

Метаболические нарушения соединительной ткани экспериментальных животных с моделью сахарного диабета в сочетании с травмой длинных костей

А.М.Магомедов, А.В.Ивченко, В.Л.Орленко, Т.А.Кузуб

Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины, ГУ «Луганский государственный медицинский университет»
Киев, Луганск, Украина

Проведен эксперимент на 40 крысах разных возрастных групп для изучения метаболических нарушений соединительной ткани. Исследовалась активность коллагеназы, содержание свободной фракции гидроксипролина, белковосвязанного гидроксипролина, гликозаминогликанов, активность щелочной фосфатазы. При нарушении целостности длинных костей у животных с сахарным диабетом наблюдаются метаболические изменения органических компонентов костной ткани. Степень (глубина) биохимических нарушений определяется наличием сахарного диабета.

Ключевые слова: сахарный диабет, дефект большеберцовой кости, метаболические нарушения.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) сегодня – это одна из ведущих медико-социальных проблем. Миллионы людей во всех странах страдают этим заболеванием. СД занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. По разным данным в мире насчитывается от 120 до 180 млн больных с данной патологией, что составляет 2-3% от всего населения планеты [2, 3].

При СД возникают нарушения, приводящие к функциональным и структурным изменениям жизненно важных органов и систем, что проявляется прежде всего отклонениями в состоянии сердечно-сосудистой, иммунной, опорно-двигательной системах. В последней они сопровождаются расстройствами регенераторных возможностей: замедлением консо-

лидации костных отломков, формированием ложных суставов, а при операциях – гнойными осложнениями, длительным незаживлением операционной раны [1]. Некоторые из этих нарушений обусловлены тем, что СД замедляет пролиферацию и дифференцировку остеогенных клеток, а также формирование костной ткани (КТ) при переломах [13].

Изменения в динамическом равновесии метаболизма любого из компонентов КТ приводят к деградации фибрилл коллагеновых волокон (вследствие разрушения поперечных внутри- и межмолекулярных связей в полипептидных цепях тропоколлагена), разрыву в цепях тропоколлагена и аномальным изменениям в структуре коллагеновых белков. Нарушения баланса между синтезом и распадом в метаболизме основного вещества составляют биохимическую основу патогенеза многих заболеваний КТ [8, 9, 12].

Основная роль длинных костей как компонентов опорно-двигательной системы, которые принимают на себя основные рычажные механические нагрузки при движении, обеспечивается их свойствами, такими как прочность, упругость и эластичность. Эти свойства определяются химическим составом и структурой компонентов КТ.

Устойчивое структурно-функциональное состояние КТ обеспечивается за счет гомеостатического постоянства соотношений концентраций гликозаминогликанов, коллагена и гиалуриновой кислоты (разновидность ГАГ). Стойкие изменения концентраций этих и других компонентов в биологических жидкостях адекватно отражают состояние КТ в конкретный период ее жизнедеятельности. Все это свидетельствует о необходимости изучения основных компонентов КТ в норме и патологии у больных с СД.

ТАБЛИЦА 1

Биохимические показатели сыворотки крови половозрелых крыс

Группы	Показатели				
	Коллагеназа, мкмоль/л·г	Фракции ГП, мкмоль/л		ГАГ, г/л	ЩФ, мккат/л
		свободная	б/связанная		
1	1,57±0,04	11,50±0,20	10,18±0,20	0,056±0,002	6,06±0,10
2	1,82±0,07	13,49±0,10	11,95±0,25	0,066±0,001	7,10±0,24
3	1,88±0,06	13,21±0,26	11,92±0,08	0,068±0,002	7,67±0,20
4	1,99±0,06	13,99±0,10	8,07±0,10	0,072±0,002	8,62±0,28
Норма	1,52±0,16	11,63±0,20	10,14±0,55	0,057±0,003	6,03±0,40

Цель исследования было изучить структурно-функциональное состояние КТ при повреждении длинных костей у экспериментальных животных с моделью СД на основе исследования метаболических нарушений в основных органических компонентах КТ.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи: изучить активность ключевого фермента в метаболизме КТ — коллагеназы; определить содержание свободной фракции гидроксипролина (ГП) (биохимический маркер резорбции КТ); определить содержание белковосвязанного ГП (биохимический маркер синтеза коллагена) в сыворотке крови; определить содержание гликозаминогликанов (ГАГ); изучить активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проведены на 40 крысах (самцах). Животные распределены на две возрастные группы — половозрелые и периода старческих изменений. Начальная масса половозрелых крыс — 170 г.

