

**Белковый состав сыворотки крови
экспериментальных животных в условиях имплантации
кальцийфосфатных биоконпозитов**

И.А. Талашова

***Blood serum protein composition
in experimental animals under the implantation
of the biocomposites of calcium phosphate***

I.A. Talashova

Федеральное государственное учреждение

«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий», г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

Изучен белковый состав сыворотки крови экспериментальных животных при имплантации биоконпозиционных кальцийфосфатных материалов различного состава. Установлено, что при использовании имплантационного материала, в состав которого входит органический костный матрикс, повышается содержание белков острой фазы, однако через 6 недель эксперимента все показатели белкового состава крови во всех группах эксперимента возвращались к нормальным значениям.

Ключевые слова: имплантация, кальцийфосфатные материалы, биоконпозиты, белки сыворотки крови.

The blood serum protein composition of experimental animals for implantation of the biocompositional calcium-phosphate materials of different compound has been studied. It has been established that in case of using the implantation material, which includes organic bone matrix as a compound, the content of acute phase proteins increases, however, after 6 weeks of the experiment all the measures of blood protein composition return to normal values in all the experimental groups.

Keywords: implantation, calcium-phosphate materials, biocomposites, blood serum proteins.

ВВЕДЕНИЕ

В новом тысячелетии увеличение продолжительности жизни человека должно стать характерной чертой современного общества. В связи с этим возникает необходимость в решении ряда медико-материаловедческих проблем, в частности, создания материалов для искусственных органов и тканей. Усилия ученых направлены на решение актуального вопроса - выбора такого пластического материала, который бы по прочностным характеристикам и своему составу максимально приближался к костной ткани, которая является, по сути, композиционным материалом на основе ультрадисперсного карбонатсодержащего гидроксипатита (ГА) и белка коллагена с многоуровневой структурной организацией компонентов [1, 12, 15, 16, 17, 18].

Таковыми свойствами обладают материалы на основе кальцийфосфатных соединений, которые, в свою очередь, являются основным компонентом неорганического костного матрикса и относятся к группе естественных метаболитов костной ткани [2, 11]. В современной медицине применяются различные кальцийфосфатные

материалы, однако остаются неразрешенными вопросы, касающиеся оптимального состава и свойств имплантационных материалов.

В лаборатории биохимии ФГУН «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» разработаны кальцийфосфатные биоконпозиты [13, 14], в состав которых входят остеиндуцирующие составляющие: органический матрикс (ОМ) костной ткани крупного рогатого скота (КРС), около 90 % которого составляет коллаген [12], а также полипептидные факторы роста, выделенные из сыворотки крови животных, находящихся на этапе дистракции по методу Г. А. Илизарова, – сывороточные белки (СБ) [5, 6, 7, 10].

Известно, что в случае имплантации материалов, имеющих в своем составе чужеродные вещества белковой природы, велика вероятность отторжения имплантируемых материалов и возникновения аллергических реакций [1, 3, 12]. Поэтому нам представилось актуальным исследование влияния имплантации разработанных материалов на организм экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основу работы положен анализ результатов исследований, полученных в ходе имплантации опытным животным материалов на основе кальцийфосфатных соединений, выделенных из костной ткани КРС. Объектами исследования являлись 35 беспородных собак в возрасте от одного года до трех лет с массой тела $9,9 \pm 1,0$ кг. Уход и содержание животных осуществлялись в соответствии с требованиями инструкции №12/313 Министерства здравоохранения РФ «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник» от 06. 01.73 г. и на основании приказа МЗ СССР № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организованных форм работы с использованием экспериментальных животных» от 12.08.77 г.

В ходе исследования у экспериментальных животных в стерильных условиях под внутривенным барбитуровым наркозом создавали дырчатые дефекты в виде усеченных конусов диаметром 5 мм и высотой 7 мм в проксимальном метафизе большеберцовой кости и плеча и заполняли их разработанными композиционными материалами или место созданного дефекта ушивалось без его заполнения (оперативные вмешательства и послеоперационное ведение животных выполнены д.м.н. С. А. Ерофеевым и к. в. н. Н. А. Кононович).

Материалом биохимических исследований являлась кровь экспериментальных животных, взятая венепункцией. Забор крови осуществляли до операции и каждую неделю после операции в

течение шести недель.

Экспериментальный материал был распределен следующим образом:

1) в первой группе у опытных животных костные дефекты заполняли биокомпозитом, включающим кальцийфосфатное соединение и сывороточные белки – (КФС+СБ);

2) во второй группе – биокомпозитом, в состав которого входили кальцийфосфатное соединение, сывороточные белки и органический матрикс – (КФС+СБ+ОМ);

3) в третьей группе в костные дефекты имплантационные материалы не вносили – группа без имплантации;

Нормальными величинами служили результаты дооперационных исследований экспериментальных животных.

