

УДК 616.716.8 + 617.52]-001-003.93-037 074

БИОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ АЛЬВЕОЛЯРНОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Желнин Е.В.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, e-mail: tana_zv@list.ru

70 половозрелых крыс-самцов (линия WAG) были разделены на 4 группы: группа 1 – интактные ($n = 8$), 2 – остеопороз ($n = 12$), группа 3 – травма нижней челюсти ($n = 24$); группа 4 – остеопороз + травма нижней челюсти ($n = 26$). Группам 2 и 4 вводили дексаметазон (1,675 мг/кг), 3 – физиологический раствор в объеме, эквивалентном раствору дексаметазону ежедневно внутримышечно в течение 2-х недель. Через 2 недели крысам 3 и 4 групп наносили стандартную травму нижней челюсти. Крыс 3 и 4 групп выводили из эксперимента на 7, 14, 28 и 45 сутки после травмы. Во всех группах определяли содержание кальция (Ca), фосфора (P), щелочной фосфатазы (ЩФ), ИЛ-1 α и ИЛ-8. Установлено, что классические биохимические маркеры метаболизма костной ткани – кальций, фосфор, щелочная фосфатаза – не являются достоверными прогностическими критериями процессов остеорепарации при травмах альвеолярного отростка. Более надежными критериями нарушения процессов посттравматической регенерации альвеолярной кости в эксперименте являются провоспалительные цитокины ИЛ-1 α и ИЛ-8.

Ключевые слова: альвеолярная кость, посттравматическая регенерация, критерии прогнозирования

BIOCHEMICAL PROGNOSTIC CRITERIA OF POSTTRAUMATIC REGENERATION OF ALVEOLAR BONE IN THE EXPERIMENT

Zhelnin E.V.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, e-mail: tana_zv@list.ru

70 male rats (WAG) were divided into 4 groups: group 1 – intact ($n = 8$), group 2 – osteoporosis ($n = 12$), group 3 – mandible injury ($n = 24$) group 4 – osteoporosis + mandible injury ($n = 26$). Groups 2 and 4 were injected dexamethasone (1,675 mg/kg), 3 – saline in a volume equivalent to a solution of dexamethasone i.m. once a day for 2 weeks. After 2 weeks rats of groups 3 and 4 of were exposed to injury of mandible. Rats of 3rd and 4th groups were killed at 7, 14, 28, 45 days after injury. Calcium (Ca), phosphorus (P), alkaline phosphatase (ALP), IL-1 α , TNF- α , IL-8, and nitric oxide in the blood were determined in all rats. It is found that the classical biochemical markers of bone metabolism – calcium, phosphorus, alkaline phosphatase are not reliable prognostic criteria of osteoreparative processes in alveolar bone trauma. Reliable impairment criteria of posttraumatic regeneration of alveolar bone in the experiment are the proinflammatory cytokines IL-1 α and IL-8.

Keywords: alveolar bone, posttraumatic regeneration, prognostic criteria

Биохимические изменения в организме при травме костей и, в частности, альвеолярной кости освещены в ряде работ различного времени с точки зрения патогенеза, диагностики, эффективности лечения [1, 3, 4, 9], а не с точки зрения разработки прогностических критериев исходов травматического повреждения костей с целью своевременной коррекции возможных осложнений. Если учесть, что травма в клинике возникает в большинстве случаев на фоне других заболеваний, нарушенной реактивности, в том числе метаболического характера, становится очевидным, что разработка таких критериев должна начинаться с эксперимента. Следует отметить, что изучение биохимических показателей обычно привязывается к подтверждению воспроизведенных в эксперименте нарушений костной системы [3] без учета стадийности репаративного остеогенеза. Видимо, поэтому исследователи не находят ожидаемых изменений в определенный отрезок времени.