Для инициации СД крысам вводили стрептозотонин (2-дезоксиметил-нитрозомочевина-глюкозопираноза). Стрептозотонин (SIGMA Chemical, США) вводили однократно внутривентриально в дозе 50-55 мг/кг, растворенный в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН=4,5), непосредственно перед самым моментом введения.

На 17-й день с начала эксперимента проведена операция по нанесению дефекта большеберцовой кости (ББК). Моделирование костного дефекта в области проксимального метаэпифиза ББК лабораторных крыс, при сохранении функциональной нагрузки на конечность, осуществляли по методике В.И.Лузина и соавт. [7].

Возрастные группы крыс разделены на четыре группы по 5 животных в каждой: 1 (контрольную) группу составили интактные животные; 2 группу — крысы с дефектом костной ткани в ББК, 3 группу — животные с СД, 4 группу — крысы с СД и дефектом ББК.

Работу с животными проводили в соответствии с положением «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», утвержденных — Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и международным требованиям Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях [10].

Крыс помещали в клетки соответственно группам и содержали в условиях вивария. Содержание и кормление животных производили соответственно «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 06.04.1973 г. и дополнениями от 04.12.1978 г. к Приказу МЗ СРСР №163 от 10.03.1966 г. «О суточных нормах кормления животных и процедур» [6].

Достоверного расхождения в темпах прироста массы тела животных всех подопытных групп на протяжении всего периода наблюдения не отмечалось.

Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом через 7, 15, 30, 60 и 90 суток после операции. Кровь в количестве 3 мл забирали у крыс во время вывода из эксперимента, непосредственно после одномоментной декапитации. Забор проводили в пробирки с места раневой поверхности, которая возникала после декапитации, с помощью лейки.

В сыворотке крови экспериментальных животных определяли: фракции ГП по методу Frey [11], содержание ГП (мкмоль/л) в них по Stegemann [14], активность коллагеназы (мкмоль/л*ч) по Lindy [12]. В качестве суб-

ТАБЛИЦА 2

Биохимические показатели сыворотки крови крыс периода старческих изменений

Группы	Показатели				
	Коллагеназа, мкмоль/л·г	Фракции ГП, мкмоль/л		ГАГ, г/л	ЩФ, мккат/л
		свободная	б/связанная		
1	1,57±0,06	11,51±0,15	10,28±0,21	0,056±0,001	6,14±0,10
2	1,85±0,11	11,83±0,10	11,17±0,27	0,064±0,001	6,55±0,10
3	1,98±0,05	14,32±0,20	8,13±0,14	0,072±0,002	6,85±0,20
4	2,12±0,10	15,00±0,15	7,24±0,16	0,075±0,002	10,00±0,29
Норма	1,52±0,16	11,63±0,20	10,14±0,55	0,057±0,003	6,03±0,40

страта использовали коллаген производства фирмы Sigma.

Суммарное содержание ГАГ (г/л) определяли по С.А.Кляцкину и Р.И.Лифшиц [5].

Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови проводили по методу А.Бодански [4] с использованием набора реактивов фирмы «Ольвекс» (г. Санкт-Петербург, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ биохимических показателей, которые отражают состояние метаболизма основных органических компонентов КТ у половозрелых животных, выявил, что активность коллагеназы достигает 120% по отношению к показателям интактных животных у крыс 2 группы, у животных 3 группы – 126%, а у животных 4 группы возрастает до 131% (табл. 1).

Аналогичные изменения наблюдали и в содержании свободной фракции ГП. Но при этом необходимо отметить, что у животных 4 группы концентрация этой фракции была самой высокой среди всех наблюдаемых групп половозрелых животных. В те же сроки наблюдения содержание белковосвязанного ГП остается в пределах нормы с тенденцией к повышению, а в 4 группе животных снижено до 79%. Содержание ГАГ в сыворотке крови во всех группах животных возрастает, особенно в 4 группе, достигая 126% по отношению к норме (табл. 1).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что глубина метаболических нарушений зависит не столько от возраста и травмы, сколько от наличия основного заболевания – СД. По всей вероятности, СД приводит к дисбалансу синтеза и резорбции основных органических компонентов КТ, таких как коллаген и протеогликаны. Об этом свидетель-

ствуют показатели, отражающие синтез и резорбцию коллагена и ГАГ.

