

УДК 616.72-036.1-06:616.36-092.9

©І. Я. Демків, Н. Є. Лісничук, О. Я. Шутурма

ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”

Центральна науково-дослідна лабораторія

ПРОГНОСТИЧНІ МАРКЕРИ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЬНИХ УРАЖЕНЬ СУГЛОБІВ ЗА УМОВ СУПУТНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

ПРОГНОСТИЧНІ МАРКЕРИ РОЗВИТКУ ЗАПАЛЬНИХ УРАЖЕНЬ СУГЛОБІВ ЗА УМОВ СУПУТНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ – При експериментально змодельованих патологічних умовах встановлено істотне порушення мікроелементного стану кістки, на що вказує зниження у крові та в кістковій тканині концентрацій кальцію, фосфору, калію. Відмічено збільшення вмісту оксипроліну в сироватці крові, що свідчить про дефекти колагенування, переважання процесів розпаду цього білка над процесами його синтезу. Одночасно в обох досліджуваних субстратах виявлено істотне збільшення концентрацій лужної та кислій фосфатаз, що є маркерами активного запального процесу та цитолізу. Спостерігається підвищений синтез основних класів імуноглобулінів (з переважанням вмісту Ig G) та посилене утворення імунних комплексів, а також помірне зниження активності фагоцитуючих мононуклеарів.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ СУСТАВОВ ПРИ СОПУТСТВУЮЩЕМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ – При экспериментально смоделированном патологическом процессе установлено существенное нарушение микроэлементного состояния кости, на что указывает снижение в крови и в костной ткани концентраций кальция, фосфора, калия. Отмечено увеличение содержания оксипролина в сыворотке крови, что свидетельствует о дефектах коллагенообразования и преобладании процессов распада этого белка над процессами его синтеза. Одновременно в обоих исследуемых субстратах выявлено существенное увеличение концентраций щелочной и кислой фосфатаз, которые являются маркерами активного воспалительного процесса и цитолиза. Наблюдается повышенный синтез основных классов иммуноглобулинов (с преобладанием содержания Ig G) и усиленное образование иммунных комплексов, а также умеренное снижение активности фагоцитирующих мононуклеаров.

PROGNOSTIC MARKERS OF INFLAMMATORY JOINTS LESIONS DEVELOPMENT IN CONCOMITANT LIVER DAMAGE – In experimentally simulated pathological process major modification of microelemental bone condition is determined, indicated by the decrease of concentrations of calcium, phosphorus and potassium in the blood and osseous tissue. It is fixed the increase of hydroxyproline content in the blood serum, that is a sign of defects in collagen formation and the predominance of decay processes of the protein over the processes of its synthesis. Simultaneously, it is identified the significant increase in the concentrations of acid and alkaline phosphatases in both studied substrates, that is a marker of active inflammation and cytolysis. It is observed an increased synthesis of the major classes of immunoglobulins (dominated by the content of Ig G) and increased formation of immune complexes, as well as a moderate decrease in the activity of mononuclear phagocytes.

Ключові слова: експериментальна патологія печінки, остеоартроз, імунна система, кісткова тканина.

Ключевые слова: экспериментальное поражение печени, остеоартроз, иммунная система, костная ткань.

Key words: experimental liver damage, osteoarthritis, immune system, osseous tissue.

ВСТУП В останні роки здійснюється інтенсивний пошук можливих біологічних маркерів (БМ) деградації

й репарації тканин суглобів (головним чином, хрящової й кісткової), які повинні відображати ці динамічні зміни, слугувати предикторами прогнозу остеоартрозу (ОА) та маркерами ефективності лікування [1–3]. Відкриття нових і більш глибоке вивчення відомих БМ дозволить краще зрозуміти механізми патогенезу ОА. Суттєве значення в цьому процесі має складна регуляція метаболізму кісткової тканини та кальцію в організмі. Метаболізм кальцію в кістковій тканині (у процесі росту, розвитку, ремоделювання) та підтримання кальцієвого гомеостазу в організмі (постійна концентрація кальцію у крові на рівні 11 мг) — поєднані процеси, а їх узгодження регулюється і контролюється на системному рівні. Порушення метаболізму кальцію при ОА виявляється у розвитку системних змін в кістковій тканині, які відіграють значну роль в подальшому прогресуванні ураження суглобів. Поряд з дегенерацією суглобового хряща, в патологічний процес при ОА залучається і кісткова тканина, передусім субхондральна кістка [4]. Не дарма зміни в ній (порушення внутрішньокісткової гемодинаміки, венозний застої, остеоконденсація, зміни кісткової архітектоники, мікропереломи) виявляють вже на ранніх стадіях розвитку ОА. Зниження мінеральної щільності кісткової тканини призводить до більш виразної деградації хрящової тканини [5].

