УДК 591.111.1: 543.544.5

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА НЕКОЛЛАГЕНОВЫХ БЕЛКОВ КОСТНОЙ ТКАНИ СВИНЬИ НА ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ СРАЩЕНИИ ПЕРЕЛОМА ГОЛЕНИ У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ

Мельников С.А., Накоскин А.Н., Лунева С.Н.

ФГБУ «РНЦ ВТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган,
e-mail: luneva_s@mail.ru, melnikov098@mail.ru, nakoskin_a@mail.ru

В данной статье представлен способ получения препарата неколлагеновых белков костной ткани свиньи. Препарат неколлагеновых белков был получен из ткани бедренной кости свиньи путем кислотной деминерализации, диализа и ионообменной хроматографии. Используя гельпроникающую хроматографию, была установлена молекулярная масса белков, входящих в состав полученного препарата. Исследовано изменение биохимических маркеров остеогенеза сыворотки крови при внутрибрюшинном введении полученных препаратов неколлагеновых белков костной ткани лабораторным мышам с переломом голени. В качестве маркеров остеогенеза были выбраны следующие биохимические показатели сыворотки крови – содержание неорганического фосфата, общего кальция, активность общей щелочной фосфатазы, тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы. Введение препарата приводит к снижению активности костного изофермента кислой фосфатазы, снижению содержания неорганического фосфата и ионов кальция в сыворотке крови, а также приводит к значительному увеличению индекса фосфатаз.

Ключевые слова: неколлагеновые белки костной ткани, гельпроникающая хроматография, ионообменная хроматография, остеогенез

RESEARCH OF INFLUENCE OF THE PREPARATION OF NONCOLLAGENIC PROTEINS OF PIG BONE TISSUE ON CHANGES OF BIOCHEMICAL MARKERS OF OSTEOGENESIS AT THE UNION OF THE SHIN FRACTER AT LABORATORY MICE

Melnikov S.A., Nakoskin A.N., Luneva S.N.

The Federal State-Financed Institution Russian Ilizarov Scientific Center
for Restorative Traumatology and Orthopaedics of RF Ministry of healthcare, Kurgan,
e-mail: luneva_s@mail.ru, melnikov098@mail.ru, nakoskin_a@mail.ru

This article present the way of receiving noncollagenic proteins from pigs bone tissue. The preparation of noncollagenic proteins was received from tissue of a femur of a pig by acid demineralization, a dialysis and an ion exchange chromatography. Using a gel permeation chromatography, the molecular mass of the proteins which are a part of the preparation was researched. Researched changes of biochemical markers of osteogenesis in blood serum of laboratory mice with shin fracture model and intraperitoneal injection of noncollagenous proteins of pig bone. As markers of osteogenesis the following biochemical indicators of blood serum – the content of inorganic phosphate, general calcium, activity of alkaline phosphatase and a tartrate-resistant acid phosphatase were chosen. Intraperitoneal injection of a preparation leads to decrease in activity of a tartrate-resistant acid phosphatase and decrease in the content of inorganic phosphate and calcium ions in blood serum. That leads to increase in an integrated phosphatases index.

Keywords: noncollagenic proteins of bone tissue, high performance liquid chromatography, ionexchange chromatography, osteogenesis

Процесс регенерации и ремоделирования костной ткани осуществляется сложным, скоординированным взаимодействием клеток, биологически активных факторов и внеклеточного матрикса [3, 6]. Инициирование процесса регенерации ткани осуществляется ангиогенными и остеогенными факторами роста, которые синтезируются клетками в месте травмы. Существует постоянно дополняющийся список белков, которые продуцируются клетками остеобластной линии и выявлены в минерализованном матриксе костной ткани. В этот список входят: факторы роста, такие как инсулинподобные факторы роста и связывающие их белки, трансформирующие факторы роста, костные морфогенетические белки, тромбоцитарные факторы роста. Здесь названы только немногие белки, у которых установлена способность оказывать аутокринное и паракринное воздействие на клетки костной ткани. Установлено, что многие факторы роста задействованы в эмбриональном развитии скелета и участвуют в системной регуляции метаболизма костной ткани [1, 4, 5].

Исходя из всего вышесказанного, следует признать, что роль местных регуляторов остеогенеза в метаболических процессах многогранна и на данный момент малоизучена. В данной работе нами была предпринята попытка провести исследование биологического действия водорастворимых неколлагеновых белков костной ткани

свиньи на сращение перелома голени у лабораторных мышей.

Цель исследования – провести исследование влияния препарата неколлагеновых белков костной ткани свиньи на изменение биохимических маркеров остеогенеза при сращении перелома голени у лабораторных мышей.

Материалы и методы исследования

Методика выделения неколлагеновых белков костной ткани заключается в последовательном использовании кислотной деминерализации, диализа и фракционирования с помощью ионообменной хроматографии. Таким образом, из смеси водорастворимых неколлагеновых белков костной ткани были получены белки с относительной молекулярной массой от 3,5 до 14 kDa. Полученную смесь исследовали с помощью катионообменной и гельпроникающей хроматографии, чтобы установить состав и молекулярную массу основных фракций смеси [2].

Для получения и исследования препаратов белков костной ткани нами была использована система для высокоэффективной жидкостной хроматографии Shimadzu с ультрафиолетовым детектором и колонками Shodex Protein KW-2002.5 для гельпроникающей хроматографии и Shodex IEC SP-2825 для катионообменной хроматографии. В качестве элюентов для гельпроникающей хроматографии использовали буферный раствор Трис-HCl концентрацией 50 ммоль/л и pH = 7,5. Для ионообменной хроматографии был использован фосфатный буфер концентрацией 20 ммоль/л. Буфер для катионообменной хроматографии имел pH = 6,8. Линейный градиент концентрации элюирующего раствора создавали использованием 0,00–1 М хлористого натрия в 20 мМ фосфатном буфере с соответствующим pH. В качестве калибровочных растворов для гельпроникающей хроматографии использовали набор маркеров молекулярной массы Sigma-Aldrich MWGF 200-1KT.

Биохимическое исследование проводилось на 32 половозрелых самцах лабораторных мышах линии CBA с простым переломом голени. Перелом осуществляли по следующей методике. Предварительно наркотизированное диэтиловым эфиром животное укладывали на живот, на приборный стол, фиксировали голень медиальной стороной на краю приборного стола. Затем производили поднадкостничный перелом костей в верхней трети голени, путем перпендикулярно прикладываемого механического воздействия на продольную ось большеберцовой кости, до появления характерного хруста. Отсутствие смещения отломков отмечали визуально по сохраненной продольной оси голени после манипуляции. Далее, через 48 часов, после осуществления перелома мышам внутрибрюшинно вводили раствор препарата костных белков.

Экспериментальные животные были поделены на две одинаковые группы – опытную и контрольную. Контрольной группе внутрибрюшинно вводили физиологический раствор, опытной – препарат костного белка. Доза препарата составляла 1 мг на 1 кг массы животного. Забор биологического материала проводился через 3 дня после введения. После эвтаназии декапитацией для исследований брали цельную кровь, из которой центрифугированием получали сыворотку. В сыворотке крови изучали содержание общего белка, неорганического фосфата, общего кальция, активность общей щелочной фосфатазы и тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы, которые определяли с помощью автоматического анализатора Stat Fax 1904 Plus, используя наборы реактивов фирмы Vital Diagnostics. Был рассчитан интегральный индекс фосфатаз, представляющий собой отношение активности общей щелочной фосфатазы к активности тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы. Результаты эксперимента обрабатывались методами непараметрической статистики, для описания данных использовались медиана, 75- и 25-процентиль, для оценки достоверности различий между выборками использовался непарный критерий Вилкоксона.

Результаты исследования и их обсуждение

Из 100 г костной ткани было получено 0,896 г белкового лиофилизата. С помощью ионообменной хроматографии нами был получен хроматографический профиль препарата неколлагеновых белков костной ткани свиньи, представленный на рис. 1.

На хроматограмме имеется один пик со временем выхода 41,7 мин. Используя коллектор фракций, была выделена белковая фракция, исследование биологического действия которой было проведено в эксперименте на лабораторных мышах с переломом голени. Полученные данные в результате проведенного эксперимента представлены в табл. 1.

Во всех группах достоверных изменений общего белка и активности щелочной фосфатазы не наблюдалось. Введение препарата неколлагеновых белков костной ткани вызывает достоверное снижение содержания неорганического фосфата и общего кальция в сыворотке крови в среднем на 10 %, также происходило снижение активности костного изофермента кислой фосфатазы на 65 %, что приводит к увеличению значения индекса фосфатаз в 3 раза.

Состав препарата белков костной ткани свиньи, полученный с использованием катионообменной хроматографии, был исследован с помощью гельпроникающей хроматографии, хроматографический профиль представлен на рис. 2.

Масса белкового препарата, наносимого на колонку, составляла 10 мг. На хроматограмме имеется четыре ярко выраженных пика, что говорит о наличии в составе препарата четырех белков. Время выхода пиков и рассчитанная молекулярная масса фракций препарата неколлагеновых белков костной ткани свиньи, полученные с использованием гельпроникающей хроматографии, представлены в табл. 2.

В препарате содержатся протеины с молекулярной массой меньше 3,5 kDa, это говорит о наличии дериватов более крупных белковых молекул.

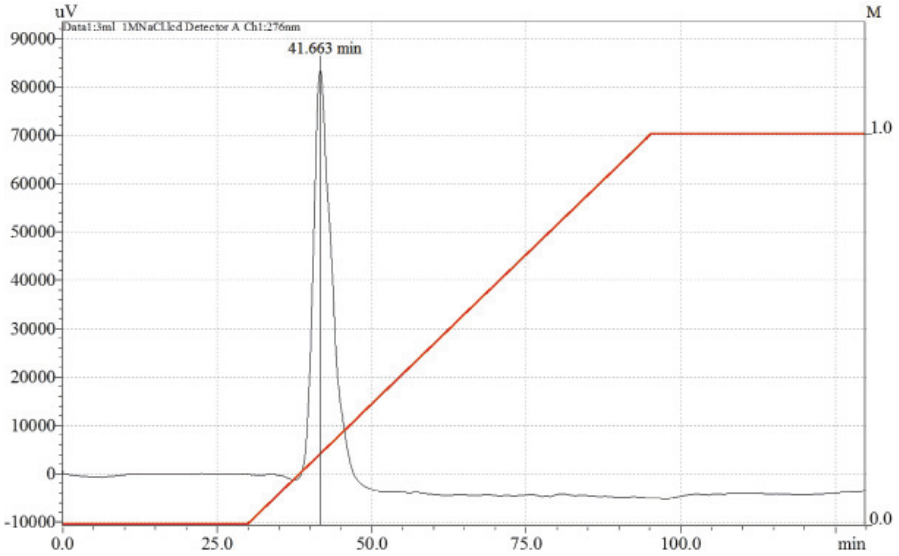

Рис. 1. Хроматографический профиль неколлагеновых белков костной ткани свиньи, полученный с использованием катионообменной хроматографии на колонке Shodex IEC SP-2825, скорость потока 3 мл/мин, светофильтр 276 нм

Таблица 1

Биохимические показатели сыворотки крови лабораторных мышей с моделью перелома голени при внутрибрюшинном введении препарата неколлагеновых белков костной ткани свиньи

Показатель / Группа	ЩФ, Е/л	КФ, Е/л	Индекс фосфатаз ЩФ/КФ	Ca^{2+}, ммоль/л	PO_4^{3-}, ммоль/л	ОБ, г/л
Контрольная группа	90,1 86,5–109,1	4,97 4,10–8,21	18,5 12,6–19,4	2,53 2,66–2,85	2,60 2,40–3,22	55,64 54,96–66,90
Группа с введением препарата	104,7 80,2–115,2	1,71* 1,45–1,87	59,8* 56,9–62,3	2,24* 2,18–2,63	2,31* 2,14–2,41	54,84 52,13–58,20

Примечания. Данные представлены в виде медианы; 25- и 75-процентиль.
* – достоверные отличия при уровне значимости $p < 0,05$ в сравнении с контрольным значением.

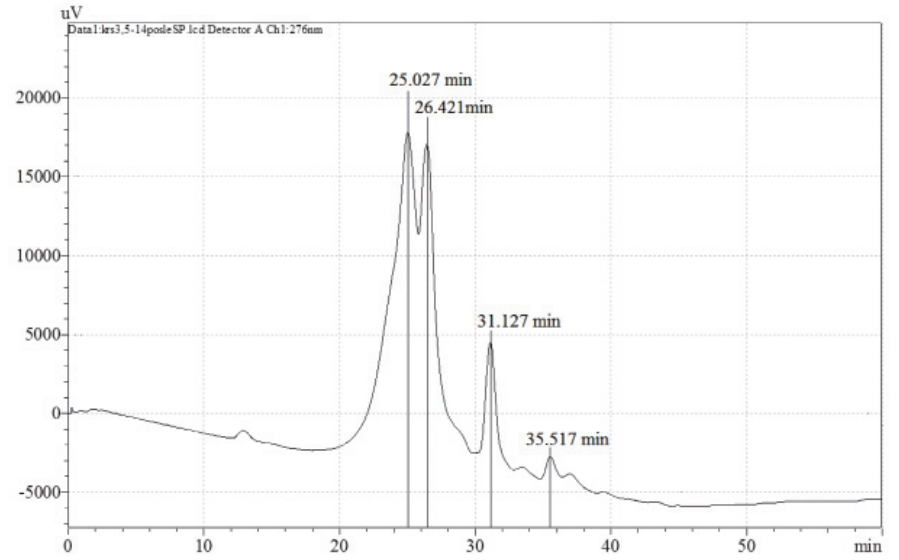

Рис. 2. Хроматографический профиль неколлагеновых белков костной ткани свиньи, полученный с использованием гельпроникающей хроматографии на колонке Shodex KW-2002,5; скорость потока 2,5 мл/мин, светофильтр 276 нм

Таблица 2

Время выхода пиков и рассчитанная молекулярная масса фракций неколлагеновых белков костной ткани свиньи, полученные с использованием гельпроникающей хроматографии на колонке Shodex Protein KW-2002.5

Время выхода, мин	Молекулярная масса, kDa
25,027	14,248 ± 0,109
26,421	9,597 ± 0,112
31,127	2,528 ± 0,110
35,517	0,728 ± 0,117

Заключение

Исследование полученного препарата неколлагеновых белков костной ткани свиньи с помощью гельпроникающей хроматографии выявило наличие в его составе четырех белков с молекулярными массами 14,248, 9,597, 2,528 и 0,728 kDa.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови экспериментальных животных показал, что при внутрибрюшинном введении препарата низкомолекулярных белков костной ткани свиньи наблюдается значительное снижение активности костного изофермента кислой фосфатазы и снижение содержания неорганического фосфата и общего кальция в сыворотке крови. Увеличение индекса фосфатаз в 3 раза в экспериментальной группе относительно контрольной свидетельствует о смещении равновесия в процессе костного ремоделирования в сторону остеогенеза.

Список литературы

1. Лунева С.Н., Талашова И.А., Осипова Е.В., Накоскин А.Н., Еманов А.А. Экспериментально-морфологическое исследование влияния кальцийфосфатных соединений и неколлагеновых костных белков на репаративный процесс в костной ткани // Гений ортопедии. – 2012. – № 1. – С. 119–123.

2. Накоскин А.Н., Лунева С.Н., Мельников С.А. Опыт применения хроматографической системы Shimadzu с препаративными колонками для получения и очистки биологически активных веществ из костной ткани // Новые химико-фармацевтические технологии: сб. науч. трудов. – 2012.– С. 263–267.

3. Павлова Л.А., Павлова Т.В., Нестеров А.В. Современное представление об остеоиндуктивных механизмах регенерации костной ткани. Обзор состояния проблемы // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2010. – № 10. – С. 26–31.

4. Шевцов В.И., Волокотина Е.А., Лунева С.Н., Гребнева О.Л., Ковинька М.А., Талашова И.А., Стогов М.В., Накоскин А.Н., Силантьева Т.А., Кононович Н.А., Петровская Н.В., Ткачук Е.А., Гасанова А.Г., Еманов А.А., Гайдышев А.И. О перспективах использования наноматериалов в лечении повреждений и заболеваний тканей опорно-двигательной системы.// Гений ортопедии. – 2008. – № 4. – С. 26–31.

5. Ashish D. Diwan, Anthony Leong, Richard Appleyard, Divya Bhargav, Zhi Ming Fang, Aiqun Wei. Bone morphogenetic protein-7 accelerates fracture healing in osteoporotic rats // Indian journal orthopaedics. – 2013. Nov-Dec.– P. 540–546.

6. Hilal G., Massicotte F., Martel-Pelletier J., Fernandes J.C. Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. // J. Bone Miner. Res. – 2001. – Vol. 16, № 4. – P. 713–721.

References

1. Luneva S.N., Talashova I.A., Osipova E.V., Nakoskin A.N., Emanov A.A. Jeksperimental'no-morfologicheskoe issledovanie vlijanija kal'cijfosfatnyh soedinenij i nekollagenovyh kostnyh belkov na reparativnyj process v kostnoj tkani – Genij ortopedii, 2012, № 1, pp. 119–123.

2. Nakoskin A.N., Luneva S.N., Melnikov S.A. Opyt primenenija hromatograficheskoj sistemy Shimadzu s preparativnymi kolonkami dlja poluchenija i ochistki biologicheskiaktivnyh veshhestv iz kostnoj tkani – Novye himiko-farmaceftichеskie tehnologii, 2012, pp. 263–267.

3. Pavlova L.A., Pavlova T.V., Nesterov A.V. Sovremennoe predstavlenie ob osteoinduktivnyh mehanizmah regeneracii kostnoj tkani. Obzor sostojanija problemi – Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta, 2010, no. 10, pp. 26–31.

4. Shevcov V.I., Volokotina E.A., Luneva S.N., Grebneva O.L., Kovin'ka M.A., Talashova I.A., Stogov M.V., Nakoskin A.N., Silant'eva T.A., Kononovich N.A., Petrovskaja N.V., Tkachuk E.A., Gasanova A.G., Emanov A.A., Gajdyshev A.I. O perspektivah ispol'zovanija nanomaterialov v lechenii povrezhdenij i zabolevanij tkanej oporno-dvigatel'noj sistemy – Genij ortopedii, 2008, no. 4, pp. 26–31.

5. Ashish D Diwan, Anthony Leong, Richard Appleyard, Divya Bhargav, Zhi Ming Fang, Aiqun Wei. Bone morphogenetic protein-7 accelerates fracture healing in osteoporotic rats // Indian journal orthopaedics. 2013. Nov-Dec. P. 540–546.

6. Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC. Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. // J. Bone Miner. Res. 2001. Vol. 16, no. 4. pp. 713–721.

Рецензенты:

Стогов М.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, ФГБУ РНЦ ВТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган;

Матвеева Е.Л., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, ФГБУ РНЦ ВТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган.

Работа поступила в редакцию 18.03.2014.