

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК: 617.246/14-147

Я. В. Панасюк, М. М. Корда

ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України”

БІОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТТРАВМАТИЧНОГО РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ НАНОАКВАХЕЛАТІВ МЕТАЛІВ

Проблема відновлення кісткової тканини після травми у наш час є важливою і актуальною. У роботі досліджено динаміку біохімічних показників остеодеструкції і остеорегенерації у експериментальних тварин з травматичним кістковим дефектом при пероральному застосуванні наноаквахелатів Ca, Cu, Co, Zn, Mg, Fe. Результати показали позитивний стимулюючий вплив суміші наноаквахелатів на процеси остеорегенерації. Зокрема, під впливом запропонованого методу корекції достовірно поліпшилися показники кальцію, оксипроліну, сіалових кислот, активності лужної та кислотної фосфатази, індексу мінералізації. Отримані дані потребують подальшого вивчення можливості застосування наноаквахелатів для стимуляції репаративної остеорегенерації.

Ключові слова: посттравматична остеорегенерація, остеогенез, наноаквахелати.

ВСТУП

Лікування переломів та їх ускладнень завжди було складним завданням для практикуючих ортопедів-травматологів. В той же час принципи лікування, репозиції та фіксації кісткових відламків залишилися практично незмінними протягом декількох останніх століть [1].

Для вирішення сучасних проблем травматології та ортопедії необхідні нові інноваційні підходи. Враховуючи те, що сама кістка є прикладом нанокомпозиту, застосування наноматеріалів повинно відіграти ключову роль у майбутніх дослідженнях. Планується, що саме із застосуванням нанотехнологій вдасться вирішити актуальні питання травматології і ортопедії: досягнення необхідних властивостей імплантів, стимуляція остеорегенерації, можливість кісткової тканинної інженерії [2].

Багатообіцяючими є результати досліджень вітчизняних науковців В. Б. Борисевича, В. Г. Каплукека та співав. [3, 4], які вивчали вплив наноаквахелатів металів (Fe, Cu, Co, Zn, Mg) на процеси утворення кісткової мозолі при переломах довгих трубчастих кісток у собак. У даних роботах було показано, що при застосуванні наноаквахелатів металів спостерігається поліпшення морфологічних, рентгенологічних та деяких біохімічних показників, що характеризують остеогенез. Метою нашої роботи стало вивчення біохімічних маркерів

остеорегенерації та остеорезорбції у щурів з травматичним кістковим дефектом, яким вводили суміш наноаквахелатів Ca, Fe, Cu, Co, Zn, Mg.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліди проводили на білих статевозрілих щурах ($n=72$) масою 200–220 грам, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Піддослідних тварин поділили на три групи: I – інтактні, II – контрольна група (тварини із травматичним кістковим дефектом), III – тварини із травмою, ліковані сумішшю наноаквахелатів. Тваринам другої та третьої груп за допомогою стоматологічного бору було створено кістковий дефект розміром 2,0 мм в діаметрі у проксимальному відділі великогомілкової кістки. Рану пошарово ушивали, тваринам проводили антибактеріальну та знеболюючу терапію.

Наноаквахелати вводились перорально за допомогою зонду в дозі 1,0 мл одноразово щоденно протягом всього експерименту (1 мл суміші містив 0,02 мг кожного металу).

Тварин декапітували під тіопенталовим наркозом на 3-ю, 7-у, 14-у та 28-у добу після створення експериментального кісткового дефекту.

Утримання тварин та експерименти проводились у відповідності до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

У сироватці крові вивчали наступні біохімічні показники: активність лужної (ЛФ) та кислотної фосфатази (КФ) [5], індекс мінералізації (ЛФ/КФ) [6], вміст кальцію, фосфору (за допомогою стандартних наборів реактивів), вміст оксипроліну [7] і сіалових кислот [8].

