

Показатели фосфатазной активности и электролитного обмена в условиях имплантации кальцийфосфатных материалов

И.А. Талашова, А.Г. Гасанова, Е.А. Ткачук

The measurements of phosphatase activity and electrolyte metabolism under the conditions of calcium-phosphate material implantation

I.A. Talashova, A.G. Gasanova, E.A. Tkachuk

Федеральное государственное учреждение «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, г. Курган
(директор — доктор медицинских наук А.В. Губин)

Изучено влияние оригинальных имплантационных кальцийфосфатных материалов на показатели метаболизма экспериментальных животных. Установлено, что данные материалы не оказывают негативного влияния на метаболические процессы.

Ключевые слова: имплантация, кальцийфосфатные соединения, фосфатазная активность, электролитный обмен.

The effect of original implantation calcium-phosphate materials on metabolism values of experimental animals has been studied. It has been established that these materials do not have a negative effect on metabolic processes.

Keywords: implantation, calcium-phosphate compounds, phosphatase activity, electrolyte metabolism.

ВВЕДЕНИЕ

Современной науке хорошо известны теоретические и практические разработки по созданию искусственных органов и тканей, а также работы по трансплантации клеток и биологически активных компонентов на носителях для восстановления повреждений в различных тканях организма [1, 4, 7]. Для возмещения дефектов костной ткани применяют имплантаты, различные по своему составу и свойствам. С этой целью используют металлы, полимеры, керамику, а также различные композиции. Одной из основных задач в области лечения костной патологии является создание биосовместимых искусственных композитов, состоящих из алло-и/или ксеноматериалов в сочетании с биоактивными молекулами (костные морфогенетические белки, факторы роста и т.д.), способных индуцировать остеогенез [1, 2, 10, 11]. Такие биоматериалы должны обеспечивать надежную поддерживающую, то есть опорную и/или структурообразовательную функцию в поврежденной области ткани или органа, и, кроме того, одним

из серьезных требований к материалам-носителям такого рода является и то, что они не должны оказывать негативного влияния на метаболические процессы.

В клинко-экспериментальном лабораторном отделе ФГУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий» созданы композиционные имплантационные материалы на основе кальцийфосфатных соединений (КФС I, КФС II, КФС III), выделенных из костной ткани крупного рогатого скота (КРС) по трем соответствующим технологиям [6]. В состав некоторых композиционных материалов вводили органический матрикс, выделенный из костной ткани КРС, и белки, полученные из сыворотки крови собак [8].

Целью данной работы являлось определение степени влияния состава оригинальных композиционных имплантационных материалов на показатели метаболизма — активность фосфатаз и содержание электролитов в сыворотке крови у экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте были использованы 32 взрослые беспородные собаки в возрасте от 1 года до 3 лет. В стерильных условиях под внутривенным

барбитуратовым наркозом осуществляли моделирование конусообразных несквозных дефектов в метафизах плечевой и большеберцовой костей

посредством выполнения отверстий диаметром 5-7 мм с использованием сверла и заполняли их разработанными композиционными материалами (операции выполнены к.в.н. Н. А. Кононович). Имплантацию проводили, руководствуясь требованиями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986 г.), с соблюдением этических норм и гуманного отношения к объектам изучения.

Имплантируемые материалы представляли собой композиции на основе кальцийфосфатных соединений, выделенных из костной ткани КРС по следующим технологиям [6]:

1) КФС I – с использованием для деминерализации костной ткани КРС 0,5 н раствора HCl, а для осаждения КФС - насыщенного раствора NaOH;

2) КФС II – аналогично КФС I и дополнительно обработано 8 М раствором карбамида;

3) КФС III – с использованием для деминерализации костной ткани КРС 6 н раствора HCl, а для осаждения КФС – раствора Ca(OH)₂.

КФС I представляет собой фосфатное соединение кальция с примесями в виде небольшого количества карбонатов и белковых соединений. По нашему мнению, это костные неколлагеновые белки, осадившиеся вместе с минеральными солями кальция. КФС II очищено от костных белков и имеет в своем составе небольшое количество карбонатов кальция. Соединение КФС III отличается от КФС I и КФС II тем, что в нем в большей степени присутствуют карбонатионы и незначительное количество белковых соединений. Помимо кальция и фосфора в состав всех применяемых материалов входят Mg, Na и S. По своему составу и соотношению Ca/P наиболее близким к минеральному матриксу костной ткани является КФС I [5].

