

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ
ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТОВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ
КОСТНОЙ ТКАНИ БЫКА НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ СРАЩЕНИЯ ПЕРЕЛОМА ГОЛЕНИ
У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

С.А. МЕЛЬНИКОВ, А.Н. НАКОСКИН, С.Н. ЛУНЕВА

*ФГБУ «РНЦ «ВТО» имени академика Г. А. Илизарова Минздрава России»,
ул. М. Ульяновой, 6, г. Курган, Россия, 640014*

Аннотация. В данной статье представлено исследование биологического действия препаратов кислоторастворимых низкомолекулярных неколлагеновых белков костной ткани быка на разных стадиях сращения перелома голени у лабораторных мышей. Исследуемые препараты низкомолекулярных костных белков были получены из ткани бедренной кости быка путем последовательного применения кислотной деминерализации, диализа и гельпроникающей хроматографии. Используя этот метод, было получено два препарата фракций костных белков с молекулярными массами 6,5 и 2,1 кДа. Биологическое действие которых было исследовано в эксперименте на лабораторных мышах с переломом голени путем внутривенных инъекций экспериментальным животным и наблюдением изменений биохимических показателей сыворотки крови и минеральных компонентов костина 3 и 7 сутки после введения. Также исследовано хроническое воздействие данных препаратов при многократном введении в течение 30 дней. Для оценки влияния полученных препаратов были выбраны следующие биохимические показатели сыворотки крови – содержание неорганического фосфата, общего кальция, общего белка, активность общей щелочной фосфатазы, тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы и показатели минеральных компонентов костной ткани – содержание воды, общего фосфата и кальция. Исследование влияния препаратов костных белков на ранних стадиях сращения перелома показало, что наибольшей активностью обладает препарат белков с молекулярной массой 2,1 кДа. Введение этого препарата приводит к снижению активности костного изофермента кислой фосфатазы, снижению содержания неорганического фосфата и ионов кальция в сыворотке крови. При исследовании хронического воздействия препаратов костных белков было выявлено значительное увеличение активности щелочной фосфатазы при введении исследуемых фракций.

Ключевые слова: низкомолекулярные неколлагеновые белки костной ткани, гельпроникающая хроматография, остеогенез.

RESEARCH OF BIOCHEMICAL CHANGES OF OSTEOGENESIS MARKERS
AT INTRAPERITONEAL INJECTION OF PREPARATIONS OF LOW-MOLECULAR PROTEINS
OF THE BOVINE BONE TISSUE AT DIFFERENT STAGES OF THE SHIN FRACTURE UNION IN
LABORATORY MICE

S.A. MELNIKOV, A.N. NAKOSKIN, S.N. LUNEVA

*The Federal State Financed Institution Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology
and Orthopaedics of RF Ministry of Healthcare, M.Ulyanova str., 6, Kurgan, Russia, 640014*

Abstract. This paper presents the study of biological effect of drugs of acid-soluble low-molecular non-collagenous proteins of bone tissue of bovine at different stages of shin fracture union in laboratory mice. Preparations of low-molecular bone tissue proteins were received from tissue of a femur of a bovine by consecutive application of acid demineralization, a dialysis and a high performance liquid chromatography. Using this method, two preparations of bone proteins with a molecular weight 6,5 and 2,1 kDa were received, which biological effect was investigated by intraperitoneal injection in laboratory mice with a shin fracture. After 3, 7 and 30th days, the changes of biochemical markers of blood serum and mineral components of a bone were investigated. In blood serum the authors investigated content of inorganic phosphate, the general calcium, the general protein, activity of the alkaline phosphatase and acid phosphatase. In bone tissue, the content of water, phosphate and calcium was studied. Effects of bone tissue preparations shown decreasing activity of acid phosphatase, decrease in the content of inorganic phosphate and calcium ions in blood serum at early stages of fracture union.

Key words: low-molecular non-collagenous proteins of bone tissue, high performance liquid chromatography, osteogenesis.

Библиографическая ссылка:

Мельников С.А., Накоскин А.Н., Лунева С.Н. Исследование изменений биохимических маркеров остеогенеза при внутривенном введении препаратов низкомолекулярных белков костной ткани быка на разных этапах сращения перелома голени у лабораторных мышей // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-102. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4940.pdf> (дата обращения: 13.11.2014).