Математична обробка отриманих даних проводилась у відділі статистичних досліджень Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського з використанням статистичних прикладних програм Microsoft Excel 2007 і STATISTICA v10. Достовірність отриманих результатів визначали за критерієм Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані біохімічні показники наведені в таблиці 1. Після травматичного пошкодження кістки настає розлад мікроциркуляції, ішемія та некроз прилеглих м'яких тканин, запалення. Очевидно тому на I стадії репаративного остеогенезу (3-я доба дослідження) ми спостерігали гіперкальціємію та гіперфосфатемію. Якщо в інтактних тварин рівень Са та Р були $2,23 \pm 0,13$ ммоль/л та $1,81 \pm 0,1$ ммоль/л відповідно, то у контрольній групі ці показники підвищувались на 56% і на 45%, а у лікованих тварин на 51% і на 24% відповідно (табл. 1). Отримані зміни мікроелементів можна пояснити пошкодженням неорганічного компоненту кісткової тканини та посиленням надходження Са та Р до кров'яного русла. Варто зазначити, що достовірної статистичної різниці показників Са і Р на 3-ю добу дослідження між контрольною групою та лікованими тваринами не було.

Подібні зміни також спостерігались щодо показників активності кислотої та лужної фосфатази. Активність ЛФ у контрольній групі тварин зросла на 46%, а у лікованих тварин – на 50%. Активність кислотої фосфатази у контрольній групі зросла на 75%, у лікованих тварин – на 78%. Дані зміни пояснюються некрозом остеобластів та остеокластів у зоні кісткового дефекту та післятравматичної гематоми. Як і у випадку з вмістом Са та Р, різниця між змінами рівнів ЛФ та КФ у II та III групах на 3-ю добу була статистично недостовірною (табл. 1).

На 3-ю добу відмічали тенденцію до зниження індексу мінералізації у контрольній групі (5,66) та у лікованих тварин (5,49), у порівнянні із інтактними тваринами (6,63), що також підкреслює перевагу катаболічних процесів на даній стадії остеорегенерації.

У цей же термін дослідження також спостерігали різке зростання рівня оксипроліну у сироватці крові: у контрольній групі на 90%, а у лікованих тварин на 99%. Подібні зміни відмічали і щодо вмісту сіалових кислот (підвищення у контролі на

47% та у лікованих – на 44% порівняно з інтактними тваринами. Отримані результати свідчать про наявність запального процесу у місці дефекту кісткової тканини. Як і в попередніх випадках статистичної достовірності між показниками оксипроліну та сіалових кислот між II та III групами не було.

На наступному етапі (7-а доба) спостерігали тенденцію до нормалізації всіх біохімічних маркерів. Згасання запального процесу та катаболічних реакцій проявилось зниженням рівня оксипроліну та сіалових кислот, проте ці показники залишались вищими порівняно із інтактними тваринами: у II (на 54% і 38%) та III групах (на 18% і 15% відповідно). Зниження рівня оксипроліну та СК у групі лікованих тварин на 7-у добу було достовірно нижчим порівняно з контролем (табл. 1). Зниження також було характерним і для ЛФ на даному етапі дослідження. У групі тварин, що отримували наноаквахелати, відмічалось достовірне зниження даних ферментів: КФ на 20% та ЛФ на 25% порівняно із контрольною групою. Очевидно, суміш наноаквахелатів сприяє швидшому загоєнню післяопераційної рани та зменшенню остеорезорбції. Показники індексу мінералізації практично не змінились у порівнянні із 3-ю добою (табл. 1).

На 7-му добу рівень Са у лікованих тварин зріс на 12% відносно контрольної групи тварин. У цей термін експерименту вміст Р в контрольній групі та у групі тварин, що отримували наноаквахелати був практично однаковим $2,30 \pm 0,09$ та $2,2 \pm 0,11$ ммоль/л відповідно.

На 14-у добу експерименту рівень оксипроліну та сіалових кислот у II та III групах повертались до норми, що характеризує завершення запальних процесів у зоні кісткового дефекту (статистичної різниці між групами не виявили). Оцінюючи показники ЛФ та КФ на 14-у добу, варто відмітити, що рівень ЛФ у лікованих тварин був достовірно вищим на 24% ($p < 0,01$), у порівнянні з контрольною групою. Ці зміни можемо пов'язати з підвищенням активності остеобластів, які

Таблиця 1. Біохімічні зміни репарації кісткової тканини при посттравматичному кістковому дефекті у щурів інтактною, контрольною груп, та у тварин, лікованих наночастинками металів