Исследование активности ЩФ выявило, что в контрольной группе животных ее активность находится в пределах нормы, а у животных 2 группы несколько возрастает, достигая 118% по отношению к норме. У животных 3 группы рост активности составил 127%. Наиболее высокий рост активности ЩФ наблюдается у животных 4 группы – 143% (табл. 1).

Анализ биохимических показателей, полученных при исследовании сыворотки крови животных периода старческих изменений, выявил, что в контрольной группе активность коллагеназы остается на уровне физиологической нормы, а у животных 2 группы она возрастает до 122%. При этом активность этого фермента увеличивается до 130% у животных 3 группы и до 139% у животных 4 группы, а в абсолютных показателях – 2,12±0,10 мкмоль/л·ч (норма 1,52±0,16 мкмоль/л·ч) (табл. 2).

При сравнительном анализе активности ключевого фермента в катаболической фазе метаболизма основного белка КТ – коллагена – выявили, что у животных периода старческих изменений СД способствует повышению активности этого фермента. Особенно это проявилось у животных 4 группы.

Наряду с повышением активности фермента коллагеназы, возрастает концентрация биохимического маркера распада белка коллагена – свободной фракции ГП. Если у животных 2 группы содержание этой аминокислоты составило 102% по отношению к норме, то у животных 3 группы – 123%, а у животных 4 группы – 129%. При этом концентрация белковосвязанного ГП составила у животных 2 группы 110% по отношению к норме, а в абсолютных цифрах – 11,17±0,27 мкмоль/л (при норме 10,14±0,55 мкмоль/л). У животных 3 группы концентрация этой аминокислоты снижена до 80%, а у 4 группы – до 71% от нормы (табл. 2).

Аналогичные изменения наблюдали и в содержании ГАГ у всех групп животных. При этом необходимо отметить, что у животных 4 группы содержание ГАГ превышало норму, характерную для интактных животных, более чем в 1,6 раза (табл. 2).

Таким образом, можно утверждать, что травма приводит не столько к метаболическим нарушениям, сколько способствует этим изменениям наличие заболевания СД у экспериментальных животных. Это подтверждается биохимическими показателями, отражающими состояние метаболических изменений у животных периода старческих изменений.

Активность ЩФ, отражающая остеобластическую активность, у крыс контрольной группы периода старческих изменений находится в пределах физиологической нормы. У животных 2 группы этот показатель несколько возрастает, достигая 109% по отношению к норме, а у животных 3 группы активность ее возрастает до 113%. Наиболее высокая активность ЩФ наблюдается у животных 4 группы — 166% (табл. 2).

Анализируя полученные данные по активности ЩФ, можно предположить, что наиболее важное значение в изменении активности этого фермента имеет наличие СД у экспериментальных животных. Об этом свидетельствуют показатели активности изучаемого фермента как у половозрелых крыс, так и у крыс периода старческих изменений. При этом необходимо отметить, что нанесение дефекта КТ ткани также способствует возрастанию активности этого фермента.

Таким образом, на активность ЩФ, одного из важных ферментов в метаболизме КТ, существенное влияние оказывает наличие СД у экспериментальных животных.

Из представленных данных видно, что во всех наблюдаемых группах имелись нарушения в обмене межклеточного вещества ГАГ и в основном белке костно-хрящевой ткани — коллагене.

Полученные биохимические показатели при исследовании сыворотки крови крыс свидетельствуют о том, что наибольшее влияние на метаболические нарушения оказывает наличие у экспериментальных животных СД. Подтверждением этого является сравнение биохимических показателей у животных различных возрастных групп. Это свидетельствует о том, что степень метаболических нарушений в органической основе КТ определяет не столько нарушение целостности кости или возраст животных, а наличие СД.

Это подтверждается как показателями активности ферментов, участвующих в метаболизме основного белка КТ, так и биохимическими маркерами синтеза и распада этого белка. Аналогичные изменения получены нами и при исследовании ГАГ, которые определяют физиологические и биомеханические свойства КТ у экспериментальных животных.