Введение. Костная ткань – это динамическая система, равновесие в которой обеспечивает процесс костного ремоделирования. Нарушение этого процесса вызывает такие заболевания, как остеопороз и остеопения. Процессы ремоделирования и регенерации костной ткани осуществляются скоординированным взаимодействием клеток, внеклеточным матриксом и рядом биологически активных регуляторных соединений [5]. Иницирование остеогенеза осуществляется ангиогенными факторами роста, которые синтезируются клетками костной ткани. Существует постоянно дополняющийся список соединений пептидной природы, которые продуцируются клетками остеобластной линии и способны оказывать аутокринное и паракринное воздействие на клетки костной ткани. В этот список входят в настоящее время активно исследуемые цитокины и факторы роста. Наиболее известными представителями являются трансформирующие факторы роста, костные морфогенетические белки, факторы роста эндотелия сосудов и инсулинподобные факторы роста, которые уже нашли свое применение в современной травматологии и хирургии [1,6]. Роль же большего числа подобных соединений, присутствующих в костном матриксе, остается не установленной [3]. Многие факторы роста задействованы в эмбриональном развитии скелета и участвуют в системной регуляции метаболизма костной ткани [4].

Исходя из всего вышесказанного, следует признать, что роль местных регуляторов остеогенеза в метаболических процессах многогранна и на данный момент мало изучена. В данной работе нами была предпринята попытка провести исследование биологического действия низкомолекулярных неколлагеновых белков костной ткани быка на остеогенные процессы при сращении перелома голени у лабораторных мышей линии СВА.

Цель исследования – изучить изменения биохимических показателей остеогенеза при внутрибрюшинном введении препаратов низкомолекулярных неколлагеновых белков костной ткани быка лабораторным мышам при сращении перелома голени.

Материалы и методы исследования. Методика выделения неколлагеновых белков костной ткани заключается в последовательном использовании кислотной деминерализации, диализа и фракционирования с помощью гельпроникающей хроматографии. Таким образом, из смеси водорастворимых неколлагеновых белков костной ткани были получены преобладающие фракции с относительной молекулярной массой 6,5 и 2,1 кДа.

Для получения препаратов белков костной ткани нами была использована система для высокоэффективной жидкостной хроматографии Shimadzu (Япония) с ультрафиолетовым детектором и колонкой Shodex Protein KW-2002.5 для гельпроникающей хроматографии. В качестве элюентов для гельпроникающей хроматографии использовали буферный раствор Трис-НСl концентрации 50 ммоль/л и pH = 7,5. В качестве калибровочных растворов для гельпроникающей хроматографии использовали набор маркеров молекулярной массы Sigma-Aldrich MWGF 200-1KT.

Биохимическое исследование проводилось на 135 половозрелых самцах лабораторных мышах линии СВА массой 20 – 22 г, которым производили простой перелом голени. Перелом осуществляли путем механического воздействия под диэтиловым наркозом (патент РФ № 2456927) [2].

Экспериментальные животные были поделены на две контрольные и четыре опытных группы. Животным контрольной группы I (n=30) через 48 часов после осуществления перелома однократно внутривенно вводили физиологический раствор в объеме 20 мл. Забой животных проводили на 3-и и 7-е сутки после введения физиологического раствора. Мышам опытной группы I (n=30) через 48 часов после осуществления перелома однократно вводили раствор препарата костного белка с молекулярной массой 6,5 кДа в дозе 1 мг на 1 кг массы животного в объеме 20 мл, в опытной группе II (n=30) – по той же схеме вводили раствор препарата с молекулярной массой 2,1 кДа. Забой животных опытных групп II проводили на 3-и и 7-е сутки после введения препарата.

Мышам опытной группы III (n=15) внутрибрюшинное введение препаратов белка с молекулярной массой 6,5 кДа дозой 0,5 мг на 1 кг массы животного в объеме 10 мл проводили три раза с интервалом в 10 дней с момента первого введения. Срок забоя – 10-е сутки после последнего введения (или 30-е сутки после первого введения). Мышам опытной группы IV (n=15) внутрибрюшинное введение препаратов белка с молекулярной массой 2,1 кДа дозой 0,5 мг на 1 кг массы животного в объеме 10 мл проводили три раза с интервалом в 10 дней с момента первого введения. Срок забоя – 10-е сутки после последнего введения (или 30-е сутки после первого введения). Животным контрольной группы II (n=15) по той же схеме вводили физиологический раствор.