Известно, что перестраивающаяся костная ткань является источником факторов роста полипептидной природы, которые в условиях чрескостного остеосинтеза активно поступают в циркуляторное русло [7]. В связи с этим в качестве остеиндуцирующего агента в разработанные композиции вводили белки, выделенные из сыворотки крови собак, находящихся на этапе дистракции при удлинении голени по методу Г.А. Илизарова с использованием интрамедуллярных противозогнутых спиц (оператор д.м.н. Попков Д. А.). Забор крови для выделения белков осуществляли на 28-е сутки дистракции. Сывороточные белки (СБ) с молекулярной массой 20-30 кДа, обладающие остеиндуцирующими свойствами, получали при помощи последовательных процедур высалива-

ния, гель-проникающей хроматографии, диализа и лиофильного высушивания. Также в состав кальцийфосфатных композиций вводили органический костный матрикс (ОМ), полученный по оригинальной методике [9].

Животным имплантировали биокomпозиционные материалы различного состава и, исходя из этого, экспериментальные животные были распределены на четыре серии (табл. 1).

Таблица 1
Распределение экспериментальных животных

Серия	Группа	Состав имплантируемого материала	Количество экспериментальных животных
Серия I	IA	КФС I+СБ	4
	IB	КФС I+СБ+ОМ	4
Серия II	IIA	КФС II+СБ	4
	IIB	КФС II+СБ+ОМ	4
Серия III	IIIA	КФС III+СБ	4
	IIIB	КФС III+СБ+ОМ	4
Серия IV	IV	Без имплантации	8

В ходе эксперимента исследовали кровь животных в сроки до операции и каждую неделю до 6 недель после операции. Определяли активность общей щелочной фосфатазы (ОЩФ) и тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы (ТрКФ), а также концентрации кальция, магния, хлоридов и фосфатов на анализаторе Stat Fax 1904 Plus фирмы AWARENESS TECHNOLOGY INC (США) с использованием наборов фирмы Vital Diagnostic (Россия).

Для более объективного определения влияния состава имплантируемых материалов на активность фосфатаз применяли интегральный индекс фосфатаз (ИФ) [3], представляющий собой отношение активности общей щелочной фосфатазы к активности тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы (ИФ=ОЩФ/ТрКФ).

Изменения содержания и соотношения остеотропных элементов в сыворотке крови оценивали с помощью системного индекса электролитов (СИЭ):

$$\text{СИЭ} = (\text{Cl}) \cdot (\text{Mg}) \cdot ((\text{Ca})/(\text{P})),$$

где (Cl), (Mg), (Ca), (P) – содержание соответствующих элементов в сыворотке крови экспериментальных животных.

Показатели сыворотки крови экспериментальных животных в динамике эксперимента сравнивали с дооперационными значениями с использованием непараметрических критериев – W-критерия Вилкоксона для независимых выборок и критерия Колмогорова-Смирнова. Результаты исследования представлены в виде медиан и интерквартильных размахов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в группе IA индекс фосфатаз на всех этапах эксперимента статистически значимо не отличался от дооперационных значений.

В группе IB активность ОЩФ в сыворотке

крови статистически значимо отличалась от нормальных значений практически на всех сроках эксперимента, но за счет незначительного роста активности ТрКФ индекс фосфатаз статистически

значимо отличался от нормальных значений лишь на первой неделе опыта (табл. 2).

В группе IIА в первые две недели после операции отмечалось статистически значимое повышение индекса фосфатаз за счет увеличения активности ОЩФ, в то же время в группе IIБ активность обеих фосфатаз и их соотношение статистически значимо не отличалось от дооперационных значений на всех сроках наблюдения (табл. 3).

Несмотря на то, что в обеих группах III серии отмечалось статистически значимое повышение активности как ОЩФ, так и ТрКФ, индекс фосфатаз значимо не отличался от значений нормы (табл. 4).

В серии IV (без имплантации) статистически значимых отклонений значений ИФ от уровня нормы не наблюдалось (табл. 5).