Целью нашего исследования явилось сравнительное изучение кинетики классических биохимических критериев травмы

кости (кальций, фосфор, щелочная фосфатаза) и современных показателей повреждения и заживления (провоспалительные цитокины) на моделях посттравматической регенерации альвеолярной кости у крыс. Для реализации цели исследования стандартное травматическое повреждение альвеолярной кости наносили двум группам крыс: без костной патологии и с остеопорозом.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на 70 половозрелых крысах-самцах линии WAG. Животные были разделены на 4 группы: группа 1 – интактные; группа 2 – остеопороз, вызванный введением дексаметазона из расчета 1,675 мг/кг 1 раз в сутки внутримышечно в течение 2 недель [11]; группе 3 и 4 наносили травматическое повреждение нижней челюсти в виде перфорационного (сквозного дырчатого) дефекта диаметром 2 мм [7]. До проведения операции группе 3 вводили внутримышечно физиологический раствор в объеме, эквивалентном раствору дексаметазона, ежедневно в течение 2-х недель, группе 4 – дексаметазон в дозе 1,675 мг/кг ежедневно внутримышечно в течение 2-х недель. Оперативное вмешательство осуществляли под общим наркозом (аминазин 10 мг/кг, кетамин 50 мг/кг) в условиях асептики и антисептики. Крыс 3-й и 4-й групп выводили из эксперимента на 7, 14,

28 и 45 сутки после травмы с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для исследовательских и других научных целей. Сроки исследования были выбраны соответственно стадийности репаративного остеогенеза у крыс [5].

Для определения кальция и фосфора применяли фотометрические методы с использованием коммерческих наборов фирмы Филисит-Диагностика (Украина). Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли кинетическим методом с р-нитрофенолфосфатом. Содержание ИЛ-1α и ИЛ-8 в периферической крови определяли иммуноферментными методами на иммуноферментном анализаторе «Labline-90» (Австрия) согласно прилагаемой инструкции.

Результаты исследований обрабатывали стандартными методами вариационной статистики на персональном компьютере с использованием прикладных программ «Stadia-6» [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Доказательства нарушений альвеолярной кости остеопоретического характера, возникших под влиянием двухнедельного введения дексаметазона, приведены в наших ранних работах [6, 7]. При этом обнаружены сдвиги в активности ЩФ, уровне метаболитов оксида азота при неизменном содержании Са и Р в крови. Некоторые из этих данных отражены в табл. 1–3 (группа 2, остеопороз).

Как следует из данных, представленных в табл. 1, направленность изменений содержания кальция в сыворотке крови животных 3 и 4 групп после травмы однотипна. Однако при этом на 7 сутки содержание кальция в крови животных 3 группы (травма нижней челюсти) не изменяется, а в 4 группе (травма нижней челюсти на фоне остеопороза) достоверно нарастает в сравнении с интактными животными, видимо, за счет большого масштаба разрушений кости под влиянием дексаметазона.

На 14 сутки содержание кальция в обеих группах достоверно снижается по сравнению с интактными крысами, скорее всего, за счет минерализации, отмеченной в этой стадии репаративного остеогенеза [5]; оно остается сниженным и на 28 сутки в обеих группах, однако повышается по сравнению с 14 сутками (табл. 1). На 45 сутки концентрация кальция в крови в обеих группах вновь нарастает как в сравнении с нормой, так и относительно предыдущего срока (28 сутки), видимо, в связи с резорбцией избыточного регенерата на стадии ремоделирования костного регенерата [9]. Обращает на себя внимание тот факт, что ни в одном из сроков наблюдений достоверных отличий в содержании кальция в крови между 3 и 4 группами не выявлено.

Таблица 1

Содержание кальция (ммоль/л) в сыворотке крови крыс после травмы альвеолярной кости

Группы		Сроки наблюдения			
		7 сут	14 сут	28 сут	45 сут
Группа 1 (интактные)	2,28 ± 0,12 (n = 8)				
Группа 2 (остеопороз)	2,60 ± 0,26 (n = 12)				
Группа 3 (травма нижней челюсти)		2,27 ± 0,37 (n = 6)	1,38 ± 0,10 (n = 6) P ₁ < 0,05 P ₃ < 0,05	1,79 ± 0,40 (n = 6) P ₁ < 0,05	3,07 ± 0,29 (n = 6) P ₁ < 0,05 P ₃ < 0,05
Группа 4 (остеопороз + травма нижней челюсти)		2,74 ± 0,37 (n = 6) P ₁ < 0,05	1,37 ± 0,06 (n = 6) P ₁ < 0,05 P ₃ < 0,05	1,76 ± 0,16 (n = 7) P ₁ < 0,05	2,90 ± 0,28 (n = 7) P ₁ < 0,05 P ₃ < 0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2–5:

P₁ – достоверно относительно интактной группы;

P₂ – достоверность между группами 3 и 4;

P₃ – достоверно относительно предыдущего срока.