Серед катіонів, наявних в організмі людини, іон магнію (Mg^{2+}) знаходиться на четвертому місці за поширеністю (після калію і кальцію). З фізіологічної точки зору до 53 % магнію концентрується у кістковій тканині і близько 20 % – в тканинах з високою метаболічною активністю (мозок, серце, м'язи, надниркові залози, нирки, печінка). Ще однією речовиною, яка бере активну участь у формуванні кісткової системи, є фосфор. Разом із кальцієм фосфор є основою кісткової тканини. Практично всі процеси життєдіяльності пов'язані з вмістом фосфору в організмі, тому що його сполуки постачають організм енергією, яку використовують у м'язових скороченнях, проявах нервових імпульсів, біосинтезі інших органічних речовин, а також у надходженні речовин та їхніх сполук у клітини. Таким чином, фосфор бере участь у всіх обмінних процесах організму.

Одним із діагностичних маркерів оцінки стану сполучної тканини є рівень оксипроліну [6]. Оксипролін (природний L-O) – є специфічною складовою частиною білків сполучної тканини – колагену й еластину, а також желатинів. Одним із продуктів перетворення оксипроліну в організмі є глютамінова кислота. За рівнем його екскреції оцінюють стан сполучної тканини. Збільшення вмісту оксипроліну свідчить про дефекти колагенування, переважання процесів розпаду цього білка над процесами його синтезу [7, 8].

Лужна фосфатаза (ЛФ) та кисла фосфатаза (КФ) каталізують перенесення фосфорильного залишку в ре-

акція гідролізу та трансфосфорилування моноалкілфосфатів і включаються в регуляцію важливих біологічних процесів [9]. Тому вихід в кров лізосомальних ферментів вважається ознакою глибокої руйнації клітин і розглядається як неспецифічна ознака запалення.

Метою роботи було з'ясувати особливості перебігу метаболічних та імунологічних процесів в організмі піддослідних тварин при первинному токсичному ураженні печінки.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Дослідження виконано на 50 статевозрілих безпородних білих щурах-самцях з масою тіла (150±5) г, яких утримували за стандартними умовами виварію. Всі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили із дотриманням правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, а також згідно з Науково-практичними рекомендаціями з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [10, 11].

Піддослідних тварин поділили на такі групи: контрольна – 20 особин; експериментальна група тварин із змодельованим хронічним токсичним ураженням печінки – 30 особин. Моделлю токсичного ураження печінки слугувала тривала інтоксикація тетрахлорметаном (CCl₄). Тетрахлорметан вводили внутрішньочеревинно у вигляді 50 % олійного розчину в дозі 0,2 мл на 100 г маси тіла тварини 3 рази в тиждень [12]. Через 30 днів від початку введення CCl₄ тварин виводили з експерименту в умовах знеболювання тіопенталом натрію.

Активність ЛФ, КФ, калію, кальцію, магнію, фосфору в сироватці крові та гомогенаті кістки, а також визначали концентрації імуноглобулінів А, М, G (Ig A, Ig M, Ig G) у сироватці крові турбодиметричним методом з використанням напівавтоматичного біохімічного аналізатора "Humalyser 2000" і наборів реактивів фірми "Human" (Німеччина). Рівень оксипроліну досліджували за методикою [13].

Дослідження вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові проводили шляхом преципітації у поліетиленгліколі (ПЕГ-6000) за методикою [14]. В цільній крові визначали активність фагоцитуючої системи, а саме: фагоцитарне число та відсоток фагоцитуючих лейкоцитів [15]. Отриманий в результаті експерименту цифровий матеріал було систематизовано та об-

роблено за допомогою методів варіаційної статистики з використанням програми "Microsoft Exel 6,0" [16].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ В результаті введення тетрахлорметану впродовж 30 днів спостерігали достовірне зростання ЛФ у сироватці крові (на 11,6 %) та гомогенаті кістки (на 37,9 %) відносно аналогічних показників у групі контрольних тварин (табл. 1). Збільшення активності лужної фосфатази у тканинах людини спостерігають при патологічних станах кісткової системи, печінки та інших органів. У піддослідних тварин із змодельованим хронічним гепатитом також спостерігали зростання активності КФ у сироватці крові та гомогенаті кістки (на 34,5 та 52,5 % відповідно) порівняно з контрольними тваринами. Зростання активності КФ у крові вказує на цитоліз, коли цитоплазма клітин заокислюється, лізосоми розпадаються і ферменти, що з них вивільнюються, руйнують клітини.

