

УДК 611-018.4-003.93-02:612.015.1]-092.9
DOI 10.11603/2311-9624.2016.4.7227

©О. В. Скочило

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського»

Експериментальна оцінка процесів регенерації кісткової тканини шляхом аналізу ферментативної активності кислої та лужної фосфатаз

Резюме. На моделі створеного кісткового дефекту дослідили динаміку зміни активності показників кислої та лужної фосфатаз та порівняли результати з даними, які отримали після проведення пластики кісткового дефекту матеріалом на основі гідроксиапатиту та полілактиду з різним відсотковим вмістом складників (перша та друга дослідні групи). Встановлено, що процеси демінералізації тривають до 7 доби у всіх групах. У контролі вже на 14 добу починають домінувати зворотні процеси, які досягають свого максимуму на 30 добу, після чого відбувається збалансування обох вказаних антагоністичних процесів. У першій дослідній групі процеси мінералізації різко інтенсивні у проміжку між 14 та 30 добами, та зберігають свій позитивний баланс навіть на 90 та 180 доби. У другій дослідній групі до 21 доби відбуваються процеси мінералізації із найбільшою ефективністю. Після цього вже на 30 добу інтенсивність мінералізації стрімко спадає та практично повністю нормалізується на 180 добу.

Ключові слова: кістковий дефект; регенерація кісткової тканини; гідроксиапатит; полілактид; кисла фосфатаза; лужна фосфатаза.

О. В. Скочило

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского»

Экспериментальная оценка процессов регенерации костной ткани путем анализа ферментативной активности кислой и щелочной фосфатаз

Резюме. На модели созданного костного дефекта исследовали динамику изменения активности показателей кислой и щелочной фосфатаз и сравнили результаты с данными, который получили после проведения пластики костного дефекта материалом на основе гидроксиапатита и полилактида с разным процентным составом компонентов (первая и вторая опытные группы). Установлено, что процессы деминерализации длятся до 7 суток у всех группах. В контроле уже на 14 сутки начинают доминировать обратные процессы, которые достигают своего максимума на 30 сутки, после чего происходит сбалансирование обеих указанных антагонистических процессов. В первой опытной группе процессы минерализации резко интенсивные в промежутке между 14 и 30 сутками, и сохраняют свой позитивный баланс даже на 90 и 180 сутки. Во второй опытной группе до 21 сутки происходят процессы минерализации с наибольшей эффективностью. После этого уже на 30 сутки интенсивность минерализации резко падает и практически полностью нормализируется на 180 сутки.

Ключевые слова: костный дефект; регенерация костной ткани; гидроксиапатит; полилактид; кислая фосфатаза; щелочная фосфатаза.

О. V. Skochylo

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University

Experimental estimation of bone regeneration processes by analyzing the enzymatic activity of acid and alkaline phosphatases

Summary. We explored the dynamics of changes activity indexes of acid and alkaline phosphatases on the models of created bone defect and compared the results with the data obtained after leading bone defects plastic with the material based on hydroxyapatite and polilaktide with different percentage of components

(the first and the Second research groups). We established that the demineralization process lasts up to 7th days in all groups. At a control already on 14th day it starts to dominate the reverse processes that reach their maximum at 30th day, followed by a balance of both these antagonistic processes. In the first experimental group mineralization processes are sharply intensive in between 14th and 30th day, and keeping a positive balance even at the 90th and 180th day. In the second experimental group the processes of mineralization is implementing till the 21st day with the highest efficiency. Then, at the 30th day mineralization intensity decreases rapidly and almost completely normalizes on the 180th day.

Key words: bone defect; bone tissue regeneration; hydroxyapatite; polilaktide; acid phosphatase; alkaline phosphatase.