Еще более монотонная картина прослеживается в отношении содержания фосфора в сыворотке крови (табл. 2). Различий

в его концентрации между 3 и 4 группами не обнаружено на всем протяжении исследования.

Таблица 2

Содержание фосфора (ммоль/л) в сыворотке крови крыс после травмы альвеолярной кости

Группы		Сроки наблюдения			
		7 сут	14 сут	28 сут	45 сут
Группа 1 (интактные)	1,62 ± 0,14 (n = 8)				
Группа 2 (остеопороз)	1,62 ± 0,21 (n = 12)				
Группа 3 (травма нижней челюсти)		1,67 ± 0,04 (n = 6)	1,93 ± 0,08 (n = 6) P ₁ < 0,05 P ₃ < 0,05	1,69 ± 0,07 (n = 6) P ₃ < 0,05	1,76 ± 0,16 (n = 6)
Группа 4 (остеопороз + травма нижней челюсти)		1,79 ± 0,11 (n = 6)	1,81 ± 0,15 (n = 6)	1,71 ± 0,15 (n = 7)	1,74 ± 0,11 (n = 7)

Полученные данные вполне сопоставимы с клиническими исследованиями биохимических показателей пациентов с переломами нижней челюсти [4]. Успешное лечение пациентов препаратами, стимулирующими репаративный остеогенез, не вызывало достоверных изменений в содержании кальция и фосфора в ротовой жидкости этих пациентов в сравнении с группой больных с затяжным течением процесса, получавших традиционную терапию.

Динамика изменений активности ЩФ в группах представлена в табл. 3. В 3 группе к концу первой недели после нанесения травмы активность энзима достоверно снижается в сравнении с интактными животными (на 38,7%), но уже к концу второй недели повышается до максимальных значений,

превышая показатели интактной группы на 37,7%. В сроки максимальной активности ЩФ, как показали наши исследования, повышается уровень неорганического фосфора (табл. 2), что согласуется с данными клиники [1,9]. В последующем (28–45 сутки) происходит прогрессирующее снижение активности ЩФ. У животных 4 группы следует отметить особенности изменений активности ЩФ по сравнению с 3 группой. Первое – активность ЩФ достоверно повышается (на 32,6%) еще до нанесения травмы, что может быть расценено только как нарушение процессов ремоделирования кости под влиянием дексаметазона; увеличение активности ЩФ в костной ткани на преднизолоновой модели остеопороза у крыс найдено и другими исследователями [8].

Таблица 3

Активность щелочной фосфатазы (Е/л) в сыворотке крови крыс после травмы альвеолярной кости

Группы		Сроки наблюдения			
		7 сут	14 сут	28 сут	45 сут
Группа 1 (интактные)	321,22 ± 97,43 (n = 8)				
Группа 2 (остеопороз)	425,91 ± 73,81 (n = 12) P ₁ < 0,05				
Группа 3 (травма нижней челюсти)		196,83 ± 27,61 (n = 6) P ₁ < 0,05	442,35 ± 42,28 (n = 6) P ₁ < 0,05 P ₃ < 0,02	266,47 ± 28,29 (n = 6) P ₃ < 0,05	203,46 ± 22,26 (n = 6) P ₁ < 0,05
Группа 4 (остеопороз + травма нижней челюсти)		299,28 ± 55,40 P ₂ < 0,05 (n = 6)	288,13 ± 32,17 (n = 6) P ₂ < 0,05	313,42 ± 33,11 (n = 7)	246,74 ± 30,48 (n = 7) P ₁ < 0,05 P ₃ < 0,05

Второе – не отмечается максимально-го подъема активности ЩФ на 14 сутки, как это было в 3 группе. Активность ЩФ в крови после травмы в этой группе не отличается от таковой у интактных крыс, достоверно снижаясь только на 45 сутки. Хотя изменения активности ЩФ при посттравматической регенерации альвеолярной кости в условиях применения дексаметазона имеет свою специфику, достоверные отличия в активности фермента в сравнении с 3 группой имеют место только на 7 и 14 сутки после повреждения, поэтому вряд ли определение активности ЩФ может быть надежным критерием прогнозирования процессов остеорепарации при травме челюстно-лицевой области даже при достаточно «грубых» нарушениях остеогенеза, в частности, вызванных введением декса-

метазона. Более того, полученные данные невозможно однозначно трактовать без сопоставления с патоморфологическими исследованиями альвеолярной кости.

