

© Леонтьева Ф. С., Шевцов Б. Н., Лу Чжоу

УДК 591.48: 616-089.819.843:577

Леонтьева Ф. С., <sup>1</sup>Шевцов Б. Н., <sup>2</sup>Лу Чжоу

## ВЛИЯНИЕ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС КРЫС УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩЕГО БИОМАТЕРИАЛА, ИМПЛАНТИРОВАННОГО В ДЕФЕКТ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

<sup>1</sup>ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. профессора

М. И. Ситенко НАМН Украины (г. Харьков)

<sup>2</sup>Харьковская медицинская академия последипломного образования (г. Харьков)

boshekh@mail.ru

В работе использованы материалы экспериментального раздела НИР «Розробити нові і удосконалити існуючі методики алокомполітного ендпротезування при лікуванні хворих з пухлинами довгих кісток» (№ государственной регистрации 0114U 003018).

**Вступление.** В настоящее время сохраняется тенденция увеличения числа пациентов, которым необходимы реконструктивно-восстановительные оперативные вмешательства на скелете. Данные операции требуют наличия высококачественных и безвредных биоматериалов для заполнения костных дефектов. Наиболее широко стали применяться биоактивные керамики, что обусловлено их уникальными свойствами – биосовместимостью, остеоиндукцией и остеоиндуцией. Достоинства и недостатки кальций-фосфатных материалов на сегодняшний день достаточно подробно изучены и представлены в ряде исследований [3,6,8,10].

Получение необходимых для замещения массивных костных дефектов количеств аутотрансплантатов, являющихся своего рода стандартом биоимплантации, не представляется возможным. Поэтому поиск новых биоматериалов, которые могли бы составить конкуренцию аутотрансплантатам, продолжается и в настоящее время [2,6,9].

Предлагаемые к применению в качестве имплантатов новые синтетические и неорганические материалы нуждаются в тестировании на безвредность и нетоксичность. В комплексном исследовании данных качеств испытуемых биоимплантатов ведущее место занимает изучение влияния на биохимические показатели.

**Цель работы** – изучить влияние имплантации в кость плотного или войлокоподобного углерода на белковообразующую и дезинтоксикационную функцию печени, на функциональное состояние почек, а также оценить влияние данных материалов на регенерацию костной ткани.

**Объект и методы исследования.** Экспериментальное исследование было проведено на 68 белых крысах обоего пола массой 210-250 г популяции экспериментально-биологической клиники Государственного учреждения «Институт патологии позвоночника и суставов имени профессора М.И. Ситенко НАМН Украины», г. Харьков. 60 крысам опе-

ративным путем произведен дырчатый дефект верхней трети бедренной кости. Из них 20 крыс служили в качестве контрольной группы и дефекты в кости заживали как обычно после переломов. 20-ти крысам в дефект вводили плотный углеродсодержащий биоимплантат. 20-ти животным в костный дефект установили «войлокоподобный» углеродсодержащий материал. 8 крыс составили интактную группу и с ними не производили никаких манипуляций.

Выведение животных контрольной и опытных групп из эксперимента производили на 3, 14, 28 и 45 сутки после установки имплантата. Забор крови осуществлялся в сухие центрифужные пробирки и доставлялся в биохимическую лабораторию.

Уход и все манипуляции с животными проводились в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasburg, 1986).

Для выполнения задачи по оценке метаболического статуса крыс с замещенными углеродсодержащим материалом дефектами бедренной кости был определен комплекс биохимических показателей, отражающих наличие или отсутствие у вводимого в кость углеродсодержащего имплантата гепатотоксического и нефротоксического действия и характер его влияния на процесс регенерации кости. В него вошли следующие показатели сыворотки крови: содержания общего белка, гликопротеинов, гаптоглобина, холестерина, концентраций мочевины и креатинина, активности ферментов щелочной фосфатазы (ЩФ) и аминоксифераз, уровня хондроитинсульфатов, протеинограмма сыворотки крови.

