

УДК 616.711-074-092.9:599.325.11](045)

Біохімічні показники сироватки крові та тканин міжхребцевих дисків поперекового відділу хребта кролів після денуклеації

Ф. С. Леонтьєва, В. О. Туляков, О. А. Левшин

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», Харків

Development of medical science toward understanding of the processes taking places in cases of degenerative diseases of the musculoskeletal system is impossible without modeling of pathological conditions in laboratory animals. Objective: To investigate the changes in biochemical parameters of metabolism in tissues of intervertebral discs and serum in rabbits with modeled degenerative and destructive process in lumbar intervertebral discs. Methods: The model included mechanical denucleation of one nucleus pulposus of intervertebral disc and damage to the cranial apophysis of the vertebral body with the growth zone in the lumbar spine of 3-month-old rabbits (weight of 1 300–1 500 g). 60 days after the operation we determined the content of total hydroxyproline, hexosamine, total glycosaminoglycans (GAG), sialic acid and tyrosine in tissues of intervertebral discs. Before and 60 days after modeling we evaluated the content of glycoproteins, total protein, fractional composition of glycosaminoglycans sulfates (GAGs) and hydroxyproline in blood serum. Results: There was reliable activation of cartilage collagen metabolism of intervertebral discs with the increase of hydroxyproline content and inhibition of proteoglycan metabolism with a decrease of GAG content and hexosamine concentration of sialic acids and non-collagenous proteins in intervertebral discs of experimental animals compared to control group. Degenerative processes in experimental rabbits prevailed over reparative ones. In blood serum of experimental animals there was revealed reliable increase in the total content of GAGs to 25.76 % and hydroxyproline to 16.87 %, as well as decrease to 42.61 % of activity of alkaline phosphatase and increase of 282.95 % of activity of acid phosphatase. Conclusion: The model created leads to the development of degenerative-dystrophic process on the 60th day after the operation. Key words: intervertebral disc, spine, biochemistry, experiment, rabbits, degenerative and destructive process.

Развитие медицинской науки в изучении процессов, происходящих в условиях дегенеративных заболеваний опорно-двигательной системы, невозможно без моделирования соответствующих патологических состояний у лабораторных животных. Цель: изучить изменения биохимических показателей метаболизма в тканях межпозвонковых дисков и сыворотке крови кроликов с моделированным дегенеративно-деструктивным процессом в межпозвонковых дисках поясничного отдела позвоночника. Методы: модель включала механическую денуклеацию пульпозного ядра одного межпозвонкового диска и повреждение краниального апофиза тела позвонка с зоной роста в поясничном отделе позвоночника трехмесячных кроликов массой 1 300–1 500 г. В тканях межпозвонковых дисков через 60 суток после операции определяли содержание общего гидроксипролина, гексозаминов, суммарных гликозаминогликанов (ГАГ), сialовых кислот и тирозина. В сыворотке крови до и через 60 суток после моделирования оценивали гликопротеиды, общий белок, фракционный состав гликозаминогликансульфатов (ГАГс) и гидроксипролина. Результаты: установлена достоверная активация метаболизма коллагена хряща межпозвоночных дисков с увеличением содержания гидроксипролина и угнетение обмена протеогликанов с уменьшением содержания ГАГ и гексозаминов, концентрации сialовых кислот и неколлагеновых белков в межпозвонковых дисках опытных животных по сравнению с контролем. Процессы дегенерации у экспериментальных кроликов преобладали над репаративными. В сыворотке крови опытных животных выявлено достоверное увеличение общего содержания ГАГс на 25,76 %, гидроксипролина на 16,87 %, а также снижение на 42,61 % активности щелочной и повышение на 282,95 % активности кислой фосфатазы. Выводы: разработанная модель приводит к развитию дегенеративно-дистрофического процесса на 60-е сутки после операции. Ключевые слова: межпозвонковый диск, позвоночник, биохимия, эксперимент, кролики, дегенеративно-деструктивный процесс.

Ключові слова: міжхребцевий диск, хребет, біохімія, експеримент, кролі, дегенеративно-деструктивний процес

Вступ

Розвиток медичної науки у вивченні процесів, що відбуваються за дегенеративних захворювань опорно-рухової системи (ОРС), неможливий без моделювання відповідних патологічних станів у лабораторних тварин [11].