Забор биологического материала проводился после эвтаназии декапитацией. Для исследований брали сыворотку крови, полученную центрифугированием цельной крови при 3000 об./мин и костную ткань сломанной большеберцовой кости. В сыворотке крови изучали содержание *общего белка* (ОБ), неорганического фосфата, общего кальция, активность *щелочной фосфатазы* (ЩФ) и костного изофермента *кислой фосфатазы* (КФ), которые определяли с помощью анализатора Stat Fax 1904 Plus (США), используя наборы реактивов фирмы Vital Diagnostics.

Костную ткань, очищенную от мягких тканей, высушивали в течение суток на низкотемператур-

Библиографическая ссылка:

Мельников С.А., Накоскин А.Н., Лулева С.Н. Исследование изменений биохимических маркеров остеогенеза при внутрибрюшинном введении препаратов низкомолекулярных белков костной ткани быка на разных этапах сращения перелома голени у лабораторных мышей // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-102. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4940.pdf> (дата обращения: 13.11.2014).

ной вакуумной сушилке Heto Lyolab-2000 (Дания) для оценки содержания воды. Высушенную костную ткань измельчали в фарфоровой ступке до гомогенного состояния. В гомогенате костной ткани определяли содержание кальция и фосфатов. После сухого озоления навески кости в муфельной печи МП-2УМ (Россия) при температуре 800 °С в течение 4 часов. Зола растворяли в 1 мл концентрированной хлороводородной кислоты, количественно переносили в мерные центрифужные пробирки, нейтрализовали раствором гидроксида натрия и доводили объем до 10 мл. В полученных растворах определяли концентрацию фосфатов с молибдатом аммония и кальция с о-крезолфталеином наборами реагентов фирмы VitalDiagnostics.

Результаты эксперимента обрабатывались методами непараметрической статистики, для описания данных использовались медиана, 75- и 25-перцентиль, для оценки достоверности различий между выборками использовался непарный критерий Вилкоксона при принятом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного эксперимента нами были получены данные биохимического исследования крови и костной ткани лабораторных мышей после однократного введения препаратов неколлагеновых белков костной ткани быка с молекулярной массой 6,5 и 2,1 кДа на ранних стадиях сращения перелома, которые представлены в табл. 1.

Таблица 1

Изменение биохимических показателей сыворотки крови и минеральных компонентов костной ткани лабораторных мышей линии СВА на ранних стадиях сращения перелома после однократного введения препаратов неколлагеновых белков костной ткани быка с молекулярной массой 6,5 и 2,1 кДа

Показатели сыворотки крови лабораторных мышей						Минеральные компоненты костной ткани лабораторных мышей		
Показатель	ЩФ, Е/л	КФ, Е/л	Ca ²⁺ , ммоль/л	PO ₄ ³⁻ , ммоль/л	ОБ, г/л	Вода, %	Ca ²⁺ , мг/г лиоф. ткани	PO ₄ ³⁻ , мг/г лиоф. ткани
Контрольная группа I								
3 сут.	85,5 76,9-113,3	4,8 3,3-8,3	2,73 2,66-2,85	2,55 2,40-3,06	59,5 54,3-66,9	37,9 36,0-40,4	309,0 299,8-322,8	200,1 182,0-207,9
7 сут.	96,6 82,9-107,5	6,0 5,6-6,4	2,50 2,36-2,52	2,49 2,3-2,59	55,0 53,8-58,5	37,7 35,4-39,1	307,8 287,4-352,9	194,2 184,9-204,2
Опытная группа Ic введением препарата белка с молекулярной массой 6,5 кДа								
3 сут.	95,5 90,1-128,1	4,2 4,0-6,2	2,46* 2,35-2,62	2,62 2,44-3,17	58,0 52,4-60,6	38,2 37,6-40,4	387,8* 370,6-409,7	235,8* 214,9-253,6
7 сут.	100,5 94,0-128,1	9,5* 5,7-11,7	2,52 2,39-2,61	2,21* 2,07-2,40	51,9 51,2-56,4	38,0 35,9-39,6	343,9 323,7-350,8	195,9 175,5-202,8
Опытная группа Ic введением препарата белка с молекулярной массой 2,1 кДа								
3 сут.	94,7 70,2-112,3	1,65* 1,45-1,77	2,54* 2,49-2,64	2,36* 2,15-2,42	54,8 52,1-58,2	43,6* 43,2-44,1	340,3 327,9-349,6	300,1* 270,1-331,6
7 сут.	80,6* 76,8-112,3	2,8* 2,3-3,8	2,57* 2,36-2,69	2,38 2,30-2,59	58,4 53,8-61,1	41,2* 39,3-43,2	310,2 280,7-324,9	175,5 160,7-187,1