Показники	Інтактні тварини	3-й день		7-й день		14-й день		28-й день	
		Контроль	Ліковані НА	Контроль	Ліковані НА	Контроль	Ліковані НА	Контроль	Ліковані НА
Са (ммоль/л)	$2,2 \pm 0,13$	$3,48 \pm 0,17^{**}$	$3,3 \pm 0,2^{**}$	$3,1 \pm 0,2^{**}$	$3,5 \pm 0,22^{**}$	$2,4 \pm 0,11$	$3,6 \pm 0,19^{****}$	$2,8 \pm 0,11^*$	$3,7 \pm 0,21^{****}$
Р (ммоль/л)	$1,8 \pm 0,1$	$2,62 \pm 0,12^{**}$	$2,5 \pm 0,10^{**}$	$2,3 \pm 0,09^{**}$	$2,2 \pm 0,106^*$	$1,8 \pm 0,12$	$1,5 \pm 0,07^*$	$2,0 \pm 0,14$	$1,7 \pm 0,11$
Активність ЛФ (мкат/л)	$2,6 \pm 1,26$	$3,8 \pm 1,67^{**}$	$3,9 \pm 1,7^{**}$	$3,5 \pm 1,36^{**}$	$2,8 \pm 1,09^{**}$	$2,9 \pm 1,02$	$3,6 \pm 1,45^{****}$	$2,7 \pm 1,2$	$3,47 \pm 1,45^{****}$
Активність КФ (мкат/л)	$0,4 \pm 0,27$	$0,7 \pm 0,45^{**}$	$0,72 \pm 0,31^{**}$	$0,62 \pm 0,40^{**}$	$0,47 \pm 0,23^{**}$	$0,49 \pm 0,30$	$0,39 \pm 0,21^*$	$0,43 \pm 0,34$	$0,42 \pm 0,21$
ІМ	$6,63 \pm 0,37$	$5,66 \pm 0,52$	$5,49 \pm 0,21^*$	$5,87 \pm 0,50$	$6,14 \pm 0,47$	$6,02 \pm 0,39$	$9,58 \pm 0,75^{**}$	$6,5 \pm 0,54$	$8,37 \pm 0,39^{**}$
Акт. оксипроліну (мг/л)	$55,3 \pm 3,9$	$105,19 \pm 5,1^{**}$	$110,0 \pm 5,3^{**}$	$85,1 \pm 6,1^{**}$	$64,9 \pm 3,9^*$	$68,4 \pm 5,7$	$51,2 \pm 2,8^*$	$59,2 \pm 4,5$	$53,2 \pm 3,1$
Вміст СК	$191,2 \pm 6,2$	$280,38 \pm 18,5^{**}$	$276,1 \pm 7,2^{**}$	$263,9 \pm 5,0^{**}$	$219,0 \pm 8,0^{**}$	$209,9 \pm 2,9^*$	$215,4 \pm 5,9^*$	$201,9 \pm 5,0$	$198,3 \pm 3,6$

Примітка: * - показники достовірні у порівнянні із інтактними тваринами ($p < 0,05$); ** - показники достовірні у порівнянні із інтактними тваринами ($p < 0,01$); * - показники достовірні у порівнянні із контрольною групою ($p < 0,05$); ** - показники достовірні у порівнянні із контрольною групою ($p < 0,01$).

містять даний фермент. Що стосується рівня КФ, то даний фермент був достовірно нижчим на 22% ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем. Дані зміни ферментів, безумовно, відобразились на величині індексу мінералізації. У тварин, що отримували наноаквахелати, виявлено зростання даного показника на 59% ($p < 0,01$). По змінах ЛФ, КФ та ІМ на 14-у добу можна прийти до висновку, що застосування наноаквахелатів сприяло стимуляції остеогенезу за рахунок підсилення остеорегенерації та послаблення остеорезорбції.

Відмічали подальше лінійне зростання рівня Са на 14-у (+163%) та 28-у (+168%) добу у групі лікованих тварин, порівняно з інтактними тваринами. Дані зміни були статистично достовірними у порівнянні і з контрольною групою (табл. 1). Отримані результати свідчать про те, що Са накопичувався в організмі тварин за рахунок щоденного перорального введення даного мікроелементу у вигляді наночастинок. Натомість рівень Р на 14-у та 28-у добу статистично не різнилися між контрольною та лікованою групами.

Показник кислоти фосфатази на 28-му добу у контрольній групі та групі лікованих тварин статистично не різнився. Варто відмітити, що ці показники також статистично не різнилися у порівнянні з інтактними тваринами, що характеризує відсутність остеорезорбтивних явищ (табл. 1).