Деструкція хрящової та кісткової тканин супроводжується надходженням фрагментів макромолекул біополімерів у загальний кровообіг, що є основою використання методів клінічної біохімії для оцінювання ступеня порушень ОРС. При цьому особливу увагу слід приділяти вивченню відхилень у процесах обміну двох найбільш значущих макромолекул сполучної тканини — колагену і протеогліканів (ПГ) [16]. Це обумовлено тим, що зміни біохімічних показників обміну зазначених сполук наступають у ранньому періоді, коли ще неможливо зафіксувати розвиток захворювання за допомогою інших методів [4].

Маркерами дегенеративно-деструктивних захворювань ОРС у практичній лабораторній діагностиці можуть бути продукти обміну колагену, значна кількість яких за названих умов міститься в біологічних рідинах і залишається в них тривалий час [12, 18].

Відомий спосіб оцінки інтенсивності та прогнозування розвитку післятравматичних дегенеративно-деструктивних процесів ОРС, який полягає у фракційному аналізі вмісту гідроксипроліну в сироватці крові пацієнтів. Одночасне підвищення в сироватці крові вмісту як білково-зв'язаної, так і вільної фракції цього метаболіту автори рекомендують вважати за ознаку розвитку дегенеративного процесу [9].

Метаболізм протеогліканів ОРС можна дослідити за допомогою вивчення фракційного складу та сумарного вмісту глікозаміногліканів (ГАГ) сироватки крові [17]. За умов моделювання дегенеративно-деструктивного процесу ОРС шляхом механічної травми суглобів максимум підвищення вмісту ГАГ у синовіальній рідині припадає на 5–7-у добу після ушкодження і концентрація їх залишається підвищеною як мінімум впродовж 20 діб [13, 14].

У разі дегенеративно-деструктивних процесів ОРС спостерігається підвищення активності лужної фосфатази, прямо пропорційне об'єму ураженої ділянки і маніфестації дегенеративно-деструктивного процесу, що дає змогу використовувати цей показник як маркер дистрофії [16].

Мета роботи: дослідити зміни біохімічних показників метаболізму в тканинах міжхребцевих дисків та сироватці крові кролів із модельованим дегенеративно-деструктивним процесом у міжхребцевих дисках поперекового відділу хребта.

Матеріал та методи

Для відтворення дегенеративно-дистрофічного процесу виконували механічну денуклеацію драглистого ядра одного міжхребцевого диска поперекового відділу хребта та ушкодження краніального апофізу із зоною росту¹ в тому ж сегменті у трьохмісячних кролів з масою тіла 1 300–1 500 г.

Для біохімічних досліджень використано кров від 15 тварин до (контрольна група) та 5 кролів через 60 діб після (дослідна) моделювання патології. Кров у тварин забирали з вушної вени. Крім того, досліджували тканини міжхребцевих дисків поперекового відділу хребта тварин до (контроль) та через 60 діб після (дослід) моделювання патології — по 5 кролів у групі. Для цього тварин виводили з експерименту шляхом повітряної емболії під ефірним наркозом. Дослідження виконані відповідно до директиви Ради Європейського Союзу (ЄС) 86/609 ЄЕС від 24 листопада 1986 р. про дотримання законів, ухвал і адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [5, 15].

Методики для біохімічного обстеження відібрали так, щоб дослідити основні групи метаболітів сполучної тканини.

У тканинах міжхребцевих дисків для дослідження метаболізму колагену визначали вміст загального гідроксипроліну за методом Н. Stegemann, К. Stalder. Для вивчення метаболізму вуглеводно-білкових сполук вимірювали концентрації гексозамінів за методом N. F. Woas, сумарних ГАГ, які відображають метаболізм ПГ, за методом Л. І. Слущького, сіалових кислот за методом Hess. Дослідження обміну неколагенових білків проводили за вмістом тирозину методом Л. І. Слущького [7].

У сироватці крові визначали вуглеводно-білкові комплекси: глікопротеїди (ГП) [2], фракційний склад глікозаміноглікансульфатів (ГАГс) із виділенням фракцій гіалуронатів і хондроїтин-4-сульфату (I фракція), хондроїтин-6-сульфату (II фракція), високосульфатованих ГАГс (кератансульфати, дерматансульфати, гепарансульфат тощо) (III фракція) [8].

Фракційний склад гідроксипроліну в сироватці крові визначали фотоелектроколориметрично після

¹ Автори вдячні науковому співробітникові лабораторії експериментального моделювання ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» Г. В. Іванову за виконання моделювання дегенеративно-деструктивного процесу в міжхребцевих дисках та апофізах тіл хребців поперекового відділу хребта експериментальних кролів.