Примечание: данные представлены в виде медианы; 25- и 75-перцентиль;

* – достоверные отличия при уровне значимости $p < 0,05$ в сравнении с контрольным значением

Спустя 3 суток после введения препарата белков с молекулярной массой 2,1 кДа наблюдается снижение активности КФ на 65%, снижение содержания общего кальция и фосфата в сыворотке крови на 7% и увеличение содержания фосфата в костной ткани на 50% и воды на 15% относительно контрольной группы I. Через 7 дней после введения наблюдается снижение активности КФ на 52% и активности ЩФ на 16%, увеличение содержания кальция в сыворотке крови на 3% и воды в костной ткани на 9%.

У животных, которым вводили препарат белка с молекулярной массой 6,5 кДа, на 3 сутки после введения происходит снижение содержания общего кальция в сыворотке крови на 10%, увеличение фосфата в кости на 17% и увеличение содержания кальция в кости на 25% относительно контрольной группы I. На 7 сутки после введения этого же препарата наблюдается увеличение активности КФ на 60% и снижение содержания фосфата в сыворотке крови на 11%, но в то же время снижения содержания минеральных компонентов в кости не выявлено.

Результаты исследования биохимических показателей сыворотки крови и минеральных компонен-

Библиографическая ссылка:

Мельников С.А., Накоскин А.Н., Лулева С.Н. Исследование изменений биохимических маркеров остеогенеза при внутрибрюшинном введении препаратов низкомолекулярных белков костной ткани быка на разных этапах сращения перелома голени у лабораторных мышей // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-102. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4940.pdf> (дата обращения: 13.11.2014).

тов костной ткани лабораторных мышей после многократного введения препаратов костных белков быка с молекулярной массой 6,5 и 2,1 кДа представлены в табл. 2.

Таблица 2

Изменение биохимических показателей сыворотки крови и минеральных компонентов костной ткани лабораторных мышей линии СВА после многократного введения препаратов неколлагеновых белков костной ткани быка с молекулярной массой 6,5 и 2,1 кДа

Показатели сыворотки крови лабораторных мышей						Минеральные компоненты костной ткани лабораторных мышей		
Показатель	ЩФ, Е/л	КФ, Е/л	Ca ²⁺ , ммоль/л	PO ₄ ³⁻ , ммоль/л	ОБ, г/л	Вода, %	Ca ²⁺ , мг/г лиоф. ткани	PO ₄ ³⁻ , мг/г лиоф. ткани
Контрольная группа II								
30сут.	76,0 56,5-95,3	6,15 5,4-6,5	2,06 1,73-2,12	2,26 1,89-2,78	46,7 39,1-53,7	39,1 37,5-40,2	288,6 269,6-295,5	191,6 174,5-239,1
Опытная группа III с введением препарата белка с молекулярной массой 6,5 кДа								
30сут.	131,3* 109,5-141,4	4,1 3,1-10,4	2,37 1,99-2,50	2,33 1,87-2,64	52,5 44,8-58,3	40,9 39,7-42,1	293,4 281,3-307,2	193,5 181,9-199,2
Опытная группа IV с введением препарата белка с молекулярной массой 2,1 кДа								
30сут.	133,8* 112,2-145,0	1,9* 1,2-3,5	2,55* 2,41-2,61	2,43 2,21-2,55	57,4* 52,3-60,9	38,9 38,5-42,2	297,0 280,1-309,6	201,6 189,0-207,6

Примечание: данные представлены в виде медианы; 25- и 75-перцентиль;

* – достоверные отличия при уровне значимости $p < 0,05$ в сравнении с контрольным значением

Многократное введение препарата костных белков с молекулярной массой 2,1 кДа приводит к достоверному снижению активности КФ на 69% и увеличению активности ЩФ на 76%, также наблюдается увеличение содержания общего белка в сыворотке крови на 20% и кальция на 24% относительно контрольной группы II. При хроническом воздействии препарата костных белков с молекулярной массой 6,5 кДа наблюдается увеличение активности ЩФ на 72% относительно контрольной группы III.