Содержание общего белка в сыворотке крови определяли микробиуретовым методом [8]. Определение белковых фракций осуществляли наборами реагентов “Beckman-Coulter” (США) согласно инструкциям, приложенным к данным наборам.

Полученные результаты исследований были обработаны с помощью методов непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна-Уитни для независимых выборок, поскольку наблюдаемые признаки не подчинялись нормальному распределению [4, 9], и представлены в виде медиан значений показателей и интерквартильных размахов. Различия считали значимыми при $p_0 < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что белки играют решающую роль в клеточной архитектуре, в катализе, в регуляции метаболизма, в сократительных процессах и в реакциях, обеспечивающих высшим организмам защиту от болезнетворных агентов. Белки имеют непосредственное отношение к подавляющему большинству событий на физиологическом уровне [3].

В связи с этим в ходе эксперимента изучался белковый состав сыворотки крови экспериментальных животных как один из показателей течения адаптационных процессов при имплантации различных материалов.

По результатам эксперимента установлено, что у животных первой группы (КФС+СБ) содержание в сыворотке крови общего белка, альбуминов, глобулинов и значение альбумин/глобулинового соотношения (А/Г) статистически значимо не отличались от нормальных значений (табл. 1).

Во второй группе (КФС+СБ+ОМ) содержание общего белка в ходе всего эксперимента статистически значимо не отличалось от нормальных значений, но в первые три недели опыта было отмечено значимое снижение содержания альбуминов и повышение содержания α_2 -глобулинов, за счет чего было снижено и альбумин/глобулиновое соотношение (табл. 1).

В третьей группе, где созданные костные дефекты не заполнялись имплантационными материалами, через одну неделю после операции наблюдали статистически значимое повышение содержания α_2 -глобулинов и, соответственно – значимое снижение альбумин/глобулинового соотношения. На шестой неделе опыта было отмечено значимое повышение содержания в сыворотке α_1 -глобулинов, но в данном случае это не привело к статистически значимому снижению А/Г (табл. 1).

Таблица 1

Белковый состав сыворотки крови экспериментальных животных (медианы значений показателей и интерквартильные размахи)