Таблиця 1

Зміни біохімічних показників обміну сполучної тканини в тканинах уражених міжхребцевих дисків кролів із дегенеративно-деструктивним процесом

Показник	Група тварин		Зміна показника, %	p
	Контроль, n = 5	Дослід, n = 5		
Гідроксипролін, г/100 г	5,23 ± 0,50	6,99 ± 0,52	+33,62	< 0,05
Тирозин, г/100 г	0,87 ± 0,04	0,54 ± 0,07	-37,93	< 0,01
Гексозаміни, г/100 г	3,48 ± 0,36	2,29 ± 0,25	-34,19	< 0,05
Сіалові кислоти, г/100 г	1,53 ± 0,11	0,92 ± 0,08	-39,87	< 0,001
Глікозаміноглікани, г/100 г	4,41 ± 0,29	3,24 ± 0,13	-26,53	< 0,01

окислення гідроксипроліну хлорамином з утворенням кольорової реакції поліконденсації з парадиметиламінобензальдегідом за методом П. Н. Шарасва [10]. При цьому було виділено фракції білково-зв'язаного та вільного метаболітів. Відомо, що вміст білково-зв'язаної фракції гідроксипроліну характеризує біосинтез колагену, а вільної — його біодеградацію. Для визначення переважання катаболічних або анаболічних процесів у системі «колаген – гідроксипролін» обчислювали співвідношення між вмістом у сироватці крові вільної та білково-зв'язаної фракцій метаболіту.

Також вивчали вміст у сироватці крові загального білка біуретовим методом, кальцію-потенціометричним [2], загальних хондроїтинсульфатів за реакцією з риванолом [1], вираженість ензиматичних маркерів функції остеобластів та остеокластів (активність лужної та кислоти фосфатаз відповідно) за кінетичним методом [2].

Отримані числові показники аналізували з перевіркою рівності рядів і виключенням випадкових значень та подальшим статистичним опрацюванням рядів за Фішером-Стьюдентом із обчисленням середньоарифметичних значень і середньоквадратичних помилок за допомогою програмного пакету Microsoft Excel XP. Надалі значення рядів і їх середньоквадратичні помилки порівнювали між собою з визначенням коефіцієнтів Стьюдента і вірогідності відмінностей p . У разі $p < 0,05$ визнавали вірогідними відмінності між рядами [3].

Результати та їх обговорення

У тканинах ушкоджених міжхребцевих дисків експериментальних кролів на 60-у добу після моделювання дегенеративно-деструктивного процесу сумарний вміст колагену зростав на 33,62 % порівняно з показниками інтактних тварин, про що свідчить відповідне збільшення вмісту сумарного гідроксипроліну (табл. 1). Зазначені зміни в молодих тварин характерні для регенераторного процесу в структурах, які вміщують колаген, а саме кістковій та хрящовій тканинах.

Водночас процес дистрофії і деструкції тканин міжхребцевих дисків спричиняв зменшення кількості вуглеводних компонентів органічного матриксу. Зокрема, на 60-у добу після відтворення експериментальної патології в ушкоджених тканинах міжхребцевих дисків достовірно знизився вміст гексозамінів (на 34,19 %), сіалових кислот (на 39,87 %) і сумарних ГАГс (на 26,53 %).

У сироватці крові дослідних кролів в умовах розвитку дистрофічно-деструктивного процесу спостерігали зниження рівня загального білка на 9,64 % (табл. 2). Про поступове прогресування запального процесу свідчив збільшений на 40,88 % рівень ГП у сироватці крові дослідних тварин.

Не виявлено достовірних змін рівня кальцію в сироватці крові, що є ознакою відносної незмінності метаболізму мінеральної складової кісткової тканини. Водночас визначено збільшення на 25,76 % загального вмісту ГАГс, яке супроводжувалося перерозподілом їх фракційного складу. Частка фракції хондроїтин-4-сульфатів була зафіксована на більш високій відмітці (26,28 %), ніж у контрольних кролів. Відсоток вмісту фракцій хондроїтин-6-сульфатів та високосульфатованих ГАГс достовірно не змінився (табл. 2). Прискорення обміну хондроїтин-4-сульфатів означає руйнування ГП сполучної тканини і заміщення їх значною кількістю частково неповноцінних аналогів.

Дегенеративно-деструктивний процес у міжхребцевих дисках супроводжувався втягненням до ураження прилеглої кісткової тканини, про що свідчить перерозподіл фракційного складу гідроксипроліну та збільшення його загального вмісту в сироватці крові дослідних кролів. Так, сумарна кількість гідроксипроліну була достовірно вищою на 16,87 % порівняно з показником контрольної групи.

