

Биохимические исследования показателей пероксидации в сыворотке крови собак с моделью дегенеративно-дистрофических изменений в суставах

Е.С. Спиркина, Е.Л. Матвеева, М.А. Степанов

Biochemical studies of the values of peroxidation in canine blood serum with the model of degenerative-and-dystrophic changes in joints

E.S. Spirkina, E.L. Matveeva, M.A. Stepanov

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган
(директор — д. м. н. А. В. Губин)

Цель исследования. Изучить изменения в системе перекисного окисления липидов и белков сыворотке крови у экспериментальных животных. **Материалы и методы.** Определялись показатели перекисного окисления липидов и белков в сыворотке крови у экспериментальных животных с моделью дегенеративно-дистрофических изменений суставов. **Результаты.** Показано достоверное увеличение в крови продуктов пероксидации липидного спектра при развитии патологии сустава. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что при развитии остеоартроза происходит накопление продуктов пероксидации в сыворотке крови у экспериментальных животных и, как следствие, высокое содержание свободнорадикальных соединений, что, в свою очередь, способствует развитию патологического процесса. **Ключевые слова:** сыворотка крови, биохимический состав сыворотки крови, перекисное окисление, дегенеративно-дистрофические изменения в суставах.

Purpose. To study the changes in the system of peroxidation of lipids and proteins in blood serum of experimental animals. **Materials and Methods.** The values of lipid and protein peroxidation in blood serum determined in experimental animals with the model of degenerative-and-dystrophic changes in joints. **Results.** The significant increase in lipid spectrum peroxidation products demonstrated in blood for articular pathology development. **Conclusion.** The results evidence that peroxidation products accumulate in blood serum of experimental animals in case of osteoarthritis development, and a high content of free radical compounds observes as a consequence, which in its turn contributes to pathologic process development. **Keywords:** blood serum, blood serum biochemical composition, peroxidation, degenerative-and-dystrophic changes in joints.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что баланс образования и расходования перекисей и других продуктов окисления может нарушаться при развитии патологического процесса, а метаболиты перекисей накапливаются в тканях и биологических жидкостях. Это приводит к серьезным изменениям, в первую очередь, в биологических мембранах. Следствием активизации перекисного окисления может быть изменение физико-химических свойств мембранных белков и липидов, изменение активности мембранно-связанных ферментов, нарушение проницаемости мембран, уменьшение электрической стабильности липидного слоя.

В связи с важной ролью перекисного окисления в патогенезе различных заболеваний определение продуктов этого процесса (главным образом, конъюгированных диенов, малонового диальдегида) имеет все возрастающее диагностическое и прогностическое значение [1]. Усиление деструктивных процессов в результате развития перекисного окисления может яв-

ляться патогенетическим фактором при развитии патологических изменений в суставе [9].

При проведении исследовательской работы с суставами часто требуется создать экспериментальную модель остеоартроза. Для этого бывает необходимо провести моделирование его на животных. Цель таких исследований – создать болезнь с последующим проведением на ней экспериментальных опытов влияния различных терапевтических методик и средств на течение болезни. Существует достаточно много способов, позволяющих получить дегенеративные изменения в суставном хряще и других структурах сустава [4, 9]. При выборе способа моделирования необходимо учитывать возраст и физиологическое состояние животного, какой тип остеоартроза нужно получить: посттравматический или остеоартроз, имеющий метаболическое нарушение.

Цель исследования: изучить изменения в системе перекисного окисления липидов и белков сыворотке крови у экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы образцы сыворотки крови 20 беспородных собак обоего пола. Из них 12 образцов сыворотки крови от интактных собак и 8 образцов крови собак с моделью дегенеративно-дистрофических изменений. Забор крови у животных осуществлялся до операции при моделировании остеоартроза и после эвтаназии. Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли согласно требованиям приказа МЗ СССР № 755, 1977 г., а также

руководствуясь требованиями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» с соблюдением этических норм и гуманного отношения к объектам изучения [5].

Моделирование остеоартроза осуществляли путем иммобилизации и компрессии обоих коленных суставов в течение 28 суток с пересечением бедренной артерии. Для этого у наркотизированных животных, после об-

работки операционного поля, с медиальной поверхности бедра через прямолинейный разрез мягких тканей выделяли бедренную артерию на уровне средней части бедренной кости, лигировали в двух местах и пересекали между лигатурами, что способствовало развитию вазоконстрикторной реакции организма. Операционную рану ушивали послойно. После этого коленный сустав иммобилизировали аппаратом Илизарова, состоящим из двух дугообразных опор, соединенных шарнирными узлами с резьбовыми хвостиками. Одна из опор располагалась в нижней трети бедра, другая - в верхней трети голени. В качестве костных фиксаторов использовали спицы Киршнера, по три на каждой опоре.

Общее количество белка определяли биуретовым методом. Продукты ПОБ сыворотки крови определяли в белковом осадке по реакции 2,4-динитрофенилгидразином. Продукты реакции регистрировали при длинах волн 270 нм (ПОБ270), 363 нм и 370 нм (ПОБ363+370). Степень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.) на 1 мг белка [2]. Оценку процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) осуществляли путем измерения в сыворотке крови содержания первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (малоновый диальдегид)

продуктов. Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли спектрофотометрически по разности оптической плотности между опытной и контрольной пробами при длине волны 232 нм [7]. Определение малонового диальдегида (МДА) проводили по реакции с тиобарбитуровой кислотой [7]. Концентрацию продуктов перекисного окисления рассчитывали на мг общих липидов сыворотки крови, которые, в свою очередь, определяли с помощью наборов фирмы "Lachema" (Чехия). О состоянии антиоксидантной защиты судили по активности в сыворотке крови фермента каталазы, определение которой проводили спектрофотометрически при длине волны 410 нм, согласно описанному методу, основанному на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [6].

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программ «Microsoft Excel – 2007» и «AtteStat» Версия 1.0 [3]. Цифровые данные представлены в виде среднего арифметического и ошибки средней. Для оценки статистической значимости различий средних, в зависимости от нормальности распределения, использовали критерии Вилкоксона. Различия между группами считали существенными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным научной литературы, в норме вазоконстрикция рассматривается как компенсаторно-приспособительная реакция организма для предупреждения чрезмерного обезвоживания тканей, так как ограничивается обменная поверхность микрососудов. Одновременно происходит активная констрикция вен, которая приводит к повышению сопротивления току крови в них и, соответственно, венозного давления, что вызывает повышение капиллярного давления [8].

Полученные результаты применения компрессионной модели с использованием внешних фиксаторов (спиц) аппарата Илизарова показали, что в сыворотке крови подобное повреждение вызывает дегенеративно-дистрофические процессы в суставах (рис. 1).



Рис. 1. Изменения в суставе при моделировании остеоартроза (анатомический препарат)

При моделировании остеоартроза на 28 сутки фиксации коленных суставов аппаратом Илизарова

на рентгенограммах наблюдалось сужение суставной щели, остеопороз дистального метафиза бедренной кости, очаговый остеосклероз субхондральной зоны, а контуры суставных поверхностей имели перфорированный вид (рис. 2, б).

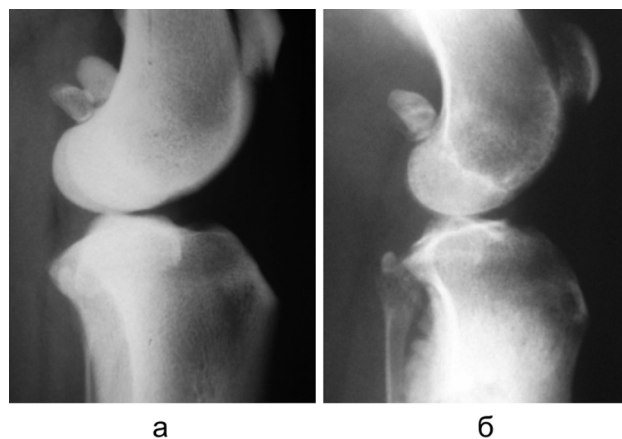


Рис. 2. Рентгенограммы коленного сустава собаки, боковая проекция: а – до моделирования артроза; б – после создания модели деформирующего остеоартроза

Следует отметить, что клинически и рентгенологически было доказано, что данная модель вызывает развитие дегенеративно-дистрофических изменений в суставе (Патент №2452999 от 10.06.2012 г. «Способ моделирования остеоартроза коленного сустава»).

Биохимические исследования показали, что при развитии дегенеративных процессов в суставе показатели общего количества липидов и белков остаются на дооперационном уровне. Одним из неблагоприятных последствий перекисного окисления липидов считают образование малонового диальдегида (МДА) в результате обусловленного свободными радикалами разрыва полиненасыщенных жирных кислот. Этот альдегид образует шиффовы основания с аминок группами белка, выступая

в качестве «сшивающего» агента. В результате сшивки образуются нерастворимые липид-белковые комплексы, называемые пигментами изнашивания или липофусцинами. Концентрация малонового диальдегида в сыворотке крови отражает активность процессов перекисного окисления липидов в организме больного и служит маркером степени эндогенной интоксикации. Как правило, высокое содержание малонового диальдегида соответствует тяжелой степени эндогенной интоксикации [10]. По полученным нами результатам можно увидеть достоверное увеличение малонового диальдегида как конечного продукта распада перекисного окисления липидов при развитии дегенеративно-дистрофических процессов в суставах и продуктов более глубокого окисления белков-альдегидов, которые, в свою очередь, достоверно снижаются с уровнем значимости $p < 0,05$.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при развитии остеоартроза происходит накопление продуктов перекисной окисления в сыворотке крови у экспериментальных животных и, как след-

ствие, высокое содержание свободнорадикальных соединений, что, в свою очередь, способствует развитию патологического процесса.

Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Биохимические показатели у экспериментальных животных с моделью дегенеративно-дистрофических поражений сустава до операции и после эвтаназии

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Общие липиды (ОЛ), г/л	4,18±0,56	4,67±0,07
Малоновый диальдегид(МДА), нмоль/г л	1,95±0,67	4,07±1,04*
Диеновые конъюгаты (ДК), нмоль/г л	13,93±3,01	18,91±3,00
Каталаза, мккатал.	1,35±0,35	1,27±0,09
ПОБ альдегиды, ед. опт. пл.	0,08±0,01	0,05±0,01*
Кетоны, ед. опт. пл.	0,01±0,00	0,01±0,00
Общий белок (ОБ), г/л	75,36±2,57	77,00±1,57

Примечание * – значения достоверно отличаются с уровнем вероятности $p < 0,05$

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А. Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
Vladimirov YuA, Archakov AI. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranakh [Lipid peroxidation in biological membrans]. M: Nauka. 1972. 252 s.
2. Вьюшин А. В., Вайдо А. И., Герасимова И. А. Процессы перекисного окисления белков у крыс, селективных по порогу возбудимости нервной системы // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. Т. 133, № 3. С. 292-296.
V'iushin AV, Vaído AI, Gerasimova IA. Protsessy perekisnogo okisleniia belkov u kryis, selektivnykh po porogu vzbudimosti nervnoi sistemy [Processes of protein peroxidation in rats selective by excitability threshold of the nervous system]. Biul. eksperim. biologii i meditsiny. 2002;133(3):292-296.
3. Гайдышев И. П. Решение научных и инженерных задач средствами Exel, VBA и C/C++. СПб.: БХВ – Петербург, 2004. 512 с.
Gaidyshev IP. Reshenie nauchnykh i inzhenernykh zadach sredstvami Exel, VBA i C/C++ [Solution of scientific and engineering problems by the means of Exel, VBA and C/C++]. SPb: BKhV. Peterburg. 2004. 512 s.
4. Дедух Н. В., Малышкина С. В., Панков Е. Я. Метод морфологической оценки сустава при деструктивно-дистрофических поражениях : информ. письмо. Киев, 1988. 2 с.
Dedukh NV, Malyskhina SV, Pankov EA. Metod morfologicheskoi otsenki sustava pri destruktivno-distroficheskikh porazheniakh : inform. pis'mo [A technique for morphological evaluation of the joint for destructive-and-dystrophic involvements: an information letter]. Kiev. 1988. 2 s.
5. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопр. реконструкт. и пласт. хирургии. 2003. № 4. С. 34-36.
Evropeiskaia konventsia po zashchite pozvonochnykh zhivotnykh, ispol'zuemykh dlia eksperimental'nykh i drugikh nauchnykh tselei [The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes]. Vopr. rekonstrukt. i plast. Khirurgii. 2003;(4):34-36.
6. Королюк М. А., Иванова Л. И., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
Koroliuk MA, Ivanova LI, Tokarev VE. Metod opredeleniia aktivnosti katalazy [A technique for catalase activity determination]. Lab. delo. 1988;(1):16-19.
7. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. 392 с.
Orehovich VN. Sovremennye metody v biokhimii [Modern methods in biochemistry]. M: Meditsina. 1977. 392 s.
8. Сазонова Н. В., Долганова Т. И. Влияние динамической электростимуляции при гонартрозе на периферическую гемодинамику // Казан. мед. журн. 2009. Т. 90, № 3. С. 360-363.
Sazonova NV, Dolganova TI. Vlianie dinamicheskoi elektrostimulatsii pri gonartroze na perifericheskuiu gemodinamiku [The effect of dynamic electrostimulation on peripheral hemodynamics for gonarthrosis]. Kazan med zhurn. 2009;90(3):360-363.
9. Сравнительное морфологическое изучение различных моделей деформирующего артроза / Е. Я. Панков, И. Федыш, Н. В. Дедух, И. Кисс, С. В. Малышкина, М. Керн, Г. Гярмати // Ортопедия, травматология и протезирование. 1988. № 6. С. 61-70.
Pankov EA, Feldysh I, Dedukh NV, Kiss I, Malyskhina SV, Kern M, Giarmati G. Sravnitel'noe morfologicheskoe izuchenie razlichnykh modelei deformiruiushchego artroza [Comparative morphological study of different deforming arthrosis models]. 1988;(6):61-70.
10. Малоновый диальдегид в сыворотке крови // Medn. ru. Режим доступа : <http://www.medn.ru/statyi/malonovyjdialde.html>.
Malonovy dial'degid v syvorotke krovi [Malonic dialdehyde in blood serum]. Medn. ru. http://www.medn.ru/statyi/malonovyjdialde.html.

Рукопись поступила 29.11.2012.

Сведения об авторах:

1. Спиркина Елена Сергеевна – ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, клинко-экспериментальный лабораторный отдел, лаборант-исследователь.
2. Матвеева Елена Леонидовна – ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, клинко-экспериментальный лабораторный отдел, ведущий научный сотрудник, д. б. н.; e-mail: matveevan@mail.ru.
3. Степанов Михаил Александрович – ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, лаборатория гнойной остеологии и замещения дефектов, ведущий научный сотрудник, к. в. н.