У результаті проведених досліджень встановлено, що концентрація кальцію в сироватці крові та гомогенаті кістки достовірно знижувалась (на 18,2 та 18,4 % відповідно) у групі тварин з токсичним гепатитом порівняно з аналогічним показником контрольної групи тварин. Втрата внутрішньоклітинного іонного гомеостазу супроводжується зменшенням концентрації іонів калію в цитозолі. У результаті хронічного ураження печінки в експерименті спостерігали достовірне зниження концентрації калію в сироватці крові (на 20,9 %) та гомогенаті кістки (на 28,7 %) порівняно з контрольним показником. Концентрація магнію у групі тварин після хронічного введення тетрахлорметану в сироватці крові зростає (на 30,1 %), тоді як у гомогенаті кістки достовірно зменшується (на 38,7 %) порівняно з контролем.

Аналіз результатів проведених досліджень виявив достовірне зниження концентрації фосфору як в сироватці крові, так і в гомогенаті кістки піддослідних тварин: на 32,3 та 35,8 % відповідно у групі тварин з токсичним гепатитом по відношенню до аналогічного показника у групі інтактних тварин.

У результаті змодельованої паталогії печінки концентрація оксипроліну в сироватці крові перевищує аналогічний показник контрольної групи тварин на 36,4 %. Результати проведеного дослідження вказують на те, що хронічна паталогія печінки призводить до виражених структурно-функціональних змін артикулярних та пері-

Таблиця 1. Біохімічні показники сироватки крові та гомогенату кістки білих щурів за хронічного ураження печінки (M±m)

Показник	Контрольна група	Хронічне ураження печінки
ЛФ, Од/л (кров)	452,37±10,47	514,97±10,60 **
ЛФ, Од/кг (кістка)	1510,62±30,49	2083,82±111,91***
КФ, Од/л (кров)	19,32±1,09	45,22±2,91 ***
КФ, Од/кг (кістка)	216,03±3,64	329,43±7,18 ***
Магній, ммоль/л (кров)	0,83±0,003	1,08±0,04 ***
Магній, ммоль/кг (кістка)	1,11±0,02	0,68±0,03 **
Калій, ммоль/л (кров)	5,32±0,09	4,21±0,03 ***
Калій, ммоль/кг (кістка)	3,38±0,10	2,41±0,08 ***
Кальцій, ммоль/л (кров)	6,27±0,24	5,13±0,19**
Кальцій, ммоль/кг (кістка)	5,72±0,07	4,67±0,05***
Фосфор, ммоль/л (кров)	3,62±0,14	2,45±0,09***
Фосфор, ммоль/кг (кістка)	3,63±0,32	2,33±0,09***
Оксипролін, мкмоль/л	33,84±0,81	46,15±2,32 ***

Примітка. Тут і в наступній таблиці дослідження: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

артикулярних тканин колінного та кульшового суглобів, що супроводжуються переважанням катаболічної фази над синтезною в метаболізмі колагену – основного білка кістково-хрящової тканини.

Імунологічну реактивність організму експериментальних тварин оцінювали за станом показників гуморального імунітету (концентрація IgG A, M, G, ЦІК); неспецифічну резистентність – за функціональною активністю фагоцитів крові (табл. 2).

Таблиця 2. Показники імунологічної реактивності організму білих щурів при експериментальному ураженні печінки (M±m)

Показник	Група тварин	
	контроль	хронічний гепатит
ЦІК, ум.од.	51,56±0,29	261,5±37,4***
Ig A, г/л	0,523±0,004	1,35±0,02 ***
Ig M, г/л	0,684±0,013	2,19±0,08 ***
Ig G, г/л	1,884±0,038	5,44±0,09 ***
ФАЛ:		
ФЧ	3,54±0,02	3,11±0,03 **
% ФЛ	34,79±0,12	30,11±0,3 ***

Дослідження концентрацій сироваткових IgG A, M, G виявило, що на тлі тетрахлорметанового ураження концентрація достовірно зростає: Ig A – у 2,5 рази, Ig M – у 3,2 рази, Ig G – у 2,8 рази порівняно з аналогічними показниками у групі контрольних тварин. Приведена динаміка свідчить про напруження системи гуморального імунітету організму. Дослідження концентрації ЦІК виявило, що при токсичному ураженні печінки достовірно зростає концентрація ЦІК (у 5,1 рази) порівняно з аналогічним показником у групі контрольних тварин. Оцінку розмірів імунних комплексів проводили з обчисленням коефіцієнта патогенності K ($K = K_4/K_3$) як співвідношення їх рівнів за преципітації у 4 та 3 % розчинах ПЕГ-6000. У групі досліджуваних тварин встановлено значення K в межах 1,0 – 1,5, що свідчило про переважаюче накопичення імунних комплексів малого та середнього розмірів, які здатні фіксувати комплемент та володіють вираженим патогенним потенціалом.