Содержание общего белка сыворотки крови определяли биуретовым методом [5]. Протеинограмму сыворотки крови исследовали нефелометрическим методом с использованием наборов фосфатных буферов НПО «Фелисит-Диагностика» (г. Днепропетровск, Украина) и последующим фотометрированием [5].

Уровень содержания гаптоглобина служит весьма важным показателем выраженности острого воспалительного процесса. Данный показатель определяли по реакции с риванолом с помощью

Таблиця 1.

**Биохимические показатели сыворотки крови крыс, отражающие токсическое влияние имплантированных в дефект кости углеродных биоматериалов различной структуры**

Группы животных	Сроки после операции, сутки	Общий белок, г/л	Холестерин, ммоль/л	Трансаминазы, Е/л		Мочевина, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л
				АлАТ	АсАТ		
Интактные крысы, n=8		70,05±3,15	2,5±0,31	21,5±2,4	30,2±2,1	3,87±0,27	78,07±3,05
Контроль n = 20	3	72,16±2,55	2,26±0,23	22,5±2,3	32,7±2,0	4,76±0,5	71,0±5,51
	14	69,84±1,14	2,22±0,20	22,8±2,7	38,7±2,1	5,4±0,53	68,4±2,53
	28	66,82±1,46	2,25±0,21	21,2±1,6	35,3±2,2	3,6±0,11	81,0±3,10
	45	70,70±2,69	2,62±0,15	25,2±1,9	38,7±1,0	4,96±0,2	81,4±3,76
С войлоко-подобным углеродом в дефекте кости, n = 20	3	69,92±2,80	2,45±0,15	19,9±1,5	38,0±0,9	4,17±0,21	85,25±4,5
	14	69,57±1,64	2,18±0,23	26,1±3,6	40,1±1,1	4,52±0,5	75,06±4,8
	28	69,38±2,81	2,70±0,32	22,0±2,2	36,5±1,0	4,48±0,3	75,4±4,16
	45	68,12±2,10	2,68±0,14	25,4±1,6	32,5±1,2	5,02±0,4	80,2±4,14
С плотным углеродом в дефекте кости, n = 20	3	69,13±3,04	2,05±0,08	20,6±1,5	36,4±2,0	3,68±0,1	80,34±3,1
	14	72,44±3,44	2,36±0,23	22,3±2,5	29,8±2,2	5,04±0,5	66,2±2,44
	28	69,64±2,77	2,62±0,34	25,5±2,0	38,2±1,1	4,9±0,45	82,2±4,07
	45	70,70±1,88	2,38±0,23	24,5±1,6	35,7±1,0	5,46±0,5	78,4±5,45

диагностических наборов ПрАТ «Реагент» (г. Днепрпетровск, Украина) [4].

Для оценки функционального состояния печени исследована динамика активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Степень их активности изучалась кинетическим методом с использованием диагностических наборов фирмы Lachema (Брно, Чехия) [7].

Для оценки интенсивности созревания костного регенерата изучали показатели, характеризующие обмен гетерополисахаридов по уровню хондроитинсульфатов в сыворотке крови в реакции ее помутнения с риванолом [1]. Нами изучена кинетика суммарных хондроитинсульфатов сыворотки крови крыс.

**Результаты исследований и их обсуждение.**

Как свидетельствуют данные, представленные в **таблице 1**, числовые значения биохимических показателей состояния функций печени (активность аминотрансфераз и содержание общего белка и холестерина в сыворотке крови) у животных как контрольной, так и обеих опытных групп на различные сроки после операции не имели между собой достоверных отличий. Так же и величины показателей азотистого обмена (уровни мочевины и креатинина в крови) у животных этих групп на указанные сроки между собой достоверно не отличались.

Значения перечисленных показателей сыворотки крови крыс контрольной и опытных групп не имели достоверных различий с их величинами у интактных животных.