Заключение. Исследование влияния препаратов неколлагеновых белков костной ткани быка показало, что наибольшей биологической активностью обладает препарат белков с молекулярной массой 2,1 кДа. Внутривентриальное введение этого препарата, как на ранних стадиях сращения перелома, так и при хроническом воздействии вызывает наибольшие изменения биохимических показателей сыворотки крови и минеральных компонентов костной ткани относительно контрольных групп и опытных групп, которым вводили препарат костных белков с молекулярной массой 6,5 кДа.

Литература

1. Лунева С.Н., Талашова И.А., Осипова Е.В., Накоскин А.Н., Еманов А.А. Экспериментально-морфологическое исследование влияния кальцийфосфатных соединений и неколлагеновых костных белков на репаративный процесс в костной ткани // Гений ортопедии. 2012. № 1. С. 119–123.
2. Ковинька М.А., Стогов М.В., Очеретина Р.Ю., Гребнева О.Л. Патент 2456927 Российская Федерация. Способ биологической оценки остеоиндуцирующего эффекта белков плазмы крови; заявл. 13.10.2010; опубл. 27.07.2012, Бюл. № 28.
3. Шевцов В.И., Волокотина Е.А., Лунева С.Н., Гребнева О.Л., Ковинька М.А., Талашова И.А., Стогов М.В., Накоскин А.Н., Силантьева Т.А., Кононович Н.А., Петровская Н.В., Ткачук Е.А., Гасанова А.Г., Еманов А.А., Гайдышев А.И. О перспективах использования наноматериалов в лечении поврежденных и заболеваний тканей опорно-двигательной системы // Гений ортопедии. 2008. № 4. С. 26–31.
4. Gordon K.J., Blobe G.C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease // Biochim. Biophys. Acta. 2008. 1782(4). P. 197–228.
5. Mackiewicz Z., Niklińska W.E., Kowalewska J., Chyczewski L. Bone as a source of organism vitality and regeneration // Folia Histochem Cytobiol. 2011. 49(4). P. 558–569.
6. Kanitkar M., Taylor H.D., Khan W.S. The use of growth factors and mesenchymal stem cells in orthopaedics // The Open Orthop. J. 2011. P. 271–275.

Библиографическая ссылка:

Мельников С.А., Накоскин А.Н., Лунева С.Н. Исследование изменений биохимических маркеров остеогенеза при внутривентриальном введении препаратов низкомолекулярных белков костной ткани быка на разных этапах сращения перелома голени у лабораторных мышей // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-102. URL: <http://www.medsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4940.pdf> (дата обращения: 13.11.2014).

References

1. Luneva SN, Talashova IA, Osipova EV, Nakoskin AN, Emanov AA. Eksperimental'no-morfologicheskoe issledovanie vliyaniya kal'tsiyfosfatnykh soedineniy i nekollagenovykh kostnykh belkov na reparativnyy protsess v kostnoy tkani. *Geniy ortopedii*. 2012;1:119-23. Russian.
2. Kovin'ka MA, Stogov MV, Ocheretina RYu, Grebneva OL; inventors. Sposob biologicheskoy otsenki osteoindutsiruyushchego effekta belkov plazmy krovi. Russian Federation patent RU 2456927. 2012. Russian.
3. Shevtsov VI, Volokotina EA, Luneva SN, Grebneva OL, Kovin'ka MA, Talashova IA, Sto-gov MV, Nakoskin AN, Silant'eva TA, Kononovich NA, Petrovskaya NV, Tkachuk EA, Gasanova AG, Emanov AA, Gaydyshev AI. O perspektivakh ispol'zovaniya nanomaterialov v lechenii povrezhdeniy i zabolevaniy tkaney oporno-dvigatel'noy sistemy. *Geniy ortopedii*. 2008;4:26-31. Russian.
4. Gordon KJ, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008;1782(4):197-228.
5. Mackiewicz Z, Niklińska WE, Kowalewska J, Chyczewski L. Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011;49(4):558-69.
6. Kanitkar M, Taylor HD, Khan WS. The use of growth factors and mesenchymal stem cells in orthopaedics. *The Open Orthop. J*; 2011.

Библиографическая ссылка:

Мельников С.А., Накоскин А.Н., Лунова С.Н. Исследование изменений биохимических маркеров остеогенеза при внутрибрюшинном введении препаратов низкомолекулярных белков костной ткани быка на разных этапах сращения перелома голени у лабораторных мышей // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-102. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4940.pdf> (дата обращения: 13.11.2014).