Дослідження фагоцитарної активності лейкоцитів (ФАЛ) у тварин вказаних груп виявило істотне зниження двох основних параметрів даної системи: кількості фагоцитів (% ФЛ) на 15,5 % та їх поглинальної здатності (ФЧ) на 12,1 % відносно аналогічних показників контрольної групи тварин. Факт різкого зниження ФАЛ у щурів з експериментальним ураженням печінки свідчить на користь того, що при цій патології спостерігається перевищення “порогу ємності” фагоцитуючої системи, виникають дефекти в системі елімінації ЦІК, внаслідок чого поглиблюються деструктивні явища в досліджуваному органі.

ВИСНОВКИ На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що за умов хронічного токсичного ураження печінки відбуваються дегенеративні процеси у суглобовому хрящі, що супроводжується підвищеним синтезом основних класів імуноглобулінів, накопиченням ЦІК та розладами функціонування фагоцитуючих лейкоцитів. Розвивається запалення у синовіальній оболонці, спостерігаються дефекти колагенотворення, на що вказує збільшення вмісту оксипроліну в сироватці крові та порушення мікроелементного стану кістки, а саме зниження у

сироватці крові та в кістковій тканині концентрацій кальцію, фосфору і калію.

Перспективи подальших досліджень Встановлення особливостей стану ферментної ланки антиоксидантної системи при запаленні суглобів за первинного ураження печінки, а також корекція патологічних змін даної системи є перспективним напрямком подальших наукових досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коваленко В. Н. Остеоартроз : практическое руководство / В. Н. Коваленко, О. П. Борткевич. – Киев : Морион (2003). – 448 с.
2. Рекалов Д. Г. Развитие системного остеопороза та функціональної недостатності суглобів у хворих на ранній ревматоїдний артрит / Д. Г. Рекалов // Український медичний часопис. – 2011. – № 5. – С. 112–115.
3. Проценко Г. О. Актуальність застосування нестероїдних протизапальних засобів при остеоартрозі / Г. О. Проценко, Н. С. Бойчук // Український ревматологічний журнал. – 2007. – № 3 (29). – С. 44–47.
4. Федів О. І. Стан сполучної тканини при пептичній виразці шлунка та дванадцятипалої кишки з супутнім ураженнями гепатобіліарної системи у хворих різного віку / О. І. Федів // Український медичний часопис. – 2002. – № 5. – С. 134–137.
5. Коррекция нарушенной процессов метаболизма коллагена при посттравматическом артрите в эксперименте / М. И. Шутова, С. А. Козлов, А. Н. Захватов, С. И. Кузнецов // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – С. 45–48.
6. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва [та ін.]; під ред. І. П. Кайдешева. – Полтава : Полімет, 2003. – 320 с.
7. Міщенко В. В. Вміст оксипроліну та лікозаміногліканів у сечі хворих на виразкову хворобу шлунка, що проживають в Одесі в умовах сучасної екологічної ситуації / В. В. Міщенко, С. В. Мерліч // Український медичний часопис. – 2012. – № 1. – С. 12–15.
8. Лисенко І. В. Діагностична цінність оксипроліну й арахідонової кислоти як біологічних маркерів деградації хрящової тканини / І. В. Лисенко // Український ревматологічний журнал. – 2011. – № 7. – С. 40–44.
9. Гречаніна О. Я. Ефективність використання сучасних методів діагностики остеопорозу при синдромі Шерешевського-Тернера / О. Я. Гречаніна, О. В. Бугайова, М. В. Лонич // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики : зб. наук. пр. – Луганськ, 2010. – Вип. 19. – С. 71–80.
10. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – Київ : Авіцена, 2002. – 156 с.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 56 p.
12. Доклинические исследования лекарственных средств : методические рекомендации / под ред. А. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2002. – 568 с.
13. Магомедов С. Биохимические изменения в биологических жидкостях при развитии остеопороза коленного сустава / С. Магомедов, И. М. Зазирный, Т. А. Кузуб // Вісник ортопедії, травматології та протезування. – 2003. – № 1. – С. 33–38.
14. Гриневич Ю. А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных / Ю. А. Гриневич, А. М. Алферов // Лабораторное дело. – 1981. – № 8. – С. 493–495.
15. Чернушенко Е. Ф. Иммунологические методы исследования в клинике / Е. Ф. Чернушенко, Л. С. Когосова. – К. : Здоров'я, 1978. – 159 с.
16. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.

Отримано 24.05.13