

*На правах рукописи*



003490697

**Шотников Николай Кириллович**

**Морфолого – метаболические аспекты защитного действия гипоксена при  
переломе кости и глюкокортикоидном остеопорозе  
(экспериментальное исследование)**

16.00.02 – патология, онкология и морфология животных

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**28 ЯНВ 2010**

Благовещенск - 2009

Работа выполнена на кафедре анатомии, физиологии, патофизиологии, акушерства, гинекологии и биотехники размножения животных при ФГОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия»

**Научный руководитель:** - доктор ветеринарных наук, профессор  
**Ильина Ольга Петровна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Хибхенов Лопсондоржо Владимирович**  
кандидат ветеринарных наук, доцент  
**Курятова Елена Вячеславовна**

**Ведущая организация:** ФГОУ ВПО «Алтайский государственный аграрный университет», г. Барнаул

Защита диссертации состоится « 25 » декабря 2009 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета ДМ 220.027.02 при ФГОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет» в институте ветеринарной медицины и зоотехнии в аудитории 1(а) по адресу: 675005 г. Благовещенск, ул. Политехническая 86. Электронный адрес: E-mail: IVMZ\_dalgau@mail; <http://www.dalgau.ru>; факс: (4162) 44-65-44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
ФГОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет»

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009 г.

Ученый секретарь



Андреев М.В.

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Проблема повышения эффективности лечения патологии костей опорного скелета всех видов сельскохозяйственных и домашних животных остается одной из наиболее актуальных в ветеринарной медицине (Жуков В.М., 1988; Козлов Е.М., 1998; Анников В.В., 2004; Дерхо М.А., 2004; Дерхо М.А., Концвая С.Ю., 2004; Каримов Ф.А., 2005; Сахно Н.В., 2006; Кигорка Р., 2006; Борисов М.С., 2008; Robson К.Е., 2008). Особенно проблемными эти вопросы являются для повышения эффективности лечения переломов у служебных и домашних собак (Тейлор П.М., Хаултон Д.Э.Ф., 1999; Денеж Э., Муасанье П., 2006), травматизм которых, за первые годы 21 века увеличился на 12-16 % (Комарова Е.В., Суховольский О.К., 2006). Практика показывает, что даже идеально выполненное хирургическое вмешательство не всегда является достаточным условием для выявления восстановительных потенциалов, заложенных в минерализованном органе как биологической структуре.

Механизмы развития остеопороза при травмах костных органов, включают в себя нарушение системы микроциркуляции, активации анаэробного окисления глюкозы, и характеризуются снижением вклада аэробной энергетики, закислением внутренней среды костей скелета, что приводит к активации остеокластической резорбции (Ninomiya J.T., 1999; Harada S., Rodan G.A., 2003). Исходя из этого, можно предполагать, что препараты, обладающие ангиогипоксическими свойствами, могут оказывать профилактический и терапевтический эффект при переломах костей и остеопорозе, поскольку одним из важнейших патогенетических механизмов, объединяющих эти формы костной патологии, является развитие гипоксического состояния.

Настоящая работа является комплексным разделом госбюджетной тематики "Особенности регуляции желез внутренней секреции при патологии и

различных уровнях обмена веществ" (номер государственной регистрации 01.2.00900999), которая выполнена самостоятельно на кафедре «Анатомии, физиологии и патофизиологии животных» в ФГОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия»

**Цель исследования.** Экспериментальное изучение защитного действия антигипоксического препарата гипоксена при переломе кости и глюкокортикоидном остеопорозе.

**Задачи исследования:**

1. На модели экспериментального перелома бедренной кости у белых крыс изучить эффект гипоксена на метаболизм глюкозы и морфолого-гистохимическую картину печени.

2. Исследовать гистоморфологические и биохимические особенности посттравматического регенерата бедренной кости белых крыс в условиях применения гипоксена.

3. Изучить возможность определения суммарного содержания нуклеиновых кислот для оценки зрелости костного регенерата.

4. На модели экспериментального глюкокортикоидного остеопороза у старых крыс-самок изучить протективный эффект гипоксена на потерю основных органических и минеральных компонентов костной ткани.