Вступ. Як відомо, кісткова тканина не є сталою структурою, у ній постійно відбуваються поступові процеси фізіологічної регенерації [1, 7, 8]. Поряд з поєднанням процесів катаболізму та анаболізму, які є характерними для органічного матриксу кістки, у мінеральній складовій типовими є аналогічні за своєю природою також два взаємопов'язані процеси, а саме – демінералізація та мінералізація [2]. Як маркери, які їх характеризують, були використані дослідження активності кислоти фосфатази (КФ) та лужної фосфатази (ЛФ) [3].

КФ – стійкий до тартату фермент, що секретується остеокластами і потрапляє у підвищеній кількості в кровотік при збільшенні кількості та зростанні активності остеокластів – клітин, які руйнують мінеральний компонент кісток.

ЛФ є протилежним за своїм біологічним ефектом ферментом. Вона є продуктом дії остеобластів – клітин, що відповідають за формування та мінералізацію кісток, та є глікопротеїном, виявленим на їх клітинній поверхні [4], а ріст її активності свідчить про підвищення активності мінералізації органічного матриксу кістки [3].

Метою роботи було вивчення процесів остеорегенерації шляхом оцінювання показників ферментативної активності кислоти та лужної фосфатази як у контрольній групі (загоєння під кров'яним згортком), так і в дослідних групах, де кістковий дефект заміщувався остеопластичним матеріалом на основі гідроксиапатиту та полілактиду з різним відсотковим вмістом компонентів та проведено порівняльний аналіз репарації у динаміці.

Матеріали і методи. Експеримент проведено на білих статевозрілих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин поділено на групи: контрольну та першу і другу дослідні. Усі маніпуляції із піддослідними тваринами здійснювали відповідно до міжнародних вимог згідно з Європейською конвенцією

захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Операційне втручання проводили під загальним знеболюванням. Для цього використовували 0,04 мл 5 % розчину тіопенталу натрію, який вводили внутрішньочеревно в лівий нижній квадрант черевної порожнини. Операційне втручання виконували за загальновідомою методикою [5], децю її модифікувавши. Після видалення шерстяного покриву (проекція нижньої щелепи та підщелепова ділянка зліва) та обробки операційного поля 3 % розчином йоду, проводили розріз шкіри паралельно та нижче нижнього краю нижньої щелепи довжиною 1–1,5 см. Далі, скелетувавши кістку, створювали наскрізний отвір у ділянці тіла нижньої щелепи зліва за допомогою фізіодиспенсера SURGEC XT (NSK, Японія) при швидкості 800 об./хв з постійним охолодженням 0,9 % розчином хлориду натрію. Діаметр стоматологічного бора 2 мм. У контрольній серії дослідів після антисептичної обробки рану ушивали. Шви на шкірі зволожували 1% розчином брильянтового зеленого. В першій дослідній групі кістковий дефект заповнювали імплантаційним матеріалом (гідроксиапатит 80 %+полілактид 20 %), в другій дослідній групі – імплантаційний матеріал (гідроксиапатит 50 %+полілактид 50 %). Для створення цієї композиції використовували полілактид (Poly (L-Lactide) Purasorb PL 32 (Holland) та гідроксиапатит (ГА) $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ з розміром частинок 0,1 мм (температура спікання =1050 °С), синтезований на кафедрі хімічної технології силкатів НУ «Львівська політехніка». Блокову (ко)полімеризацію композицій здійснювали у термошафі на повітрі за температури 348 К протягом 4,5 год. Після закінчення синтезу полімерні зразки охолоджували до кімнатної температури 1,5–2 год. Виводили тварин з експерименту (по 6 особин) на 7, 14, 21, 30, 90, 180 доби

шляхом передозування розчину тіопенталу натрію, який вводили внутрішньочеревно.

Для проведення досліджень використовували сироватку крові піддослідних тварин. Самі дослідження проводили на біохімічному аналізаторі «Humalyzer 2000». Для оцінки показників застосовували метод із використанням стандартних наборів фірми «Human» (Німеччина).

Експериментальні дані обробляли за допомогою непараметричних методів статистики (критерію Вілкосона) [6]. Розходження приймали достовірним при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Отримані дані активності КФ подано на рисунку 1 та у таблиці 1.