Одержані результати свідчать про активацію процесів руйнування (більшим чином) та відновлення кісткової тканини. На противагу вказаним змінам, достовірне збільшення кількості білково-зв'язаної фракції метаболіту не виявлено, що вказує

Таблиця 2

Зміни біохімічних показників обміну сполучної тканини в сироватці крові кролів із дегенеративно-деструктивним процесом

Показник	Група тварин		Зміна показника, %	p
	Контроль, n = 15	Дослід, n = 15		
Загальний білок, г/л	71,60 ± 1,51	64,7 ± 2,06	-9,64	< 0,01
Кальцій, ммоль/л	2,230 ± 0,018	2,376 ± 0,019	+6,54	> 0,05
Глікопротеїди, г/л	0,751 ± 0,035	1,058 ± 0,043	+40,88	< 0,001
Активність лужної фосфатази, од/л	328,3 ± 8,9	230,2 ± 32,8	-42,61	< 0,001
Активність кислої фосфатази, од/л	6,5 ± 0,3	24,7 ± 2,1	+282,95	< 0,001
Відношення активності лужної фосфатази до активності кислої фосфатази	50,90 ± 2,53	9,32 ± 0,87	-81,69	< 0,001
Хондроїтин-6-сульфати, %	54,55 ± 3,21	48,19 ± 3,15	-11,65	> 0,05
Хондроїтин-4-сульфати, %	25,76 ± 1,91	32,53 ± 2,19	+26,28	< 0,05
Високосульфатовані ГАГс, %	19,69 ± 1,82	19,28 ± 1,21	-2,08	> 0,05
Загальні хондроїтинсульфати, г/л	0,217 ± 0,016	0,228 ± 0,026	+5,07	> 0,05
Гідроксипролін:				
– сумарний, г/л	1,719 ± 0,065	2,009 ± 0,074	+16,87	< 0,01
– білково-зв'язаний, г/л	0,611 ± 0,027	0,695 ± 0,031	+13,75	> 0,05
– вільний, г/л	1,108 ± 0,076	1,275 ± 0,089	+18,59	> 0,05

на недостатність відновних процесів в ураженій кістковій тканині в умовах експерименту.

Зазначене підтверджуємо результатами аналізу показників активності маркерних ферментів формування та руйнування кісткової тканини — лужної та кислої фосфатази, суттєві зміни яких зафіксовані в умовах експерименту. При цьому амплітуда падіння на 42,61 % активності лужної фосфатази, яка відображає процеси перебудови кісткової тканини, значно поступалася збільшенню на 282,95 % активності кислої фосфатази, маркерного ферменту остеокластів. Відповідно, коефіцієнт відношення активності лужної до кислої фосфатази, який є ознакою рівноваги процесів метаболізму кісткової тканини, був зменшений на 81,69 % (табл. 2).

З огляду на отримані результати констатуємо, що в умовах розвитку дегенеративно-деструктивного процесу в тканинах міжхребцевих дисків змінюється склад ушкодженої сполучної тканини на фоні порушення її метаболізму.

Висновки

Механічна денуклеація міжхребцевих дисків та ушкодження апофізів тіл хребців поперекового відділу хребта у лабораторних кролів в умовах експерименту на 60-у добу призводить до достовірної активації метаболізму колагену хряща міжхребцевих дисків зі збільшенням вмісту гідроксипроліну та пригнічення обміну протеогліканів, про що свідчить зменшення вмісту ГАГ та гексозамінів, а також зниження концентрації сіалових кислот і неколагенових білків у міжхребцевих дисках дослідних тварин порівняно з показниками контролю. Процеси дегенерації в умовах виконаного експерименту переважали над репаративними.

Розвиток дегенеративно-деструктивного процесу в тканинах уражених міжхребцевих дисків кролів супроводжується достовірними змінами біохімічних показників сироватки крові та активності маркерних ферментів кісткової тканини експериментальних тварин порівняно з контрольною групою.

Інтенсивний запальний процес підтверджуємо достовірним збільшенням концентрації глікопротеїдів у сироватці крові дослідних кролів на 60-у добу експерименту порівняно з показниками контрольної групи.