Таблица 2

Активность фосфатаз в сыворотке крови экспериментальных животных серии I
(медианы значений и интерквартильные размахи)

	ОЩФ, Е/л 57,35 (49,00-88,80)		ТрКФ, Е/л 4,50 (4,00-5,60)		Индекс фосфатаз (ОЩФ/ТрКФ) 11,98 (9,92-18,82)	
Норма (n=24)	Группа А	Группа Б	Группа А	Группа Б	Группа А	Группа Б
1 нед.	91,85 (77,70-106,00)	125,60** (103,10-200,05)	5,90 (5,40-6,40)	5,20 (4,50-6,15)	15,89 (12,14-19,63)	22,88* (21,64-34,92)
2 нед.	96,90 (82,00-111,80)	112,32** (105,41-142,00)	5,15 (4,30-6,00)	5,36 (5,01-6,55)	19,83 (13,67-26,00)	21,07 (20,96-21,67)
3 нед.	91,55 (73,30-109,80)	118,66** (98,36-137,42)	5,10 (5,00-5,20)	6,35 (5,28-7,17)	18,03 (14,10-21,96)	19,22 (17,01-21,32)
4 нед.	93,47 (79,14-107,81)	127,80* (126,46-129,14)	4,80 (4,53-5,07)	5,55 (4,27-6,83)	19,71 (15,60-23,82)	24,25 (18,89-29,61)
5 нед.	93,54 (78,48-108,61)	125,60* (111,80-139,40)	4,84 (4,72-4,95)	5,75 (4,80-6,70)	19,28 (16,61-21,96)	22,05 (20,81-23,29)
6 нед.	95,53 (80,49-110,57)	91,00 (85,7-101,30)	5,04 (4,61-5,47)	4,00 (3,60-4,30)	19,35 (14,73-23,98)	23,56 (21,43-25,28)

Примечание. Здесь и далее в табл. 2-5: * - различия статистически значимы по сравнению с дооперационными значениям при $p < 0,05$ - *; $p < 0,01$ - **; $p < 0,001$ - ***.

Таблица 3

Активность фосфатаз в сыворотке крови экспериментальных животных серии II
(медианы значений и интерквартильные размахи)

	ОЩФ, Е/л 57,35 (49,00-88,80)		ТрКФ, Е/л 4,50 (4,00-5,60)		Индекс фосфатаз (ОЩФ/ТрКФ) 11,98 (9,92-18,82)	
Норма (n=24)	Группа А	Группа Б	Группа А	Группа Б	Группа А	Группа Б
1 нед.	185,95*** (143,80-317,05)	97,30 (71,21-126,35)	5,65 (4,60-6,95)	5,35 (4,80-6,13)	31,18** (26,49-57,62)	19,02 (11,76-26,27)
2 нед.	160,15*** (131,80-188,10)	91,85 (80,60-134,35)	5,05 (4,15-5,90)	4,55 (4,10-5,25)	32,20*** (28,14-36,66)	21,24 (17,73-27,49)
3 нед.	124,90** (97,30-191,10)	67,55 (64,65-76,95)	4,20 (3,70-7,60)	4,05 (3,85-4,20)	29,43 (11,28-33,55)	17,56 (15,97-19,29)
4 нед.	99,85 (95,10-104,60)	57,70 (51,50-63,90)	6,60 (6,60-6,60)	6,90 (4,80-9,00)	15,13 (14,41-15,85)	9,52 (5,72-13,31)
5 нед.	70,75 (67,50-74,00)	56,54 (55,90-57,19)	16,60* (6,40-26,80)	5,23 (4,76-5,70)	7,04 (2,52-11,56)	10,91 (9,81-12,01)
6 нед.	73,25 (59,50-87,00)	35,20* (34,10-36,30)	7,90* (7,20-8,60)	3,95 (3,50-4,40)	9,50 (6,92-12,08)	9,06 (7,75-10,37)

Таблица 4

Активность фосфатаз в сыворотке крови экспериментальных животных серии III при имплантации материалов на основе кальцийфосфатных соединений (медианы значений и интерквартильные размахи)