У тварин контрольної групи на 7 добу спостерігали значне достовірне зростання актив-

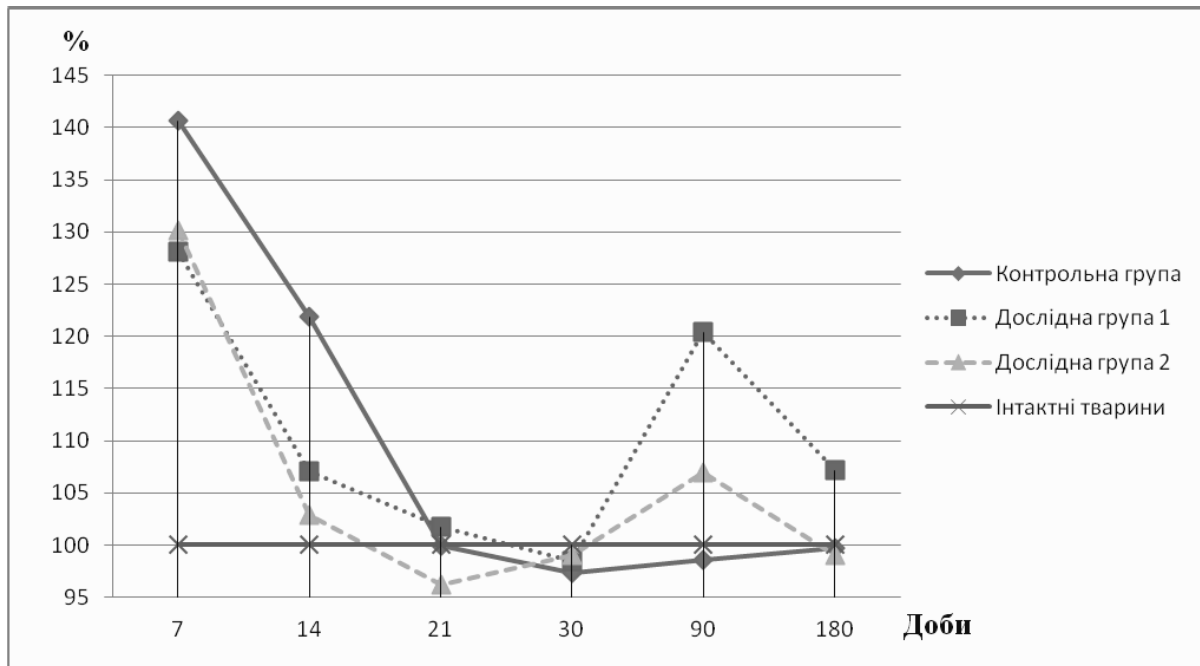


Рис. 1. Динаміка відсоткових значень активності кислоти фосфатази в крові експериментальних тварин до показника інтактних (100 %).

ності КФ, яке досягало 140,66 % ($p < 0,05$) рівня інтактних тварин. Надалі спостерігалось достовірне зниження її активності. На 14 добу воно зменшилося до 121,85 % ($p < 0,05$). У два наступні терміни спостереження активність КФ недостовірно відрізнялася від фізіологічного рівня та складала на 21 добу 99,92 % ($p > 0,05$), на 30 добу – 97,32 % ($p > 0,05$). На 90 добу показник становив 98,56 % ($p < 0,05$). У завершальному терміні (180 доба) значення активності КФ практично не відрізнялося від такої, як у інтактних тварин та склало 99,73 % ($p > 0,05$).

У першій дослідній групі на 7 добу зростання рівня активності КФ досягало до 128,14 % ($p < 0,05$). Проте у наступні два терміни (14 та 21 доба) відмічено зменшення цього показника відповідно до 107,07 % ($p < 0,05$) та 101,70 % ($p > 0,05$). Незначно нижче фізіологічного значення зменшувалася активність КФ на 30 добу та дорівнювала 98,43 % ($p > 0,05$). Але на 90 добу було відмічено повторне достовірне зростання

її активності до 120,38 % ($p < 0,05$) з повторним зниженням до 107,17 % ($p < 0,05$) на 180 добу.