Срок после операции, недель	Число наблюдений, n	Общий белок, г/л	Альбумины, г/л	Глобулины, г/л	А/Г	Фракции глобулинов, г/л			
						α_1	α_2	β	γ
Норма	35	69,20 (64,80-75,50)	38,45 (35,26-41,77)	30,97 (27,34-35,16)	1,28 (0,89-1,43)	3,04 (2,32-5,80)	8,45 (7,34-9,49)	12,26 (10,82-14,51)	6,44 (4,86-8,37)
Группа КФС + СБ									
1	4	63,15 (61,60-64,70)	33,13 (32,97-33,30)	30,04 (28,34-31,74)	1,11 (1,04-1,18)	2,48 (2,31-2,66)	10,87 (10,41-11,32)	10,32 (8,26-12,39)	6,37 (5,37-7,36)
2	4	69,40 (68,80-70,00)	37,20 (36,74-37,66)	32,23 (32,12-32,34)	1,16 (1,15-1,16)	3,23 (3,15-3,30)	11,10 (10,99-11,21)	10,96 (10,01-11,90)	6,95 (5,71-8,19)
3	4	64,95 (62,40-67,50)	34,54 (31,79-37,29)	30,46 (25,06-35,86)	1,19 (0,89-1,49)	3,03 (2,69-3,38)	10,66 (7,96-13,37)	10,83 (8,02-13,64)	5,93 (5,47-6,40)
4	4	62,75 (57,85-67,66)	35,88 (35,65-36,11)	33,85 (30,23-37,47)	1,07 (0,95-1,19)	3,04 (2,80-3,27)	12,53 (10,15-14,90)	11,55 (9,03-14,06)	6,74 (5,24-8,24)
5	4	63,19 (61,53-64,85)	35,85 (33,47-38,24)	30,09 (26,25-33,93)	1,22 (0,99-1,46)	2,87 (2,38-3,35)	10,61 (9,06-12,16)	10,21 (7,48-12,93)	6,41 (5,49-7,33)
6	4	62,39 (61,48-63,30)	36,47 (34,93-38,01)	31,80 (28,57-35,02)	1,15 (1,09-1,22)	2,65 (2,44-2,86)	11,05 (8,64-13,45)	11,53 (9,59-13,46)	6,57 (5,66-7,49)
Группа КФС + СБ + ОМ									
1	4	69,95 (69,70-70,00)	30,24** (26,63-30,38)	40,99** (39,76-43,15)	0,76** (0,62-0,77)	6,92 (2,81-7,14)	15,34*** (14,77-16,94)	12,64 (11,83-13,88)	6,02 (6,02-6,19)
2	4	74,80 (72,40-75,50)	29,51* (26,11-35,83)	42,86** (40,52-42,94)	0,69** (0,60-0,89)	6,22 (2,52-7,97)	14,31** (12,42-14,48)	14,37 (14,04-14,46)	8,18 (8,13-9,23)
3	4	75,00 (70,00-77,20)	35,65 (32,06-36,05)	38,01* (35,11-41,14)	0,85* (0,79-0,88)	3,10 (2,57-3,92)	11,93** (11,69-13,66)	13,36 (13,30-13,43)	7,58 (7,57-9,03)
4	4	72,00 (61,20-76,40)	30,48* (29,13-34,63)	37,29 (32,07-45,84)	0,91 (0,66-0,93)	3,51 (2,75-4,32)	9,49 (7,92-10,7)	14,20 (9,07-19,02)	12,61 (5,63-15,98)
5	4	72,00 (62,40-72,00)	30,10 (27,58-41,69)	34,82 (30,38-41,87)	0,79 (0,72-1,38)	3,46 (3,02-3,78)	11,79 (8,93-15,12)	14,08 (11,66-14,47)	6,77 (5,16-8,82)
6	4	74,70 (74,50-80,00)	35,73 (34,64-42,21)	38,77 (32,50-45,36)	0,92 (0,76-1,30)	3,36 (3,28-3,59)	14,53 (8,07-16,48)	14,42 (13,89-15,92)	6,95 (6,56-9,60)
Группа без имплантации									
1	8	72,50 (71,30-75,00)	34,64 (31,95-35,59)	39,90* (37,39-41,46)	0,86* (0,78-0,95)	4,19 (2,73-5,66)	12,13* (10,07-13,33)	15,51 (14,25-16,11)	8,17 (5,80-10,91)
2	8	78,00 (64,90-86,20)	36,89 (29,90-42,02)	39,18 (34,89-44,33)	0,86 (0,83-1,00)	4,64 (3,73-5,69)	11,49 (8,92-12,58)	16,02 (14,49-16,64)	7,87 (5,77-11,43)
3	8	72,70 (69,45-75,45)	37,78 (34,26-38,70)	36,73 (33,12-38,80)	1,06 (0,89-1,17)	3,55 (2,61-5,58)	8,67 (7,70-10,76)	14,11 (13,43-16,39)	7,51 (5,25-10,22)
4	8	68,20 (64,40-72,00)	38,00 (37,48-38,52)	30,16 (26,92-33,40)	1,27 (1,15-1,39)	2,67 (2,30-3,03)	8,61 (7,79-9,43)	13,70 (11,91-15,48)	5,19 (4,19-6,19)
5	8	63,50 (56,00-71,00)	35,10 (31,36-38,84)	28,32 (24,53-32,10)	1,24 (1,21-1,27)	2,07 (1,23-2,91)	7,60 (5,54-9,66)	12,77 (10,98-14,56)	5,88 (4,97-6,78)
6	8	71,50 (65,00-78,00)	39,70 (36,27-43,13)	31,78 (28,68-34,87)	1,25 (1,24-1,26)	1,58* (1,37-1,79)	6,84 (6,57-7,10)	14,86 (13,65-16,07)	8,50 (7,09-9,91)

Примечание. Различия статистически значимы по сравнению с нормальными величинами: * - $p_U < 0,05$; ** - $p_U < 0,01$; *** - $p_U < 0,001$.

На рисунке 1 представлена динамика альбумин-глобулинового соотношения сыворотки крови экспериментальных животных в ходе всего эксперимента. Очевидно, что наиболее близкими к нормальным значениям являются показатели белкового спектра сыворотки крови экспериментальных животных, которым имплантировали биокомпозиционный материал, имеющий в своем составе минеральную составляющую – КФС, и сывороточные белки, выделенные из плазмы крови животных с активным остеогенезом.