Определение провоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс показало, что у животных 3 группы в ответ на механическую травму уровень ИЛ-1α и ИЛ-8 максимально повышался на 14 сутки, превышая норму (интактные крысы) в 3,1 раза и 1,3 раза соответственно (табл. 4 и 5). Во все остальные сроки колебания в содержании цитокинов находились в пределах нормы.

В ответ на механическую травму челюсти у животных с остеопорозом (4 группа) уровень ИЛ-1α в крови достоверно повышался как в сравнении с нормой, так и с показателями 3 группы во все исследуемые сроки после травмы: 7–45 сутки (табл. 4).

Таблица 4

Содержание ИЛ-1α в сыворотке крови крыс после травмы альвеолярной кости

Группы		Сроки наблюдения			
		7 сут	14 сут	28 сут	45 сут
Группа 1 (интактные)	1,87 ± 0,42 (n = 8)				
Группа 2 (остеопороз)	2,39 ± 0,28 (n = 12) P ₁ < 0,05				
Группа 3 (травма нижней челюсти)		1,62 ± 0,26 (n = 6)	5,82 ± 0,52 (n = 6) P ₁ < 0,01 P ₃ < 0,02	2,24 ± 0,19 (n = 6) P ₃ < 0,05	1,57 ± 0,13 (n = 6) P ₃ < 0,05
Группа 4 (остеопороз + травма нижней челюсти)		3,33 ± 0,34 (n = 6) P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,02	8,12 ± 0,79 (n = 6) P ₁ < 0,001 P ₂ < 0,05 P ₃ < 0,001	3,01 ± 0,49 (n = 7) P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05 P ₃ < 0,02	2,40 ± 0,23 (n = 7) P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05 P ₃ < 0,05

Уровень ИЛ-8 в сыворотке крови крыс 4 группы превышал норму с 14 суток и до конца исследования (табл. 5). В эти же сроки мы обнаруживали достоверное повышение содержания цитокина в сравнении с 3 группой, что свидетельствует о хронизации процессов заживления альвеолярной кости после травмы на фоне остеопороза [3].

Полученные данные подтверждают, что при оценке остеорепарации в большей мере необходимо полагаться на маркеры органического обмена, чем минерального [10]. Вместе с тем полагаем, что диагностические и прогностические биохимические критерии регенерации при травмах челюстно-лицевой области на этапе разработки

требуют привлечения методов морфологического анализа, что и составит задачу наших будущих исследований.

Выводы

1. Классические, биохимические маркеры метаболизма костной ткани – кальций, фосфор, щелочная фосфатаза – не являются достоверными прогностическими критериями процессов остеорепарации при травмах альвеолярного отростка.

2. Более надежными критериями нарушения процессов посттравматической регенерации альвеолярной кости в эксперименте являются провоспалительные цитокины ИЛ-1α и ИЛ-8.

Таблица 5

Содержание ИЛ-8 в сыворотке крови крыс после травмы альвеолярной кости

Группы		Сроки наблюдения			
		7 сут	14 сут	28 сут	45 сут
Группа 1 (интактные)	20,87 ± 1,13 (n = 8)				
Группа 2 (остеопороз)	25,55 ± 2,88 (n = 12) P ₁ < 0,05				
Группа 3 (травма нижней челюсти)		25,49 ± 2,28 (n = 6)	27,50 ± 2,98 (n = 6) P ₁ < 0,05	24,86 ± 2,13 (n = 6)	24,64 ± 2,92 (n = 6)
Группа 4 (остеопороз + травма нижней челюсти)		24,49 ± 2,08 (n = 6)	32,08 ± 3,22 (n = 6) P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05 P ₃ < 0,05	30,84 ± 3,24 (n = 7) P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05	30,41 ± 3,9 (n = 7) P ₁ < 0,05 P ₂ < 0,05