Динаміка активності КФ у другій дослідній групі була схожою до вищеописаної групи. Первинне зростання активності КФ на 7 добу доходило до 130,15 % ($p < 0,05$). Проте вже на 14 добу вона зменшувалася статистично недостовірно щодо показника інтактних тварин та складала 102,90 % ($p > 0,05$). У двох наступних термінах активність КФ була незначно нижчою від фізіологічного показника: 21 доба – 96,24 % ($p < 0,05$) та 30 доба – 99 % ($p > 0,05$). Повторне зростання на 90 добу доходило лише до 106,98 % ($p < 0,05$) та поверталось на 180 добу практично до рівня інтактних тварин (99,06 %, $p > 0,05$).

Іншим, протилежним за своїм ефектом, є маркер, який досліджували на цьому етапі виконання роботи – лужна фосфатаза (ЛФ).

Отримані дані представлено у таблиці 2 та рисунку 2.

Експериментальні дослідження

Таблиця 1. Активність кислої фосфатази (Од/л) у крові експериментальних тварин (M±m, n=6)

Термін спостереження (доба)	Група тварин			
	інтактні	контрольна	дослідна 1	дослідна 2
7	52,4±0,1	73,7±0,1 p ₁ <0,05	67,5±1,7 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	68,2±0,6 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ >0,05
14	52,4±0,1	62,9±1,3 p ₁ <0,05	58,3±2,6 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	53,9±1,1 p ₁ >0,05 p ₂ <0,05 p ₃ >0,05
21	52,4±0,1	52,4±0,1 p ₁ >0,05	55,3±1,6 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	50,4±0,6 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
30	52,4±0,1	51,0±0,9 p ₁ >0,05	51,6±0,4 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	51,9±0,7 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
90	52,4±0,1	51,6±0,2 p ₁ <0,05	63,1±0,8 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	56,1±1,4 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
180	52,4±0,1	52,3±0,1 p ₁ >0,05	56,2±1,8 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	51,9±0,9 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ <0,05

Примітки: 1) p₁ – значення коефіцієнта достовірності до групи інтактних тварин;

2) p₂ – значення коефіцієнта достовірності до контрольної групи;

3) p₃ – значення коефіцієнта достовірності до дослідної групи 1.

Таблиця 2. Активність лужної фосфатази (Од/л) у крові експериментальних тварин (M±m, n=6)

Термін спостереження (доба)	Група тварин			
	інтактні	контрольна	дослідна 1	дослідна 2
7	15,3±0,8	14,8±1,1 p ₁ >0,05	14,9±0,9 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	15,0±0,7 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
14	15,3±0,8	19,4±2,0 p ₁ >0,05	25,6±2,1 p ₁ <0,05 p ₂ >0,05	35,7±1,7 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
21	15,3±0,8	27,0±2,7 p ₁ <0,05	45,3±2,6 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	61,1±4,8 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
30	15,3±0,8	36,1±2,2 p ₁ <0,05	52,0±2,9 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	36,6±1,5 p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 p ₃ <0,05
90	15,3±0,8	16,8±1,0 p ₁ >0,05	30,5±1,9 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	19,5±1,6 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
180	15,3±0,8	15,6±0,7 p ₁ >0,05	26,7±2,4 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	15,0±0,9 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ <0,05

Примітки: 1) p₁ – значення коефіцієнта достовірності до групи інтактних тварин;

2) p₂ – значення коефіцієнта достовірності до контрольної групи;

3) p₃ – значення коефіцієнта достовірності до дослідної групи 1.

