенного ГАП и костного матрикса на исследуемые показатели, на следующем этапе исследований нами была поставлена задача оценить эффект применения комбинированных препаратов, содержащих аллогенный ГАП и измельченную деминерализованную кость в различных соотношениях.

Нами отмечено достоверное увеличение на 51,4 % уровня белковосвязанного оксипролина в плазме крови. Одновременно зафиксировано снижение концентрации свободного оксипролина на 70,1 % по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о преобладании биосинтеза коллагена над процессами его биодеградации

Трехкратное увеличение активности ЩФ сопровождалось значительным повышением уровня неорганического фосфата в сыворотке крови. Поэтому очевидно, что процессы коллагеногенеза сопровождались стимуляцией выработки и секреции ЩФ остеобластами, что подтверждается данными литературы (Deng L., 1998). По мнению J.R. Farley и B. Stilt-Coffing (2001), причиной выхода ЩФ из остеобластов является их апоптоз, который, в соответствии с высказываемым в последнее время мнением, индуцируется действием паратиреоидного гормона (Hock J.M. *с.а.*, 2001). Одновременное возрастание данных показателей на фоне указанного выше увеличения содержания белковосвязанного оксипролина свидетельствует об активизации ростовых процессов костной ткани, сопровождающихся усилением синтеза коллагена, образованием органической матрицы и ее дальнейшей минерализацией.

Наряду с изменением реактивности костной ткани необходимо отметить выраженную ответную реакцию ГНС на введение имплантатов, что свидетельствует о системной реакции организма. В наших исследованиях отмечено возрастание содержания П-ОКС в надпочечниках в 2,4 раза, а в плазме – в 3,4 раза. На наш взгляд, подобное увеличение концентрации стероидов в организме стимулирует выработку коллагена.

При исследовании метаболизма животных второй группы, которым внутримышечно имплантировали как комбинированные образцы, содержащие ГАП и измельченную кость в соотношении 2:1, нами выявлена аналогичная тенденция в изменениях показателей, хотя и в меньшей степени по сравнению с результатами в первой группе.

Чтобы оценить степень общей реакции организма на введение комбинированных имплантатов и ДКМ, изучали гистологические препараты периферических органов иммуногенеза – региональных лимфатических узлов и селезенки. Данный метод используется для оценки иммуногенных свойств трансплантационного материала. О реакции органов иммуногенеза в ответ на поступление в организм антигенов можно судить по изменениям, происходящим в первую очередь в лимфоидных узелках периферических органов иммунной системы. У животных, которым вводили комбинированные имплантаты, на препаратах селезенки нами отмечено незначительное количество крупных единичных фолликулов с реактивными центрами размножения, занимающими менее 50% площади. Отношение количества фолликулов с реактивными центрами размножения лимфоцитов к общему числу фолликулов в селезенке и лимфоузлах не превышает 8% и 4% соответственно при контроле 6% и 3%.

В формирующихся фолликулах центры размножения практически не выявляются. Центры размножения в фолликулах лимфоузлов как опытной, так и контрольной групп в основном представлены лишь несколькими крупными клетками – моноцитами, что по данным Л.Т. Воловой (1988) свидетельствует о невыраженности антигенных свойств костных трансплантатов.

4. Реакция ГГНС, САС и особенности показателей метаболизма костной ткани после имплантации гранулированного ГАП.

Имплантация гранулированного ГАП в виде блока вызывала достоверное повышение концентрации свободного оксипролина в плазме всех опытных групп животных. Аналогичная тенденция отмечена при изучении содержания белковосвязанного оксипролина (рис. 6). Эти данные согласуются с данными литературы (Зайдман А.М., Сигарева Н.А., 2000), в которых указывается, что при усилении регенерационных процессов увеличивается содержание общего оксипролина, отражающее интенсивность ремоделирования поврежденной костной ткани.

- ▨ ГАП из раствора 2-ой недели деминерализации костной ткани с фосфатом
- ▩ ГАП из раствора 2-ой недели деминерализации костной ткани без фосфата
- ▣ ГАП из раствора 1-ой недели деминерализации костной ткани с фосфатом

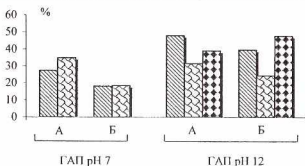


Рис. 6. Изменение уровня свободного (А) и белковосвязанного (Б) оксипролина (в % от контроля) в плазме крыс после имплантации гранулированного ГАП

Усиление процессов биосинтеза коллагена подтверждается собственными морфологическими данными. Так, при анализе микропрепаратов имплантатов оперированных животных нами выявлена инкапсуляция гранул ГАП. Формирование соединительнотканной капсулы через 2 месяца было типичным процессом. По нашему мнению это свидетельствует о меньшей биосовместимости гранулированных образцов по сравнению с комбинированными препаратами.