Среди изучаемых показателей белковосинтетической функции печени, в то же время также характеризующих выраженность острого воспаления, в ходе эксперимента наибольшим колебаниям подверглись отдельные глобулиновые фракции сыворотки крови. Данные определений их концентраций представлены в **таблице 2**. Так, уровни  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов у контрольных животных были достоверно повышенными в ранние сроки после операции по сравнению с их величинами на отдаленный период после нее (от 28 суток и более) и выше, чем у ин-

тактных крыс. Содержание этих белковых фракций у опытных животных также было достоверно выше на ранние сроки после операции. Однако, у крыс с имплантированным в кость углеродным наполнителем выход концентрации этих белков на уровень интактной группы происходил на более ранние сроки (от 14 дней), чем у контрольных крыс.

Таким образом, представленная в **таблице 1 и 2** кинетика показателей метаболизма в печени и почках указывает на отсутствие у крыс опытных групп с испытуемым заполняющим дефект кости углеродным материалом признаков общетоксического, гепатотоксического и нефротоксического действия. Кинетика  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ - глобулиновых фракций, синтезирующихся в печени и содержащих белки «острой фазы», свидетельствовала о благоприятном и модулирующем влиянии имплантатов на отдельные механизмы регуляции острой воспалительной реакции, способствующем благоприятному и ускоренному ее редуцированию.

В **таблице 3** содержатся значения биохимических показателей сыворотки крови экспериментальных животных, отражающие активность острой воспалительной реакции в тканях, затронутых оперативным вмешательством, и активность регенераторного процесса в костной ткани.

Как видно из данных, содержащихся в **таблице 3**, в послеоперационный период в сыворотке крови крыс наиболее изменчивыми были следующие показатели: содержание гликопротеинов и гаптоглобина, уровень содержания хондроитинсульфатов и активность фермента щелочной фосфатазы.

Содержание гликопротеинов у животных контрольной группы было достоверно более высоким в период от 3 суток и до 28 суток после оперативного вмешательства, чем на более отдаленные сроки, что наиболее вероятно связано с острой воспалительной реакцией в операционной ране и прилегающих тканях. Числовое значение этого показателя в сыворотке крыс обеих опытных групп было также достоверно выше в ранний период и до 14 суток после операции (что также

Таблица 2.

**Содержание белковых фракций сыворотки крови крыс с имплантированным в кость углеродным материалом**

Группы, сроки после операции		Альбумины, %	Глобулины, %			
			$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
Интактные крысы, n = 8		46,41 ± 1,06	8,81 ± 1,06	9,74 ± 0,91	19,53 ± 1,12	14,6 ± 0,72
Контроль n = 20	3 сутки п/о	42,56 ± 0,7	12,26 ± 0,71,2)	12,42 ± 0,41,2)	20,26 ± 0,7	13,5 ± 0,45
	14 сутки п/о	43,37 ± 1,8	12,5 ± 0,51)	12,7 ± 0,91,2)	19,62 ± 0,6	12,46 ± 1,1
	28 сутки п/о	45,16 ± 2,3	12,52 ± 0,7	11,88 ± 0,6	17,8 ± 0,81	12,6 ± 0,64
	45 сутки п/о	46,54 ± 3,2	9,76 ± 0,37	9,4 ± 0,72	19,46 ± 1,6	14,8 ± 1,03
С войлоко- подобным углеродом в дефекте кости, n = 20	3 сутки п/о	44,23 ± 1,4	11,53 ± 0,71,2)	13,38 ± 0,81,2)	17,8 ± 0,88	12,73 ± 0,6
	14 сутки п/о	46,81 ± 1,9	9,91 ± 0,62	10,59 ± 0,6	18,79 ± 1,2	12,92 ± 0,7
	28 сутки п/о	47,3 ± 2,07	9,70 ± 1,13	11,55 ± 1,4	17,75 ± 1,2	13,65 ± 0,6
	45 сутки п/о	45,68 ± 0,9	9,45 ± 0,6	10,3 ± 0,82	20,2 ± 1,47	14,43 ± 1,2
С плотным углеродом в дефекте кости, n = 20	3 сутки п/о	41,12 ± 2,2	12,96 ± 1,31,2)	15,64 ± 1,51,2)	17,40 ± 1,3	13,9 ± 1,22
	14 сутки п/о	41,76 ± 3,0	12,35 ± 1,1	11,35 ± 1,1	18,73 ± 1,3	11,98 ± 0,7
	28 сутки п/о	42,3 ± 1,68	10,84 ± 0,6	12,84 ± 0,8	17,56 ± 1,1	15,42 ± 0,8
	45 сутки п/о	44,28 ± 2,1	9,48 ± 0,35	10,8 ± 0,82	20,52 ± 1,0	15,3 ± 1,32

**Примечание:**

- 1) P < 0,05 по сравнению с интактной группой животных,
- 2) P < 0,05 по сравнению со сроком 28 и 45 суток после операции.