**Научная новизна работы.** Морфологическими и биохимическими методами исследования получены результаты, дополняющие на примере перелома кости представления о нарушении метаболизма глюкозы и накоплении молочной кислоты при тяжелых травматических повреждениях организма животных. Показано, что антигипоксический препарат гипоксен в этих экспериментах способствует более эффективной утилизации лактата, поддержанию нормогликемии и депо гликогена в печени, что приводит к созданию условий для более эффективного формирования внеклеточного матрикса и его минерализации, о чем свидетельствуют данные

морфометрии костной мозоли и результаты ее химического и гистоморфологического анализа.

Приоритетными являются результаты о защитном действии гипоксена при потере костной массы в условиях моделирования глюкокортикоидного остеопороза у старых крыс-самок.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты работы расширяют существующие взгляды о роли таких системных факторов, как гипоксия, активация гликолиза, состояние депо гликогена в печени и метаболический ацидоз в патогенезе травматических повреждений. Полученные данные позволяют рассматривать позитивное действие гипоксена при экспериментальном переломе кости и глюкокортикоидном остеопорозе как восстановление нарушенного кислородного метаболизма, которое проявляется, не только локально, но имеет и системный характер.

**Публикации.** По результатам исследований опубликовано пять статей в сборниках международных, региональных, межвузовских научно - практических конференций, две – в рецензируемых изданиях, входящих в основной Перечень, рекомендуемый ВАК РФ.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на: региональной научно–практической конференции «Актуальные вопросы развития регионального АПК» (Иркутск, 2007); международной научно–практической конференции «Совместная деятельность сельскохозяйственных товаропроизводителей и научных организаций в развитии АПК Центральной Азии» (Иркутск, 2008); международной научно–практической конференции, посвященной 70– летию заведующего кафедрой терапии и клинической диагностики профессора Тарнуева Ю.А. «Актуальные вопросы электрофизиологии и незаразной патологии животных» (Улан–Удэ, 2009); на выставке «Зооветиндустрия -08»

(Иркутск, 2008); на расширенном заседании кафедр анатомии, физиологии, патофизиологии, акушерства, гинекологии и биотехники размножения животных, внутренних незаразных болезней, клинической диагностики и фармакологии, микробиологии, паразитологии, эпизоотологии, патанатомии и ветсанэкспертизы, Иркутской ГСХА (Иркутск, 2009).

**Результаты исследований** внедрены в учебный процесс на кафедрах: анатомии, гистологии, морфологии, патоморфологии, физиологии, патофизиологии, акушерства, гинекологии и биотехнике размножения животных – в государственных аграрных университетах – Дальневосточном, Хакасском, Алтайском; в государственных сельскохозяйственных академиях - Бурятской, Иркутской, Санкт-Петербургской; а также внедрены в производство ФГОУ ВПО ИргСХА ФКЭО «Айболит», ООО «Байкалвет».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 107 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследований, собственных исследований, обсуждения результатов исследований и выводов. Библиографический список включает 211 источников, из них 65 иностранных. Диссертация иллюстрирована, 8 таблицами, 19 рисунками, из них 14 фотографий. Работа написана на русском языке.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. В процессе посттравматической регенерации костной ткани и при глюкокортикоидном остеопорозе наблюдается нарушение метаболизма глюкозы с накоплением молочной кислоты.

2. Антигипоксический препарат гипоксен в условиях его применения при экспериментальном переломе кости у белых крыс и при глюкокортикоидном остеопорозе у старых животных оказывает протективный эффект.

## 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе всего было исследовано 99 беспородных белых крыс: при экспериментальном исследовании репаративного остеогенеза было использовано 72 беспородных белых крыс – самцов массой 180-220 г в возрасте - 2,5 – 3 года, (рис. 1), находящихся в условиях учебного vivария, факультета биотехнологии и ветеринарной медицины, клинико-экспериментального отдела «Айболит» Иркутской государственной сельскохозяйственной академии.