	ОЩФ, Е/л 57,35 (49,00-88,80)		ТрКФ, Е/л 4,50 (4,00-5,60)		Индекс фосфатаз (ОЩФ/ТрКФ) 11,98 (9,92-18,82)	
Норма (n=24)	Группа А	Группа Б	Группа А	Группа Б	Группа А	Группа Б
1 нед.	156,85* (87,10-420,20)	131,08** (100,48-191,00)	6,10 (5,25-7,65)	5,54 (4,75-9,04)	29,79 (15,20-57,15)	29,17 (13,08-40,20)
2 нед.	115,50** (112,50-116,20)	113,27* (84,26-203,71)	7,40* (6,30-9,30)	8,28* (5,63-10,71)	13,25 (12,42-22,78)	13,12 (10,06-34,47)
3 нед.	79,15 (62,45-141,25)	86,40 (49,35-187,70)	6,55* (6,00-10,00)	6,15* (5,75-8,45)	11,84 (9,53-15,50)	12,69 (5,61-32,07)
4 нед.	96,95 (93,70-100,20)	70,75 (45,70-95,80)	5,45 (4,60-6,30)	4,95 (4,80-5,10)	18,33 (14,87-21,78)	14,15 (9,52-18,78)
5 нед.	160,85 (74,80-246,90)	130,20* (108,20-152,20)	6,25 (5,10-7,40)	6,75 (6,60-6,90)	24,02 (14,67-33,36)	19,37 (15,68-23,06)
6 нед.	180,30** (98,00-185,90)	109,65 (94,40-124,90)	4,20 (3,90-4,70)	5,25 (3,90-6,60)	30,85 (23,33-38,36)	23,16 (14,30-32,03)

Таблица 5

Активность фосфатаз в сыворотке крови экспериментальных животных серии IV (без имплантации)
(медианы значений и интерквартильные размахи)

	ОЩФ, Е/л	ТрКФ, Е/л	Индекс фосфатаз (ЩФ/ТрКФ)
Норма (n=24)	57,35 (49,00-88,80)	4,50 (4,00-5,60)	11,98 (9,92-18,82)
1 нед.	82,40 (48,65-116,50)	6,10 (5,30-9,10)	11,90 (5,11-22,06)
2 нед.	119,10 (82,80-126,00)	5,65 (4,50-8,80)	15,33 (10,84-23,70)
3 нед.	75,10 (53,70-92,20)	5,40 (4,35-8,25)	12,41 (7,86-18,23)
4 нед.	85,70 (66,80-104,60)	7,00 (6,60-7,40)	12,13 (10,12-14,14)
5 нед.	114,70* (109,60-119,80)	4,95 (4,80-5,10)	23,16 (22,83-23,49)
6 нед.	82,75 (73,30-92,20)	5,90 (5,40-6,40)	14,26 (11,45-17,07)

Результаты исследования показали, что на первых двух неделях эксперимента имплантация материалов на основе КФС I и КФС II привела к повышению фосфатазной активности, что отразилось в увеличении ИФ за счет повышения активности ОЩФ. Имплантация материалов на основе КФС III не приводила к статистически значимому изменению ИФ.

Для оценки изменений, происходящих в организме экспериментальных животных под воздействием имплантируемых материалов, измеряли содержание в сыворотке крови ионов хлора, магния, кальция и фосфатов и для обобщения полученных результатов рассчитывали системный индекс электролитов.

В серии I значения СИЭ во все сроки эксперимента не отличались от значений нормы (рис. 1 и 2). В серии II в группах IIА (рис. 1) и IIБ (рис. 2) в конце эксперимента СИЭ повышался, что указывает на активизацию процессов обмена ионами кальция между кровяным руслом и костной тканью при имплантации материалов на основе КФС II.

В серии III в группах IIIА и IIIБ системный индекс электролитов в ходе эксперимента был на уровне нормальных значений (рис. 1 и 2).

В серии IV (без имплантации) статистически значимых отклонений значений СИЭ от нормального уровня не происходило.

Таким образом, статистически значимое повышение СИЭ было отмечено лишь при имплантации материалов на основе КФС II, представляющего собой кальцийфосфатное соединение, очищенное от костных белков. При ис-

пользовании материалов на основе двух других КФС значимого изменения значений СИЭ не происходило.

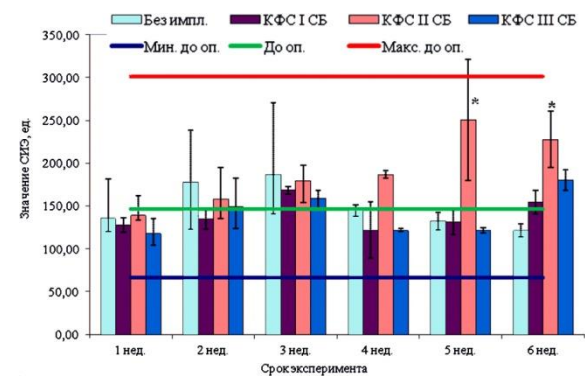


Рис. 1. Системный индекс электролитов в группах с применением биокомпозиов КФС + СБ