обусловлено острым воспалением), чем на более поздние сроки, т. е. снижение содержания гликопротеинов в опытных группах и выравнивание с его величинами у интактных животных наступало раньше, чем у контрольной группы.

Уровень содержания белка «острой фазы» гаптоглобина у контрольных крыс отмечался более высокими цифрами в период с момента операции и до 2-х недель после нее, чем на более поздние сроки. У животных обеих опытных групп данный показатель был достоверно больше в ранний период после операции (3 суток), после чего происходило снижение его значений до уровня интактных животных (т. е.

так же как и у гликопротеинов сближение с цифрами у последних наблюдалось раньше, чем у контрольных крыс).

В контрольной группе крыс активность щелочной фосфатазы отмечалась достоверно выше в период от 3 суток со времени операции и до 28 суток, чем на более поздние сроки. В дальнейшем происходило снижение активности фермента и на 45 сутки после операции зафиксировано его выравнивание с величиной активности ЩФ в группе интактных животных. Кинетика колебаний активности щелочной фосфатазы у опытных животных была аналогичной изменениям содержания в их сыворотке гликопротеи-

Таблица 3.

**Биохимические показатели у крыс, отражающие активность воспалительной реакции и регенерации костной ткани**

Группы, сроки после операции		Гликопротеины, г/л.	Гаптоглобин, г/л	Щелочная фосфатаза, Е/л	Хондроитин-сульфаты, г/л
Интактные крысы		0,70 ± 0,068	0,62 ± 0,05	230,44 ± 17,10	0,240 ± 0,028
Контроль	3 сутки п/о	0,98 ± 0,061,2)	1,04 ± 0,071,2)	401,4 ± 12,611,2)	0,366 ± 0,021,2)
	14 сутки п/о	1,11 ± 0,051,2)	1,01 ± 0,061,2)	492,8 ± 16,431,2)	0,353 ± 0,031,2)
	28 сутки п/о	0,95 ± 0,051,2)	0,86 ± 0,07	396,62 ± 12,511,2)	0,364 ± 0,0121,2)
	45 сутки п/о	0,81 ± 0,03	0,80 ± 0,07	247,2 ± 21,39	0,280 ± 0,02
С войлоко- коподобным углеродом в дефекте кости	3 сутки п/о	0,94 ± 0,051,2)	1,03 ± 0,071,2)	379,2 ± 22,251,2)	0,385 ± 0,011,2)
	14 сутки п/о	1,02 ± 0,051,2)	0,84 ± 0,05	476,0 ± 35,371,2)	0,418 ± 0,051,2)
	28 сутки п/о	0,83 ± 0,08	0,74 ± 0,06	283,0 ± 15,38	0,314 ± 0,03
	45 сутки п/о	0,82 ± 0,02	0,71 ± 0,08	278,4 ± 24,14	0,273 ± 0,025
С плотным углеродом в дефекте кости	3 сутки п/о	0,92 ± 0,041,2)	1,02 ± 0,081,2)	385,21 ± 27,311,2)	0,342 ± 0,021,2)
	14 сутки п/о	0,97 ± 0,031,2)	0,86 ± 0,07	497,60 ± 50,641,2)	0,354 ± 0,031,2)
	28 сутки п/о	0,82 ± 0,06	0,76 ± 0,08	284,42 ± 12,26	0,326 ± 0,03
	45 сутки п/о	0,68 ± 0,03	0,66 ± 0,06	270,50 ± 18,15	0,262 ± 0,014

**Примечание:**

- 1) P < 0,05 по сравнению со сроками 28 и 45 суток после операции
- 2) P < 0,05 по сравнению с интактной группой животных.