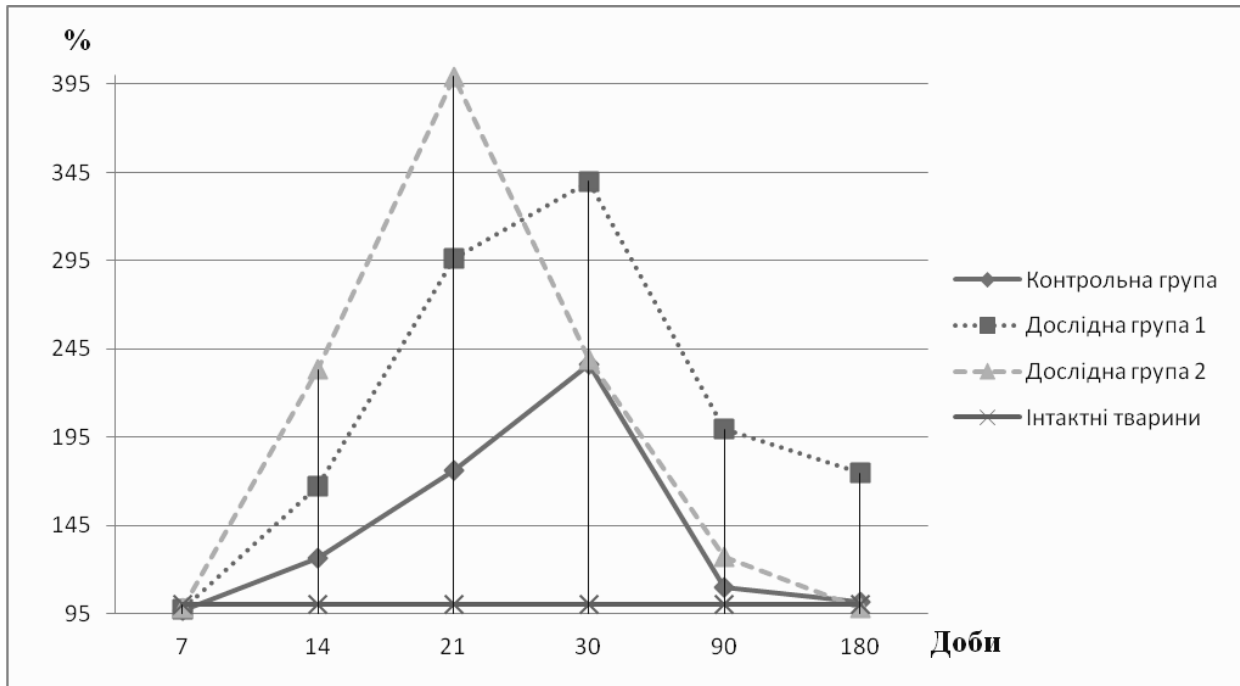


Рис. 2. Динаміка відсоткових значень активності лужної фосфатази в крові експериментальних тварин до показника інтактних (100 %).

У контрольній, як й інших експериментальних групах, на 7 добу відмічалось недовірне зниження активності ЛФ до рівня 96,73 % ($p > 0,05$). На наступні кілька термінів активність ЛФ поступово зростала до 126,79 % ($p > 0,05$) на 14 добу, 176,47 % ($p < 0,05$) на 21 добу та досягала свого найбільшого значення під час спостереження на 30 добу з показником 235,94 % ($p < 0,05$) відносно рівня інтактних тварин. Надалі відбулось різке зниження активності цього ферменту до 109,80 % ($p > 0,05$) на 90 добу та її нормалізація на 180 добу із значенням у 101,96 % ($p > 0,05$).

Схоже статистично недовірне незначне зниження активності ЛФ виявлено й у тварин першої дослідної групи, яке на 7 добу становило 97,38 % ($p > 0,05$). Аналогічно до контролю, у наступні терміни відмічалось активне зростання її ферментативної активності до 167,32 % ($p < 0,05$) на 14 добу, 296,07 % ($p < 0,05$) на 21 добу з досягненням її піку на 30 добу з результатом 399,34 % ($p < 0,05$) значення інтактних тварин. Надалі, також як і у контролі, відмічалось зниження активності ЛФ, але на 90 добу воно ще достовірно переважало фізіологічні показники та становило 199,34 % ($p < 0,05$). І лише на 180 добу рівень активності ЛФ відповідав рівню показників інтактних тварин (98,03 %, $p < 0,05$).