В наших исследованиях увеличение содержания свободного оксипролина в плазме происходило параллельно с повышением концентрации белковосвязанной фракции во всех группах животных, которым эктопически имплантировали ГАП различных видов. Одной из причин деструкции коллагена считается избыток паратгормона и кальцитриола. Эти гормоны, действуя на клетки костной ткани, стимулируют синтез и последующее высвобождение коллагеназы во внеклеточный матрикс (Kahn A.J., 1987; Meghji S., 1992).

Реакция ГНС на имплантацию гранулированного ГАП характеризовалась определенными изменениями. Так, повышение концентрации 11-ОКС в надпочечниках (в 1,4 – 2,5 раза больше контрольного) наблюдалось только у тех животных, в мышцы которых имплантировали образцы ГАП с добавлением фосфатного буфера (рис. 7). В плазме уровень кортикостероидов практически во всех группах оставался на исходном уровне.

Возможным объяснением различий в уровне стероидов в надпочечниках и плазме является связывание значительной части синтезированных в надпочечниках гормонов плазменным белком транскортином. В комплексе с белком гормоны не обладают активностью, и, следовательно, не оказывают угнетающее действие на рост и пролиферацию фибробластов, клеток предшественников остеобластов, биосинтез проколлагена и протеогликанов. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о регулирующем влиянии кортикостерона (основного глюкокортикоида крыс) на синтез гликопротеинов в культурах остеобластов (Sodek J. e.a., 1995), коллагена I и III в культурах фибробластов (Fernandez M., Minguell J.J., 1997) и данные о поддержании остеобластической активности физиологическими дозами глюкокортикоидов (Fujieda M. e.a., 2001).

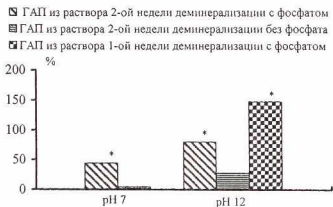


Рис. 7. Изменение 11-ОКС (в % от контроля) в надпочечниках крыс после имплантации гранулированного ГАП

Примечание: * - отличие от контроля достоверно ($p < 0,05$)

Наименьшие изменения зафиксированы нами при определении неорганического фосфата и кальция в сыворотке, а также адреналина в надпочечниках. По мнению Су и Купера (Hsu W.H., Cooper C.W., 1975) адреналин, как и паратиреоидный гормон, способствует увеличению содержания кальция в крови путем мобилизации последнего из костной ткани. Однако подобный гиперкальциемический эффект адреналина компенсируется выделением кальцитонина

парафолликулярными клетками щитовидной железы. Вероятно, этим можно объяснить незначительные изменения уровня кальция в сыворотке крови экспериментальных животных.

По совокупности установленных в работе фактов можно сделать заключение о том, что использованная нами в опытах на животных экспериментальная модель позволила впервые оценить системные изменения в организме при эктопическом введении минерального компонента кости, полученного по оригинальной разработке. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности препаратов и их безвредности для организма.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная технология получения аллогенного гидроксиапатита позволила создать новый костно-пластический материал, содержащий кальций, фосфат, магний, железо и другие микроэлементы в соотношении, близком к составу минерального компонента кости.

2. Эктопическая имплантация суспензии аллогенного гидроксиапатита в мышцу приводит к фазным изменениям показателей метаболизма костной ткани в крови животных. Уменьшение активности щелочной фосфатазы в первый месяц сменяется ее возрастанием через два месяца. Это сопровождается системными отклонениями в обмене основного белка костной ткани – коллагена – в виде снижения концентрации продукта его биодegradации – свободного оксипролина.

3. Имплантация гидроксиапатита вызывает физиологическую реакцию симпато-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем, характерную для воздействия слабых раздражителей, в виде небольшого увеличения уровня адреналина в надпочечниках в первый месяц с последующим его возвращением к норме на фоне увеличения концентрации 11-оксикортикостероидов в надпочечниках и крови при их снижении в печени. Гормональные показатели состояния надпочечных желез у крыс не указывают на стрессорный эффект эктопической имплантации аллогенного гидроксиапатита.