нов. Таким образом, картина изменений активности щелочной фосфатазы показала, что у животных с имплантированным углеродом данный показатель нормализовался раньше, чем у крыс контрольной группы.

Из показателей гликозаминогликанов наиболее динамичной была величина содержания в сыворотке крови хондроитинсульфатов. Как у крыс контрольной группы, так и в группах с замещающим костный дефект углеродом кинетика их концентраций была такой же, как у предыдущих биохимических показателей сыворотки крови.

### Выводы

1. Таким образом, изученная кинетика ряда биохимических показателей сыворотки крови, характеризующих состояние белкового, углеводно-белкового и азотистого обмена, отражающих течение острого воспалительного процесса и регенераторный потенциал костной ткани крыс, у которых экспериментально образованный дефект кости был заполнен углеродным материалом 2-х видов, показала, что у них отсутствовали признаки общетоксического, гепатотоксического и нефротоксического действия.

2. Значения отдельных показателей течения острого воспаления (содержание гликопротеинов, гаптоглобина) у животных с введенным в кость углеродным наполнителем нормализовались в более сжатые сроки, чем у оперированных крыс и неимплантированной костью, что позволяет предположить наличие у данного вида биоимплантата модулирующего влияния на регуляторные механизмы воспалительной реакции. Более ранняя нормализация уровней хондроитинсульфатов, активности щелочной фосфатазы вероятно указывает на оптимизирующее влияние углеродного имплантата на функциональную активность остеобластов и на регенераторный потенциал костной ткани.

### Перспективы дальнейших исследований.

Дальнейшие исследования свойств углеродсодержащих биоимплантатов, на наш взгляд, будут состоять в изучении их влияния на цитокиновый статус и на расширенный спектр показателей регенерации костной ткани. После подтверждения безвредности биоимплантатов необходима их апробация в условиях клиники.

## Литература

1. Ветеринарна клінічна біохімія / М.І. Карташов, О.П. Тимошенко, Д.В. Кібкало [та ін.]. — Довідник. — Харків, Еспада, 2010. — 400 с.
2. Дедух Н.В. Остеоінтеграція кісткової тканини з титановими імплантатами / Н.В. Дедух, С.В. Малишкіна // Ортопед. травматол. — 2010. — № 1. — С. 45-49.
3. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль индукции и кондукции в остеогенезе / Н.А. Корж, В.А. Радченко, Л.А. Кладченко, С.В. Малышкина // Ортопед. травматол. — 2003. — № 2. — С. 150-157.
4. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. Справочник в 2-х т. Т. 1. Определение содержания гаптоглобина в сыворотке крови риваноловым методом / В.С. Камышников. — Мн.: Интерпрессервис. — 2003. — С. 68-71.
5. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. Справочник в 2 т. / В.С. Камышников. — Т. 2. — 2-е изд. — Мн.: Интерпрессервис, 2003. — 463 с.
6. Керамические материалы в ортопедии и травматологии / Н.А. Корж, О.Е. Вырва, Н.В. Дедух, С.В. Малышкина // Ортопед. травматол. — 2007. — № 3. — С. 20-30.
7. Мельник А.А. Клинические лабораторные тесты для практической медицины, их интерпретация / А.А. Мельник. — К.: Книга — плюс, 2011. — 288 с.
8. Филиппенко В.А. Использование разных видов гидроксиапатитной керамики для пластики костных полостей / В.А. Филиппенко, З.З. Зыман, В.А. Мезенцев // Ортопед. травматол. — 2002. — № 2. — С. 61-65.
9. Albrektsson T. Osteointegration of bone implants / T. Albrektsson, B. Albrektsson // Acta Orthop. Scand. — 1987. — № 58. — P. 567-577.
10. Porous calcium phosphate ceramic granules and their behavior in differently loaded areas of skeleton / Z. Zyman, V. Glushko, N. Dedukh [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. — 2007. — № 2. — P. 1-9.