Список литературы

1. Герасимов А.М., Фурцева Л.Н. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
3. Грибова О. В., Подковкин В. Г. Влияние инъекций гидрокортизона на метаболизм соединительной ткани у крыс // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – 2004. – Второй спец. выпуск. – С. 152–157.
4. Гулюк А.Г., Ташян А.Э. Биохимические исследования ротовой жидкости пациентов с переломом нижней челюсти // Вестник стоматологии. – 2009. – № 3. – С. 122–124.
5. Дедух Н.В., Никольченко О.А. Регенерация кистки при алиментарному остеопорозі (експериментальне дослідження) // Ортопед., травматол. и протезирование. – 2009. – № 2. – С. 34–40.
6. Желнин Е.В. Маркеры остеогенеза и их связь с процессами ремоделирования альвеолярной кости в эксперименте // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2012. – Т. 12. – № 4. – С. 126–130.
7. Желнин Е.В. Морфологические особенности посттравматической регенерации альвеолярной кости в эксперименте // Український морфологічний альманах. – 2012. – Т. 10. – № 3. – С. 35–38.
8. Макаренко О.А. Біохімічні механізми остеотропної дії флавоноїдів: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Одеса, 2011. – 40 с.
9. Остеопороз: епідеміологія, клініка, діагностика, профілактика і лічення: монографія / под ред. Н.А. Коржа, В.В. Поворознюка, Н.В. Дедух, І.А. Зупанца. – Харьков: Золотые страницы, 2002. – 648 с.
10. Kent N.G. Markery kostniho obratu // Osteologicky Bulletin. – 1997. – Vol. 2. – P. 122–128.
11. Yasear A.Y., Hamouda S.A. Effect of dexamethasone on osteoclast formation in the alveolar bone of rabbits // Iraqi Journal of Veterinary Sciences. – 2009. – Vol. 23, № 1. – P. 13–16.

References

1. Gerasimov A. M., Furtseva L. N. *Biokhimicheskaya diagnostika v travmatologii i ortopedii*. [The biochemical di-

agnostics in traumatology and orthopedy]. Moscow, Meditsina. 1986. 240 p.

2. Glants S. *Mediko-biologicheskaya statistika*. [Biomedical statistics]. Moscow, Praktika. 1998. 459 p.

3. Gribova O.V., Podkovkin V.G. // *Vestnik SamGU. Estestvennonauchnaya seriya*, 2004, Vtoroy spec. vypusk., pp. 152–157.

4. Gulyuk A.G., Taschyan A.Je. // *Vestnik stomatologii*, 2009, no. 3, pp. 122–124.

5. Diedukh N.V., Nikolchenko O.A. *Ortopediya, travmatologiya i protezirovanie*, 2009, no. 2, pp. 34–40.

6. Zhelnin E.V. *Aktualni problemy suchasnoi medytsyny: Visnyk Ukrainkoi medychnoi stomatologichnoi akademii*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 126–130.

7. Zhelnin E.V. *Ukrainskyi morfologichnyj almanakh*, 2012, Vol. 10, no. 3, pp. 35–38.

8. Makarenko O.A. *Biokhimichni mekhanizmy osteotropnoi dii flavonoidiv* [The biochemical mechanisms of osteotropic action of flavonoids]. Extended abstract of doctor's thesis work in medicine, Odesa, 2011: 40.

9. *Osteoporoz: jepidemiologiya, klinika, diagnostika, profilaktika i lechenie: monografiya* [Osteoporosis: epidemiology, clinical features, diagnosis, prevention and treatment: the monograph] / [pod red. N.A. Korzha, V.V. Povoroznyuka, N.V. Dedukh, I.A. Zupantsa]. Kharkov: Zolotyie stranitsy, 2002. 648 p.

10. Kent N.G. *Osteologicky Bulletin*, 1997, Vol. 2, pp. 122–128.

11. Yasear A.Y., Hamouda S.A. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 2009, Vol. 23, no 1, pp. 13–16.

Рецензенты:

Жуков В.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологической химии, Харьковский национальный медицинский университет МЗ Украины, г. Харьков;

Сорокина И.В., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет МЗ Украины, г. Харьков.

Работа поступила в редакцию 05.12.2013.