4. Введение суспензии аллогенного гидроксиапатита, не вызывает в течение 2 месяцев отрицательных, выходящих за пределы физиологической нормы сдвигов в состоянии исследованных биохимических показателей крови, характеризующих метаболизм костной ткани, функционального состояния коркового и мозгового слоя надпочечников, перекисного окисления липидов. Небольшое снижение уровня кальция в крови при введении гидроксиапатита не выходит за пределы физиологической нормы и не может рассматриваться как проявление нарушения гомеостаза кальция.

5. Имплантация гранулированного гидроксиапатита в виде блока вызывает одновременно увеличение биохимических показателей как процессов биосинтеза (белковосвязанный оксипролин), так и распада коллагена (свободный

оксипролин) в крови животных и сопровождается образованием соединительнотканной капсулы вокруг имплантата.

6. Внутримышечное введение суспензии гидроксиапатита животным, которым был одновременно имплантирован деминерализованный костный матрикс, приводит к уменьшению биохимических показателей свободнорадикального окисления, что проявляется в снижении уровня малонового диальдегида в печени и селезенке, диеновых конъюгатов и кетонов в мышцах и увеличении каталазной активности в печени по сравнению с животными, которым имплантировали деминерализованный костный матрикс без введения гидроксиапатита.

7. Имплантация смеси аллогенного гидроксиапатита с измельченным деминерализованным костным матриксом вызывает в крови животных значительные изменения биохимических показателей метаболизма костной ткани в виде увеличения концентрации белковосвязанного и снижения свободного оксипролина, возрастания активности щелочной фосфатазы, свидетельствующих об активизации процессов остеогенеза.

8. Комбинированный биопластический материал не вызывает изменений концентрации кальция в крови, уровня малонового диальдегида в печени и мышцах. Морфологические исследования периферических органов иммуногенеза не обнаруживают наличия у имплантатов иммуногенных свойств. Биохимические показатели состояния надпочечников у крыс не указывают на стрессорный эффект эктопической имплантации аллогенного гидроксиапатита с измельченным деминерализованным костным матриксом.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Волова Л.Т., Подковкин В.Г., Власов М.Ю. Безотходное производство и получение костного материала // Сб. тез. симпоз. по проблемам тканевых банков "Биоимплантология на пороге XXI века". Москва, 2001. С. 16-17, авт. ...0,25 с.
2. Власов М.Ю. Влияние внутримышечных инъекций гидроксиапатита на обмен коллагена // Вестник Самарского госуниверситета. 2002. № 4 (26). С. 157-161.
3. Власов М.Ю., Волова Л.Т., Подковкин В.Г. Регуляция обмена коллагена внутримышечным введением гидроксиапатита // Сб. работ 68-й итоговой научной сессии Курского государственного медицинского университета. Курск, 2002. С.11-12, авт. ...0,5 с.
4. Власов М.Ю., Грибкова О.В., Подковкин В.Г., Волова Л.Т. Особенности обмена соединительной ткани крыс при гетеротопической имплантации аллогенного гидроксиапатита // Вестник Самарского госуниверситета. 2002. № 2 (24). С. 137-143, авт. ... 3 с.
5. Подковкин В.Г., Власов М.Ю. Влияние искаженного геомагнитного поля на метаболизм соединительной ткани крыс. Электромагнитные поля и

здоровье человека: Материалы третьей междунаро- д. конф. Москва – Санкт-Петербург, 2002. С. 88-89, авт. ...0,5 с.

6. Подковкин В.Г., Власов М.Ю. Получение аллогенного гидроксиапатита // Актуальные вопросы современной медицины: Материалы XXXV науч. конф. Самарского военно-медицинского института. Самара, 2002. С. 276-277, авт. ...0,5 с.

7. Власов М.Ю. Влияние инъекций суспензии аллогенного гидроксиапатита на некоторые биохимические показатели у крыс // Материалы XXXVI науч. конф. Самарского военно-медицинского института. Самара, 2003. С. 48-50 (статья).

8. Власов М.Ю., Волова Л.Т., Подковкин В.Г., Грибкова О.В., Мичурина Н.Ю. Изучение биохимических показателей в организме крыс при применении гидроксиапатит-содержащих препаратов // Материалы XXXVI науч. конф. Самарского военно-медицинского института. Самара, 2003. С. 50-51, авт. ...0,25 с.

9. Власов М.Ю., Подковкин В.Г. Гуреева Е.Г. Влияние аллогенного гидроксиапатита и деминерализованной костной ткани на содержание малонового диальдегида и активность каталазы у крыс // Вестник Самарского госуниверситета. 2003. Специальный выпуск. С. 165-172, авт. ...3,5 с.