У тварин другої дослідної групи на 7 добу як і в інших групах, зниження активності ЛФ бу-

ло найменшим та складало 98,02 % ($p > 0,05$) від показника інтактних тварин.

На 14 добу її активність різко підросла до 233,33 % ($p < 0,05$) та досягла свого максимуму на 21 добу із значенням у 399,34 % ($p < 0,05$). Зовсім протилежний ефект спостерігався вже на 30 добу, коли активність ЛФ стрімко знизилась до 239,21 % ($p < 0,05$). На 90 добу величина досліджуваного показника ще достовірно відрізнялася від фізіологічного рівня, але була відносно інших груп невеликою та склала 127,45 % ($p < 0,05$). Його нормалізація була відмічена на 180 добу з величиною у 98,03 % із недовірною різницею до значення інтактних тварин ($p > 0,05$).

Висновки. Вказані дані дозволяють зробити висновок, що у контролі, безпосередньо після нанесення травми, достовірно стрімко зростають процеси демінералізації, під яких виявлено на 7 добу. Вже на 14 добу починають домінувати зворотні процеси мінералізації, які досягають свого максимуму на 30 добу, після чого відбувається збалансування обох вказаних антагоністичних процесів.

При заповненні дефекту в щелепі імплантатом, багатим на синтетичний аналог мінеральної складової кістки, процеси демінералізації є дещо меншими, тривають до 7 днів, після чого різко наростають зворотні процеси мінералізації, різко інтенсивні у проміжку між 14 та 30 добами, та зберігають свій позитивний баланс навіть на 90 та 180 добу.

Експериментальні дослідження

У випадку заповнення дефекту імплантатом із меншою кількістю синтетичного мінерального аналогу, після меншої за своєю інтенсивністю демінералізації та її тривалістю до 7 діб, до 21 доби відбуваються процеси мінераліза-

ції із найбільшою її ефективністю. Після цього вже на 30 добу інтенсивність мінералізації стрімко знижується, зберігає свій незначний позитивний баланс на 90 добу та практично повністю нормалізується на 180 добу.

Список літератури

1. Волков Н. М. Физиология метаболизма костной ткани и механизм развития метастазов в кости / Н. М. Волков // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12, № 3. – С. 97–102.
2. Функціональна біохімія сполучної тканини : навч.-метод. посіб. для студ. II курсу / [Л. Д. Попов, В. І. Жуков, Т. В. Горбач та ін.] ; за ред. В. І. Жукова. – Харків : ХНМУ, 2011. – 93 с.
3. Поворознюк В. В. Остеопороз та біохімічні маркери метаболізму кісткової тканини / В. В. Поворознюк // Імплантологія. Пародонтологія. Остеологія. – 2010. – № 1. – С. 17–24.
4. Савка І. Г. Сучасні уявлення про структурну організацію кісткової тканини та їх прикладне значення в судовій медицині / І. Г. Савка // Клінічна та експериментальна патологія. – 2010. – Т. IX, № 1 (31). – С. 101–103.
5. Чечин А. Д. Создание дефекта нижней челюсти у крыс в эксперименте : тезисы XXIV науч. конф. ученых медиков. – Ивано-Франковск, 1989. – С. 110.
6. Кокунин В. А. Статистична обробка даних при малом числе опытов / В. А. Кокунин // Укр. биохимический журнал. – 1975. – Т. 47, № 6. – С. 776–791.
7. Principles of bone Biology: Two-Volume Set / John P. Bielezikian, Lawrence G. Raisz, T. John Martin. – Academic Press, 2008
8. Retzepi M. Guided Bone Regeneration: biologic principles and therapeutic applications / M. Retzepi, N. Donos // Clin. Oral Impl. Res. – 2010. – Vol. 21. – P. 567–576.

Отримано 16.10.16