Список літератури

1. Біохімічні методи дослідження крові хворих: Методичні рекомендації для лікарів хіміко-токсикологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини України / В. І. Левченко, Ю. М. Новожитська, В. В. Сахнюк [та ін.]. — Київ, 2004. — 104 с.
2. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. Справочник в 2 т. / В. С. Камышников. — Т. 1. — Минск: Интерсервис. — 2003. — 495 с.
3. Ланг Т. А. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т. А. Ланг, М. М. Сесик. — М: Практическая Медицина, 2011. — 480 с.
4. Леонтьева Ф. С. Використання принципів доказової медицини для лабораторної діагностики остеоартрозу / Ф. С. Леонтьева, В. О. Туляков // Медична хімія. — 2010. — Т. 12, № 2 (43). — С. 55–60.
5. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика (видання офіційне): настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008 / О. Стефанов, Т. Бухтіарова, В. Коваленко [та ін.]. — К.: Моріон, 2009. — С. 37–68.
6. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник [А. И. Карпищенко и др.]; под ред. профессора А. И. Карпищенко. — СПб.: Интермедика, 1999. — Т. 2. — 307 с.
7. Методические рекомендации по экспериментальному исследованию и клиническому изучению противоартрозных (хондромодулирующих) лекарственных средств (издание

- официальное) / [И. А. Зупанец, Н. А. Корж, Н. В. Дедух и др.]; под ред. д-ра мед. наук, проф. П. И. Середы. — Киев-Харьков: Изд-во Украинской фармацевтической академии. — 1999. — 56 с.
8. Пат. № 29198 Україна, МПК (2006) G01N 33/48. Спосіб визначення фракцій сульфатованих гексозаміногліканів / Леонтьєва Ф. С., Філіпенко В. А., Тимошенко О. П. та ін.; заявник та патентовласник ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка АМНУ»; Харківська державна зооветеринарна академія. — № u200708505; заявл. 24.07.2007; опубл. 26.11.2007; Бюл. № 20.
 9. Пат. 2463000 C1RU, МПК (2006.01) A61B 10/00, G09B 23/28, G01N 33/48. Способ оценки интенсивности деструктивных процессов при травматическом повреждении коленного сустава и прогнозирования развития посттравматического артроза / Захватов А. Н., Беляев А. Н., Козлов С. А. [и др.] [RU]; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева» [RU]. — № 2011126092/14; заявл. 22.06.2011; опубл. 10.10.2012; Бюл. № 28.
 10. Шараев П. Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови / П. Н. Шараев // Лабораторное дело. — 1981. — № 5. — С. 283–285.
 11. An H. S. Relevance of in vitro and in vivo models for intervertebral disc degeneration / H. S. An, K. Masuda // *J. Bone Joint Surg.* — 2006. — Vol. 88-A (Suppl. 2). — P. 88–94.
 12. Biochemical markers of joint tissue turnover / A. C. Bay-Jensen, B. C. Sondergaard, C. Christiansen [et al.] // *Assay and Drug Development Technologies.* — 2010. — Vol. 8, № 1. — P. 118–124.
 13. Comparison of differential biomarkers of osteoarthritis with and without posttraumatic injury in the Hartley guinea pig model / L. Wei, B. C. Fleming, X. Sun [et al.] // *J. Orthop. Res.* — 2010. — Vol. 28, № 7. — P. 900–906.
 14. Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury / K. A. Elsaid, B. C. Fleming, H. L. Oksendahl [et al.] // *Arthr. Rheum.* — 2008. — Vol. 58. — P. 1707–1715.
 15. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasbourg, 1986. — P. 52.
 16. Livshits G. Outlines of the biochemistry of osteoarthritis / G. Livshits, S. Ermakov, A. Vilker // *Cur. Rheum. Rev.* — 2010. — Vol. 6, № 4. — P. 234–250.
 17. Popham M. Imaging biomarkers of spine osteoarthritis / M. Popham, F. M. K. Williams // *Arthr. Res. Ther.* — 2009. — Vol. 11, № 5. — P. 130–134.
 18. Serum and urinary biochemical markers for knee and hip osteoarthritis: a systematic review applying the consensus BI-PED criteria / W. E. van Spil, J. DeGroot, W. F. Lems [et al.] // *Osteoarth. Cartil.* — 2010. — Vol. 18, № 5. — P. 601–604.

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872014338-42>

Стаття надійшла до редакції 26.05.2014

BIOCHEMICAL PARAMETERS OF SERUM AND LUMBAR INTERVERTEBRAL DISCS IN THE EXPERIMENTAL RABBITS AFTER DENUCLEATION

F. S. Leontyeva, V. O. Tuliakov, O. A. Levshin

SI «Sytenko Institute of Spine and Joints Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv