

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.718-001.5-036.85-008.9-074

Стогов М.В., Киреева Е.А., Карасев А.Г.

ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ ЗАМЕДЛЕННО СРАСТАЮЩИХСЯ ПЕРЕЛОМАХ КОСТЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова»
Минздрава России, 640014, Курган

Цель – сравнительный анализ метаболического профиля и содержания факторов роста в сыворотке крови пациентов с замедленно срастающимися переломами костей нижней конечности.

Оценена концентрация метаболитов, факторов роста и активность ферментов сыворотки крови у 13 пациентов с замедленно срастающимися переломами бедра и голени (основная группа). Группу сравнения составили 14 пациентов со сросшимися переломами бедра и голени.

У пациентов с замедленно срастающимися переломами в отличие от пациентов со сросшимися переломами в сыворотке крови наблюдалась достоверно повышенная концентрация триглицеридов, продуктов гликолиза, эпидермального фактора роста (EGF) и трансформирующих факторов роста – TGF α и TGF β_2 . Снижено содержание витамина E и инсулиноподобного фактора роста I (IGF-1).

Данные маркеры можно отнести к потенциальным маркерам диагностики и прогноза развития замедленно срастающихся переломов.

Ключевые слова: метаболит; факторы роста; замедленно срастающийся перелом.

M.V. Stogov, E.A. Kireeva, A.G. Karasev

THE LABORATORY EVALUATION OF PATHOGENIC FACTORS UNDER RETARDED CONSOLIDATION OF FRACTURES OF BONES OF LOWER EXTREMITIES

The G.A. Ilizarov Russian research center "The regenerative traumatology and orthopedics" of Minzdrav of Russia, 640014 Kurgan, Russia

The study was carried out to comparatively analyze metabolic profile and content of growth factors in blood serum of patients with retarded consolidation of fractures of bones of lower extremities. The evaluation was applied to concentration of metabolites, growth factors and enzyme activity of blood serum in 13 patients with retarded consolidation of fractures of thigh and shank bones (main group). The comparative group included 14 patients with solid fractures of thigh and shank bones. The analysis established that as compared to patients with solid fractures of bones, in patients with retarded consolidation of fractures blood serum contained reliably higher concentration of triglycerides, products of glycolysis, epidermal growth factor and transforming growth factors TGF- α and TGF- β_2 . The content of vitamin E and insulin-like growth factor (IGF-1) was decreased. The given markers can be labeled as potential markers of diagnostic and prognosis of development of retarded consolidation of fractures.

Keywords: metabolite; growth factor; retarded consolidation of fracture

Введение. Разработка критериев оценки остеорепаляции, прогнозов ее исходов, а также мониторинг состояния пациентов в посттравматическом периоде являются актуальной проблемой лабораторной диагностики. В этом направлении проведен ряд исследований, посвященных поиску информативных биохимических критериев [1–4]. Интенсивно разрабатываются и критерии оценки тяжести травмы на основе анализа цитокинового профиля сыворотки крови пациентов [5–8].

Исследования, посвященные этой проблеме, направлены в основном на получение прогностических формул, позволяющих определять тяжесть травмы и вероятный ее исход в остром периоде, при поступлении пострадавшего в стационар. При этом критерии оценки отдаленных результатов, так же как и доступные маркеры прогноза течения и мониторинга остеогенеза, до настоящего времени разработаны не в полной мере.

Цель исследования – сравнительный анализ метаболического профиля и содержания факторов роста в сы-

воротке крови пациентов с замедленно срастающимися переломами костей нижней конечности.

Материалы и методы. Исследования сыворотки крови проведены у 13 пациентов с замедленно срастающимися переломами бедра и голени (основная группа). Возраст больных колебался от 29 до 59 лет. Группу сравнения составили 14 пациентов со сросшимися переломами бедра и голени (возраст 36–50 лет). У всех пациентов обеих групп была одинаково точная репозиция.

Для оценки белково-азотистого обмена в сыворотке крови пациентов определяли концентрацию общего белка (ОБ), альбумина, мочевины, С-реактивного белка (СРБ). Изменения липидного обмена оценивали по концентрации в крови общего холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ). Углеводный обмен изучали по динамике содержания глюкозы, молочной (МК) и пировиноградной (ПВК) кислоты. Минеральный и водно-солевой обмен оценивали по содержанию в сыворотке крови общего кальция, неорганического фосфата, магния, калия, натрия, хлоридов. Интенсивность перекисного окисления изучали по изменению концентрации продуктов перекисного окисления белка (ПОБ) в крови, по интенсивности хемилуминесценции. Антиоксидантную систему оценивали по содержанию в сыворотке крови витаминов А и Е.

Обмен органического компонента костного матрикса оценивали по динамике активности щелочной фосфата-

Для корреспонденции:

Стогов Максим Валерьевич, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии

Адрес: 640014, Курган, ул. М. Ульяновой, 6

E-mail: stogo_off@list.ru

зы (ЩФ) и тартратрезистентного изофермента кислой фосфатазы (ТрКФ) в сыворотке крови. Состояние скелетных мышц и висцеральных органов оценивали по активности креатинкиназы (КК), АсАТ, АлАТ и ЛДГ в крови.

В сыворотке крови определяли концентрацию ангиопоэтина-2 (Ang-2), фактора стволовых клеток (SCF), эпидермального фактора роста (EGF), васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF), трансформирующих факторов роста ($TGF\alpha$, $TGF\beta_1$, $TGF\beta_2$), тромбоцитарных факторов роста (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB), инсулиноподобных факторов роста (IGF-1 и IGF-2).

Активность КК, ЛДГ, ЩФ, ТрКФ, АсАТ, АлАТ, а также концентрацию МК, общего белка, альбумина, мочевины, глюкозы, общего холестерина, триглицеридов, общего кальция, неорганического фосфата, магния, СРБ в сыворотке крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi/ВМ 902 (Япония), используя наборы реагентов фирмы Vital Diagnostics (Россия), содержание натрия, калия и хлоридов – ионселективным методом на ионселективном блоке биохимического анализатора Hitachi/ВМ 902. В депротеинизированной сыворотке определяли содержание ПВК по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Продукты ПОБ сыворотки крови выявляли в белковом осадке по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Продукты реакции регистрировали при длинах волн 270 (ПОБ270), 363 и 370 нм (ПОБ363). Степень окисленной модификации белков выражали в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.) на 1 мг белка. Интенсивность хемилюминесценции и концентрацию витаминов Е и А в крови определяли на анализаторе Флюорат-02-АБЛФ-Т (Россия). Концентрацию факторов роста определяли иммуноферментным методом на фотометре EL 808 (БИО-ТЕК Inc., США), используя наборы реактивов фирмы R&D Systems (США), Biotang Inc. (США), Life Science Inc. (США), Invitrogen (США).

Исучаемые показатели сравнивали с аналогичными показателями у 15 практически здоровых людей в возрасте от 26 до 50 лет. Для выявления статистической значимости различий использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

На проведение клинического исследования получено разрешение комитета по этике при ФГБУ РНЦ ВТО им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России.

Результаты и обсуждение. Метаболические профили сыворотки крови у пациентов обеих групп представлены на рис. 1. Согласно полученным данным, у пациентов с замедленно срастающимися переломами в отличие от пациентов со сросшимися переломами в сыворотке крови наблюдался достоверно повышенный уровень ТГ, ПВК, производство лактата и пирувата (МК · ПВК), а также почти вдвое сниженное содержание витамина Е.

У пациентов с замедленно срастающимися переломами костей нижней конечности по сравнению со здоровыми людьми в сыворотке крови была достоверно увеличена концентрация EGF, $TGF\alpha$ и $TGF\beta$, на фоне вдвое сниженного уровня IGF-1 (рис. 2).

Высокие концентрации в сыворотке трансформирующих факторов роста оказывают значительное влияние на функциональное состоя-

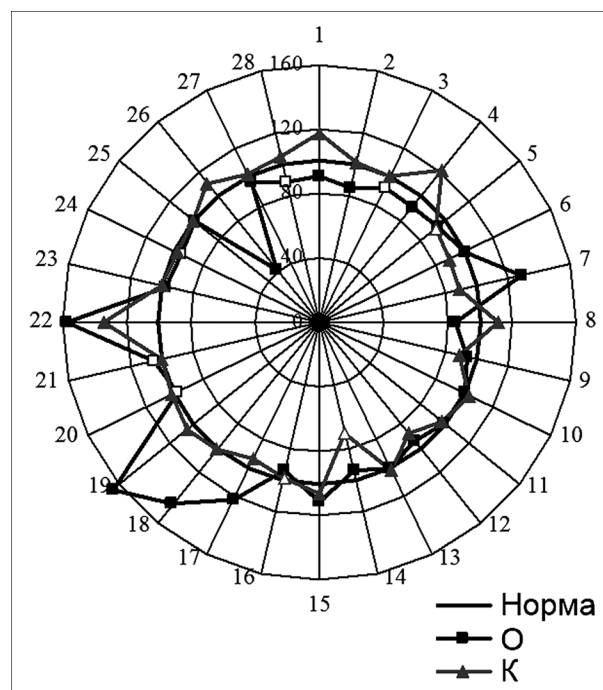


Рис. 1. Метаболические профили сыворотки крови пациентов с замедленно срастающимися переломами (О) и пациентов со сросшимися переломами (К). Значения нормы взяты за 100%.

1 – ЩФ; 2 – ТрКФ; 3 – Са; 4 – Р; 5 – Mg; 6 – ЛДГ; 7 – КК; 8 – АлАТ; 9 – АсАТ; 10 – ЩФ/ТрКФ; 11 – ОБ; 12 – альбумин; 13 – СРБ; 14 – мочевины; 15 – ПОБ272; 16 – ПОБ363; 17 – МК; 18 – ПВК; 19 – МК · ПВК; 20 – глюкоза; 21 – ХС; 22 – ТГ; 23 – Na; 24 – К; 25 – Cl; 26 – витамин Е; 27 – витамин А; 28 – хемилюминесценция. Белые маркеры – достоверные отличия от нормы при $p < 0,05$.

ние систем и органов организма человека, поскольку мишенями этих факторов служат клетки различных тканей и органов. В частности, у обследованных нами пациентов с замедленно срастающимися переломами высокий уровень TGF прежде всего мог приводить к модуляции иммунной системы (ингибирующее влияние) и подавлению гемопоэза [9]. Кроме того, $TGF\alpha$ и $TGF\beta_2$ могут оказывать разнонаправленное непосредственное влияние на костную ткань. С одной стороны

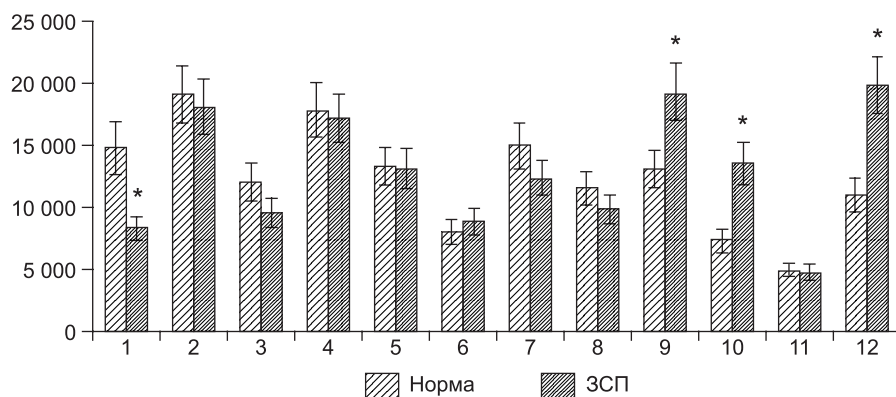


Рис. 2. Концентрация факторов роста (в пг/мл) в сыворотке крови пациентов с замедленно срастающимися переломами (ЗСП).

1 – IGF-1*2; 2 – IGF-2*0,1; 3 – VEGF*50; 4 – ANG-2*10; 5 – SCF*10; 6 – PDGF-AA*2; 7 – PDGF-AB; 8 – PDGF-BB*5; 9 – EGF*1000; 10 – $TGF\alpha$ *1000; 11 – $TGF\beta_1$; 12 – $TGF\beta_2$ *10.

* – достоверность различий с нормой при уровне значимости $p < 0,05$.

TGF β_2 – мощный стимулятор выработки коллагена, с другой – оба трансформирующего фактора (TGF α и TGF β_2) значительно активируют остеокласты, тем самым усиливая резорбцию кости [10]. Поддержанию высокой резорбтивной активности у пациентов с замедленно срастающимися переломами способствовало повышение концентрации EGF, который стимулирует через взаимодействие с остеокластами увеличение высвобождения кальция из костной ткани, также способствуя ее остеолиту [11]. Усугублял резорбтивную активность у обследованных пациентов и развивавшийся, как указывалось выше, метаболический ацидоз, сопровождавшийся накоплением в крови недоокисленных продуктов распада (лактат, пируват).

На фоне высокой концентрации ростовых факторов, поддерживающих остеолит, у пациентов с замедленно срастающимися переломами был снижен уровень ростового фактора, стимулирующего анаболизм кости, а именно IGF-1, так как показано, что репаративные возможности костной ткани при низком уровне данного фактора значительно снижены [12, 13].

Таким образом, у пациентов с замедленно срастающимися переломами одним из ведущих патофизиологических механизмов замедления сращения являлась высокая активность остеорезорбции (поддерживаемая группой факторов роста) на фоне развивающегося местного ацидоза.

Заключение. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что основными метаболическими нарушениями, определяющими патогенез и репаративные возможности костной ткани у пациентов с замедленно срастающимися переломами, являются: высокая активность факторов роста, вызывающих и поддерживающих остеолит; снижение влияния анаболического эффекта инсулиноподобного фактора роста 1; локальный метаболический ацидоз.

Наличие у обследованных пациентов выявленных метаболических нарушений позволяет выделить некоторые маркеры диагностики и прогноза развития замедленно срастающихся переломов: рост концентрации ТГ, ПВК, произведения продуктов гликолиза (МК · ПВК), уровня EGF и трансформирующих факторов роста – TGF α и TGF β_2 , а также снижение содержания витамина E и IGF-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мамаев В.И. Чрескостный остеосинтез и возможности прогнозирования исходов лечения последствий переломов костей. *Вестник травматологии и ортопедии*. 2008; 3: 25–30.
2. Устьянцева И.М. Лабораторная диагностика при политравме. *Политравма*. 2008; 4: 51–9.
3. Стогов М.В., Лунева С.Н., Ткачук Е.А. Биохимические показатели в прогнозировании течения остеорепаративных процессов при травме костей скелета. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; 12: 5–8.
4. Лунева С.Н., Ткачук Е.А., Стогов М.В. Биохимические показатели в оценке репаративного остеогенеза у пациентов с различными типами скелетной травмы. *Гений ортопедии*. 2010; 1: 112–5.
5. Миromanov А.М., Намоконов Е.В., Герасимов А.А., Миронова О.Б., Усков С.А., Миromanova Н.А. Диагностика воспалительных осложнений у пациентов с переломами длинных трубчатых костей в послеоперационном периоде. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; 4: 7–9.
6. Коханов А.В., Белопасов В.В., Метелкина Е.В., Демичев Н.П., Ларионов А.А., Суринков Д.Б. и др. Взаимосвязь уровней сывороточных, острофазовых белков и онкомаркеров с количественной оценкой тяжести травмы и общего состояния пострадавших. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 9: 40а–40.

7. Zimmermann G., Henle P., Kusswetter M., Moghaddam A., Wentzensen A., Richte W. et al. Трансформирующий фактор роста (ТФР)- β_1 как маркер замедленного сращения переломов. *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2009; 1: 57–65.
8. Goebel S., Lienau J., Rammoser U., Seefried L., Wintgens K.F., Seufert J. et al. FGF23 is a putative marker for bone healing and regeneration. *J. Orthop. Res.* 2009; 27 (9): 1141–6.
9. Heldin C.-H., Miyazono K., Dijke P. Ten TGF-b signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997; 390: 465–71.
10. Ibbotson K.J., Harrod J., Gowen M., D'Souza S., Smith D.D., Winkler M.E. et al. Human recombinant transforming growth factor alpha stimulates bone resorption and inhibits formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83 (7): 2228–32.
11. Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 1990; 265 (14): 7709–12.
12. Bernstein A., Mayr H.O., Hube R. Can bone healing in distraction osteogenesis be accelerated by local application of IGF-1 and TGF-beta1? *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2010; 92 (1): 215–25.
13. Fowlkes J.L., Thrailkill K.M., Liu L., Wahl E.C., Bunn R.C., Cockrell G.E. et al. Effects of systemic and local administration of recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) on de novo bone formation in an aged mouse model. *J. Bone Miner. Res.* 2006; 21 (9): 1359–66.

REFERENCES

1. Mamaev V.I. Transosseous osteosynthesis and potentialities for outcome prognosis in treatment of bone fracture sequelae. *Vestnik travmatologii i ortopedii*. 2008; 3: 25–30. (in Russian)
2. Ust'yantseva I.M. Laboratory diagnostics in polytrauma. *Politravma*. 2008; 4: 51–9. (in Russian)
3. Stogov M.V., Luneva S.N., Tkachuk E.A. Biochemical parameters in the prediction of the course of osteoreparative processes in skeletal injury. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; 12: 5–7. (in Russian)
4. Luneva S.N., Tkachuk E.A., Stogov M.V. Biochemical measurements in reparative osteogenesis. evaluation in patients with skeletal trauma of different types. *Geniy ortopedii*. 2010; 1: 112–5. (in Russian)
5. Miromanov A.M., Namokonov E.V., Gerasimov A.A., Mironova O.B., Uskov S.A., Miromanova N.A. Diagnosis of inflammatory complications in patients with long bone fractures in the postoperative period. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; 4: 7–9. (in Russian)
6. Kokhanov A.V., Belopasov V.V., Metelkina E.V., Demichev N.P., Lariонов A.A., Surinkov D.B. et al. Association of the levels of serum acute phase proteins and oncomarkers with the quantitative assessment of injury severity and general condition in victims. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 9: 40a–40. (in Russian)
7. Zimmermann G., Henle P., Kusswetter M., Moghaddam A., Wentzensen A., Richte W. et al. Transforming growth factor (TGF)- β_1 as a marker of delayed fracture healing. *Ortopediya, travmatologiya i protezirovaniye*. 2009; 1: 57–65. (in Russian)
8. Goebel S., Lienau J., Rammoser U., Seefried L., Wintgens K.F., Seufert J. et al. FGF23 is a putative marker for bone healing and regeneration. *J. Orthop. Res.* 2009; 27 (9): 1141–6.
9. Heldin C.-H., Miyazono K., Dijke P. Ten TGF-b signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997; 390: 465–71.
10. Ibbotson K.J., Harrod J., Gowen M., D'Souza S., Smith D.D., Winkler M.E. et al. Human recombinant transforming growth factor alpha stimulates bone resorption and inhibits formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83 (7): 2228–32.
11. Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 1990; 265 (14): 7709–12.
12. Bernstein A., Mayr H.O., Hube R. Can bone healing in distraction osteogenesis be accelerated by local application of IGF-1 and TGF-beta1? *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2010; 92 (1): 215–25.
13. Fowlkes J.L., Thrailkill K.M., Liu L., Wahl E.C., Bunn R.C., Cockrell G.E. et al. Effects of systemic and local administration of recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) on de novo bone formation in an aged mouse model. *J. Bone Miner. Res.* 2006; 21 (9): 1359–66.

Поступила 10.04.14

Received 10.04.14