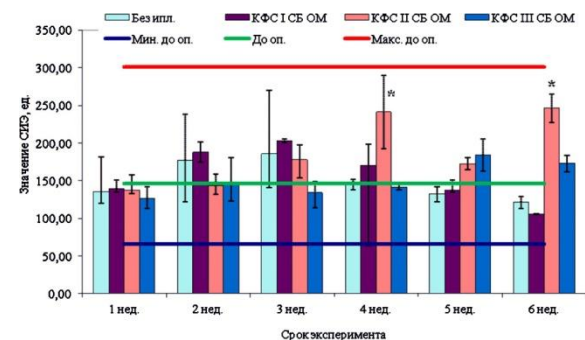


Рис. 2. Системный индекс электролитов в группах с применением биокомпозиов КФС+СБ+ОМ

ВЫВОДЫ

Отсутствие уже после 1-2 недель эксперимента статистически значимых изменений показателей метаболизма – фосфатазной активности и содержания электролитов в крови экспериментальных животных – позволяет сделать вывод о высокой степени биосовместимости разработанных нами имплантационных материалов.

В случае применения для имплантации материалов на основе КФС II в сочетании с органическим матриксом и/или с сывороточными белками происходило повышение СИЭ. Это говорит об увеличении интенсивности обмена ионами кальция между костной тканью и кровью, что положительно сказывается на течении репаративных процессов в костной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Активизация репаративного остеогенеза с помощью биоактивных резорбируемых материалов - кальций-фосфатной биокерамики и комплексного препарата Коллапан / Г. Н. Берченко и [др.] // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. № 2. С. 96.

2. Владимирская Е. Б., Румянцев А. Г. Роль ростовых факторов в регуляции кроветворения // Гематология и трансфузиология. 2000. № 6. С. 4-8.
3. Информативность лабораторных исследований в травматологии и ортопедии / К. С. Десятниченко [и др.] // Современные методы диагностики : тез. докладов. Барнаул, 1999. С. 202–203.
4. Путилев В. И. Современные биокерамические материалы // Соровский образовательный журнал. 2004. Т. 8, № 1. С. 44-49.
5. Талашова И. А., Силантьева Т. А. Качественный и количественный состав имплантационных кальцийфосфатных материалов // Успехи современного естествознания. 2007. № 11. URL: http://www.rae.ru/use/pdf/2007/11/2007_11_02.pdf
6. Талашова И. А., Силантьева Т. А. Лабораторное выделение кальцийфосфатных соединений из костной ткани крупного рогатого скота и определение их состава методом электронно-зондового микроанализа // Гений ортопедии. 2007. № 4. С. 71-75.
7. Щепеткин И. А. Полипептидные факторы остеогенеза // Успехи современной биологии. 1994. Т. 114, Вып. 4. С. 454-466.
8. Биоимплантат для возмещения дефектов минерализованных тканей и способ его получения : пат. 2311167 Рос. Федерация. № 2005100254 ; заявл. 11.01.2005 ; опубл. 27.11.2007, Бюл. № 33. 6 с.
9. Способ выделения коллагена из костной ткани сельскохозяйственных животных : пат. 2288729 Рос. Федерация. № 2003134131/15 ; заявл. 24.11.2003 ; опубл. 10.12.2006, Бюл. № 34. 5 с.
10. Suchanek W., Yashimura M. Processing and properties of hydroxyapatitebased biomaterials for use as hard tissue replacement implants // J. Mater. Res. 1998. Vol. 13, Тщ1. Р. 94–117.
11. Viable bone formation in porous hydroxyapatite : marrow cell-derived in vitro bone on the surface of ceramics / T. Yoshikawa [et al.] // Biomed. Mater. Eng. 1997. Vol. 7, No 1. Р. 49-58.

Рукопись поступила 22.12.08.

Сведения об авторах:

1. Талашова Ирина Александровна– ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, старший научный сотрудник клинко-экспериментального отдела, к. б. н., e-mail: i_talashova@mail.ru;
2. Гасанова Анна Георгиевна– ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, младший научный сотрудник клинко-экспериментального отдела, e-mail: gasanova.08@mail.ru;
3. Ткачук Елена Анатольевна– ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, младший научный сотрудник клинко-экспериментального отдела, e-mail: ea_tkachuk@mail.ru.