УДК 591.48: 616-089.819.843:577

### ВПЛИВ НА МЕТАБОЛІЧНИЙ СТАТУС ЩУРІВ ВУГЛЕЦЕВОГО БІОМАТЕРІАЛУ, ІМПЛАНТОВАНОГО У ДЕФЕКТ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ

Леонтьева Ф. С., Шевцов Б. М., Лу Чжоу

**Резюме.** У статті наведені результати експериментального дослідження впливу вуглецевих біоімплантатів, встановлених у дірчастий дефект стегнової кістки 60 білих щурів, на біохімічні показники їх сироватки крові, що відображають стан печінкового метаболізму, наявність нефротоксичного впливу, а також стан регенерації кісткової тканини.

**Ключові слова:** кісткова тканина, вуглецевий біоматеріал, біохімічні показники.

УДК 591.48: 616-089.819.843:577

### ВЛИЯНИЕ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС КРЫС УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩЕГО БИОМАТЕРИАЛА, ИМПЛАНТИРОВАННОГО В ДЕФЕКТ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Леонтьева Ф. С., Шевцов Б. Н., Лу Чжоу

**Резюме.** В статье изложены результаты экспериментального исследования влияния углеродсодержащих биоимплантатов, введенных оперативным путем в дырчатый дефект бедренной кости 60 белых крыс,

на биохимические показатели их сыворотки крови, которые отражают состояние печеночного метаболизма, наличие нефротоксического влияния, а также состояние регенерации костной ткани.

**Ключевые слова:** костная ткань, углеродный биоматериал, биохимические показатели.

UDC 591.48: 616-089.819.843:577

### THE INFLUENCE OF CARBON BIOMATERIAL WHICH INSTALLED TO FEMUR DEFECT ON METABOLIC STATUS OF RATS

Leontyeva F. S., Shevtsov B. M., Lu Chzhou

**Abstract.** The number of the patients who need rebuilding operations on skeleton now is constantly growing. These operations require the harmless biomaterials for fulfilling the bone defects. The search of these materials is done permanently.

The aim of this work is the experimental approbation of a new type carbon biomaterial which influence on biochemical markers of liver metabolism, on renal function and also on bone regeneration.

To realize the experimental investigation tasks we used 60 experimental white rats with mass from 210 to 260 g ♀ and ♂. 20 rats were used as a control group and their bone defects healed as usually after fractures. To the bone defects of the next 20 rats the dense carbon biomaterial has been input. The "felt-like" carbon implant has been input to femur of the next 20 rats. All manipulations with animals were in conformity with requirements of "European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasburg, 1986". The other 8 rats were under no manipulations and they formed so called "intact" group.

To estimate the metabolic status of rats with femur defects which fulfilled by carbon biomaterial the complex of biochemical markers which reflect how implanting material possesses hepatotoxic, nefrotoxic action and it's influence on bone regeneration has been defined. The dynamics of following biochemical markers has been studied: among them serum blood maintenance of total protein, glycoprotein, haptoglobin, cholesterol, creatinin and urea concentrations, alkaline phosphatase and aminotransferases activity, chondroitinsulfate level, blood serum proteinogram.

Due to our investigations we found out that the kinetics of biochemical markers which characterizing the carbon-hydrate, protein and nitrogenic metabolism and reflecting the acute inflammation flow and bone regeneration potential of rats with fulfilled by carbon implant femur defects showed that animals didn't any evidence of hepatotoxic, nefrotoxic and total-toxic influence made by bioimplant. The quantities of separate inflammation flow markers (such as glycoprotein and haptoglobin maintenance) which took place in blood serum of animals with carbon implant have become normal in shorter terms than their maintenance in rats without implantation. This fact allows us to make supposing that carbon implant exert the favorable and modulation influence on inflammation regulatory mechanisms. More early normalization of chondroitinsulfate level and alkaline phosphatase activity probably show the optimization influence of carbon material on osteoblastes functional activity and bone tissue regeneration potential.

**Keywords:** the bone tissue, the carbon biomaterial, biochemical markers.

*Рецензент – проф. Непорада К. С.*

*Стаття надійшла 20.04.2016 року*