Рівень ЛФ достовірно зростав у тварин, що отримували наноаквахелати і на 28-у добу у порівнянні з контролем (+28,47%, $p < 0,01$), що вказує на початок мінералізації кісткової мозолі.

При аналізі показників оксипроліну та сіалових кислот на 28-у добу експерименту відмічали нормалізацію даних величин до рівня інтактних тварин, достовірних змін між якими не було.

ВИСНОВОК

Застосування наноаквахелатів Са, Сu, Со, Zn, Mg, Fe призводить до стимуляції посттравматичного остеогенезу, про що свідчить часткова нормалізація показників активності ЛФ та КФ, і вмісту Са, сіалових кислот, оксипроліну в сироватці крові тварин з кістковим дефектом при такій корекції.

Перспективним є подальше вивчення впливу наноаквахелатів металів на репарацію кісткової тканини при переломах, у тому числі дослідження рентгенологічної та морфологічної динаміки формування кісткової мозолі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Augat P. Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone / Augat P., Simon U., Liedert A., [et al.]. / Osteoporos. – 2005. – № 16 (Suppl 2). – P. 36–S43.

2. Zhao-Gui Zhang. Advances in bone repair with nanobiomaterials: mini-review / Zhao-Gui Zhang, Zhi-Hong Li, Xin-Zhan Mao., [et al.]. / Cytotechnology. – 2011. – № 63. – P. 437-443.
3. Нанотехнологія у ветеринарній медицині / [В.Б. Борисевич, Б.В. Борисевич, В.Г. Каплуненко та ін.]. – Київ: Поліграфцентр «Ліра», 2009. – 232 с.
4. Борисевич В.Б. Наноматериали и нанотехнологии в ветеринарной практике [Текст] / В.Б. Борисевич, В.Г. Каплуненко, Н.В. Косинов и др. // Учебное и практическое пособие. – К.: Авицена, 2012. – С. 267.
5. Левицький А.П. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: Метод. рекомендации / А.П. Левицький, О.А. Макаренко, О.В. Деньга та др. – К.: ГФЦ, 2005. – 30с.
6. Ферментативний метод оцінки стану кісткової тканини / А.П. Левицький, О.А. Макаренко, І.В. Ходаков та ін. / Одеський мед. журнал. – 2006. – № 3. – С. 17-21.
7. Тетянец С. С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови // Лаб. дело. — 1985. — № 1. — С. 61-62.
8. Колб В. Г. Клиническая биохимия / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск: Ураджай, 1976. – 145 с.

Панасюк Я. В., Корда М. М.

Биохимическая характеристика посттравматического репаративного остеогенеза при применении наноаквахелатов металлов

Проблема восстановления костной ткани после травмы в наше время является важной и актуальной. В работе исследована динамика биохимических показателей остеодеструкции и остеорегенерации у экспериментальных животных с травматическим костным дефектом при пероральном применении наноаквахелатив Са, Сu, Со, Zn, Mg, Fe. Результаты показали положительный стимулирующее влияние смеси наноаквахелатив на процессы остеорегенерации. В частности, под влиянием предложенного метода коррекции достоверно улучшились показатели кальция, оксипролина, сиаловых кислот, активности щелочной и кислой фосфатазы, индекса минерализации. Полученные данные требуют дальнейшего изучения возможности применения наноаквахелатив для стимуляции репаративной остеорегенерации.
Ключевые слова: посттравматическая остеорегенерация, остеогенез, наноаквахелаты.

Y. Panasiuk, M. Korda

The biochemical characteristic of posttraumatic reparative osteogenesis in the nanoaquachelates metals application

The problem of bone regeneration after trauma in our time is very important and actual. We have studied the dynamics of biochemical parameters of osteodestruction and osteoregeneration in experimental animals with traumatic bone defects upon oral administration of Ca, Cu, Co, Zn, Mg, and Fe nanoaquachelates. The results showed a positive stimulating effect of nanoaquachelates mixture on the osteoregeneration processes. In particular, the proposed correction method partially improved the serum levels of calcium, hydroxyproline, sialic acids, as well as the activity of alkaline and acid phosphatase, and mineralization index in animals with trauma. The obtained data anticipate the need of further research of the possibility of nanoaquachelates using for reparative osteoregeneration stimulation.

Keywords: post-traumatic osteoregeneration, osteogenesis, nanoaquachelates.