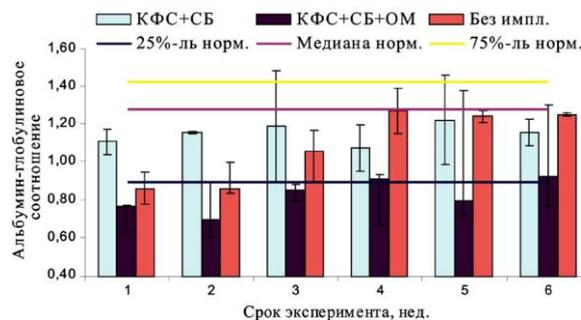


Рис. 1. Альбумин-глобулиновое соотношение сыворотки крови экспериментальных животных

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют утверждать, что введение в состав разработанных композиционных имплантационных материалов органического матрикса, выделен-

ного из костной ткани КРС, повышает системную воспалительную реакцию, что отражается в повышенном содержании в сыворотке крови белков острой фазы. Однако во всех опытных

группах содержание и соотношение белковых фракций в сыворотке крови животных к концу

эксперимента возвращались к нормальным значениям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Активизация репаративного остеогенеза с помощью биоактивных резорбируемых материалов - кальций-фосфатной биокерамики и комплексного препарата Коллапан / Г. Н. Берченко [и др.] // Ортопед., травматол. - 2000. - № 2. - С. 96.
2. Безруков, В. М. Гидроксипатит как субстрат для костной пластики : теоретические и практические аспекты проблемы / В. М. Безруков, А. С. Григорьян // Стоматология. — 1996. — № 3. — С. 7-12.
3. Бышевский, А. Ш. Биохимические сдвиги и их оценка в диагностике патологических состояний / А. Ш. Бышевский, С. Л. Галаян, О. А. Терсенов. - М. : «Медицинская книга», 2002. - 320 с.
4. Гайдышев, И. П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++ / И. П. Гайдышев. - СПб. : БХВ - Петербург, 2004. - 512 с.
5. Гребнева, О. Л. Влияние полипептидных факторов сыворотки крови на репаративный остеогенез : автореф. дис... канд. мед. наук / О. Л. Гребнева ; ТМИ. — Томск, 1998. - 21 с.
6. Ковинька, М. А. Регуляция регенерации кости в условиях остеосинтеза у больных ахондроплазией : автореф. дис... канд. биол. наук / М. А. Ковинька ; ТГУ. - Тюмень, 2002. - 24 с.
7. Коррекция осложнений и потенцирование костеобразования при травме композициями неколлагеновых белков / К. С. Десятниченко [и др.] // Паллиативная медицина и реабилитация. - 1998. - № 2-3. - С. 179-180.
8. Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / В. В. Миньшиков [и др.]. - М. : Медицина, 1987. - 368 с.
9. Платонов, А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии : задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А. Е. Платонов. - М. : Изд-во РАМН, 2000. - 52 с.
10. Соловьев, Г. С. Факторы стимуляции регенераторных процессов хрящевой и костной ткани / Г. С. Соловьев // Эпителий и соединительная ткань в нормальных, экспериментальных, патологических условиях : тез. конф. морфологов Сибири. - Тюмень, 1983. - С. 228-230.
11. Щепеткин, И. А. Кальцийфосфатные материалы в биологических средах / И. А. Щепеткин // Успехи совр. биологии. - 1995. - Т. 115, Вып. 1. - С. 58-73.
12. Щепеткин, И. А. Полипептидные факторы остеогенеза / И. А. Щепеткин // Успехи совр. биол. - 1994. - Т. 114, Вып. 4. - С. 454-466.
13. Заявка № 2003134131 036658 РФ, МПК⁷ А 61 К 9/36, 31/70, 31/715 Способ выделения коллагена из минерализованной соединительной ткани и косметическое средство на его основе / Лунева С. Н. [и др.] (РФ). - Заявл. 24.11.2003.
14. Заявка № 2005200254 000267 РФ, МПК⁷ А 61 К 6/033; 35/32; 37/00 Биоимплантат для возмещения дефектов минерализованных тканей и способ его получения / Шевцов В. И. [и др.] (РФ). - Заявл. 11.01.2005.
15. Functional loading bioceramic augmented alveolar ridge / E. B. Nery [et al.] // J. Prosthet. Dent. - 1990. - No 43. - P. 338.
16. Viable bone formation in porous hydroxyapatite : marrow cell-derived in vitro bone on the surface of ceramics / T. Yoshikawa [et al.] // J. Biomed. Mater. Ing. - 1997. - Vol. 7, No 1. - P. 49-58.
17. Vuola, J. Compressive strength of calcium carbonate and hydroxyapatite implants after bone-marrow-induced osteogenesis / J. Vuola, R. Taurio, H. Goransson // Biomaterials. - 1998. - Vol. 19, No 1-3. - P. 223-227.
18. Williams, C. Hydroxyapatite augmentation of the anterior portion of the maxilla with a modified transpositional flap technique / C. Williams, J. Meyers // Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol. - 1991. - Vol. 72, No 4. - P. 395-399.

Рукопись поступила 23.07.05.