ВЫВОДЫ

1. При нарушении целостности длинных костей у животных с сахарным диабетом наблюдаются метаболические изменения органических компонентов костной ткани.
2. Степень (глубина) биохимических нарушений определяется наличием сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аствацатурян А.А. Опыт лечения переломов у больных сахарным диабетом / А.А.Аствацатурян, П.А.Вартапетян, О.З.Оганесян [и др.] // Ортопедия, травматология и протезирование. — 1985. — №8. — С. 15-18.
2. Гурьева И.В. Синдром диабетической стопы / И.В.Гурьева, И.В.Кузина, А.В.Воронин [и др.] / Методические рекомендации. — Москва, 2000. — 26 с.
3. Ефимов А.С. Сахарный диабет: проблемы наших дней / А.С.Ефимов, Ю.В.Ткачук, А.В.Щербак. — К.: Наука, 1993. — 120 с.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С.Камышников. — М.: МЕДпресс-информ, 2004. — С. 352-359.
5. Кляцкин С.А. Методика определения гликозаминогликанов орцеиновым методом в крови больных / С.А.Кляцкин, Р.И.Лифшиц // Лабораторное дело. — 1989. — №10. — С. 51-53.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 293 с.
7. Лузин В.И. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В.И.Лузин, Д.В.Ивченко, А.А.Панкратьев [и др.] // Український медичний альманах. — 2005. — №2 (додаток). — С. 162.
8. Лябах А.П. Облитерирующие ангиопатии и расстройства трофики стопы / А.П.Лябах. — К.: Стилюс, 2010. — 164 с.
9. Магомедов С. Рівень глікозаміногліканів у сироватці крові та сечі хворих на цукровий діабет / С.Магомедов, В.Л.Орленко, В.С.Ефимов // Проблеми остеології. — 2002. — Т.5. — №1. — С. 24-26.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Council of Europe. — Strasburg, 1986. — №123. — 52 p.
11. Frey S. Etude d'une methode d'exploration et du taux normal de l'hydroxproline du serum / S.Frey // Biochem., Biophys. — 1965. — Vol. 3. — №2. — P. 446-450.

12. Lindy S. Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue / S.Lindy, J.Halme // Clin. Chim. Acta. — 1973. — Vol. 47. — №2. — P. 153-157.
13. Macey L.R. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes / L.R.Macey, S.M.Kana, S.Jingushi [et al.] // J. Bone Joint. Surg. Am. — 1989. — №71 (5). — P. 722-733.
14. Stegemann H.J. A simple procedure for the determination of hydroxyproline in urine and bone / H.J.Stegemann // Biochem. Med. — 1952. — Vol. 3. — №1. — P. 23-30.

О.М.Магомедов, А.В.Івченко, В.Л.Орленко, Т.А.Кузуб. *Метаболічні порушення сполучної тканини експериментальних тварин із моделлю цукрового діабету в поєднанні з травмою довгих кісток. Київ, Луганськ, Україна.*

Ключові слова: цукровий діабет, дефект великогомілкової кістки, метаболічні порушення.

Проведений експеримент на 40 щурах різних вікових груп для вивчення метаболічних порушень сполучної тканини. Досліджувалась активність колагенази, вміст вільної фракції гідроксипроліну, білковозв'язаного гідроксипроліну, глікозамі-

ногліканів, активність лужної фосфатази. При порушенні цілісності довгих кісток у тварин із цукровим діабетом спостерігаються метаболічні зміни органічних компонентів кісткової тканини. Ступінь (глибина) біохімічних порушень визначається наявністю цукрового діабету.

А.М.Магомедов, А.В.Івченко, В.Л.Орленко, Т.А.Кузуб. *Metabolic disorders of connective tissue in experimental animals with modeled diabetes mellitus in combination with long extremities trauma. Kyiv, Lugansk, Ukraine.*

Key words: diabetes mellitus, skin bone lesion, metabolic disorders.

A trial has been performed on 40 rats of different age to study metabolic disorders of connective tissue. We studied collagenase activity, hydroxyproline free fraction, protein-bind hydroxyproline, glycosoaminoglycans contents, alkaline phosphatase activity. Metabolic changes of bony tissue organic components are observed at disturbance of long bones unity in animals. Degree (depth) of biochemical disorders is determined when diabetes mellitus is present.

Надійшла до редакції 30.11.2011 р.