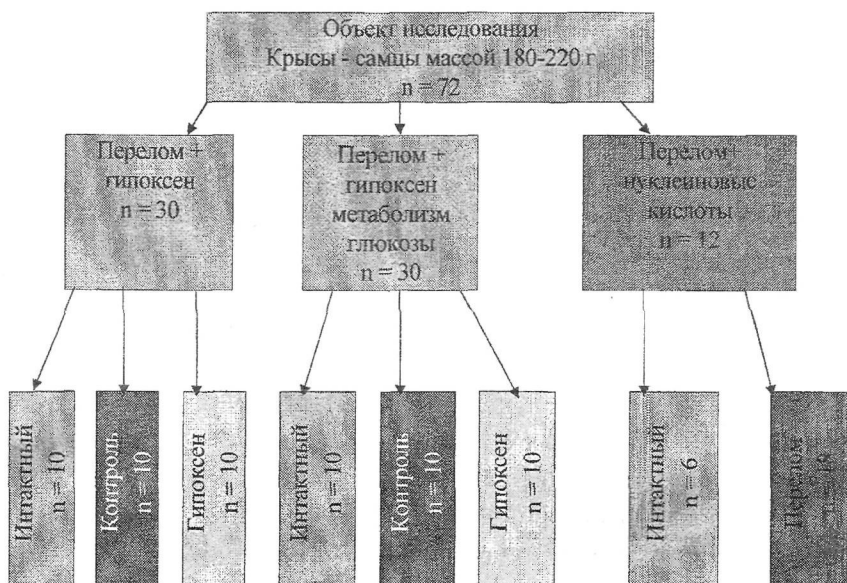


Рис.1. Материал исследований.

Для моделирования остеопороза использовали 27 беспородных белых крыс - самок 400-440 г, которые были закуплены в питомнике института биофизики (г. Ангарск) и содержались в vivарии академии с марта 2006 г (рис. 2).

Масса опытных животных замерялась при помощи электронных весов BE 157 E W 91939 (1г до 16 кг).

Морфометрические показатели микроскопических структур бедренной кости и ее регенерата при помощи окуляр – микрометра МОВ – 15 (ГОСТ – 151 – 50 - 69).

При изучении эффекта гипоксена на процесс экспериментального репаративного остеогенеза препарат в зависимости от поставленных целей давали вместе с кормом в дозе 5-10 мг на одну голову.

Были проведены исследования на определение содержания органических и минеральных компонентов: коллагена, неколагеновых белков, гексурованных кислот, лимонной кислоты, общего кальция и фосфора (Каракашов А., Вивичев Е., 1967), Грибанов Г.А., Базанов А.Х., 1976), метаболизма глюкозы; гликогена в печени (Портянная Н.И., 1990), глюкозо – 6 – фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ; КФ 1.1.1.49); молочной кислоты; активность фосфатаз (КФ3.1.3.2). Содержание органических и минеральных компонентов рассчитывали на сухую массу, которую определяли при высушивании костной ткани при 105° С. до постоянного веса.

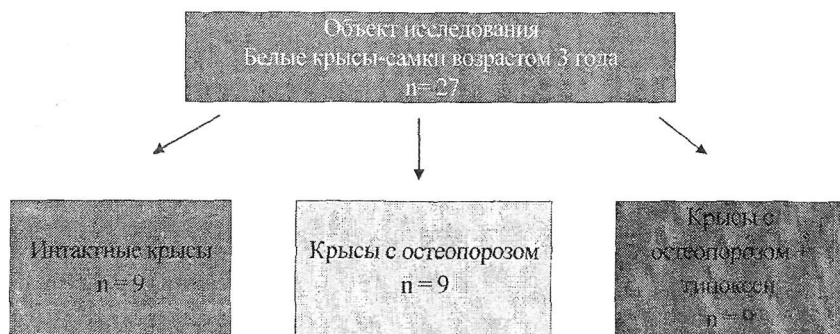


Рис. 2. Схема исследования влияния гипоксена на глюкокортикоидный остеопороз.



Для морфологических исследований использовали образцы печени, диафиза бедренной кости крыс и его регенерата.

Образцы минеральных тканей фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Затем пробы декальцинировали 5% раствором азотной кислоты, промывали дважды в двух сменах 96% этилового спирта по четыре часа в каждой из двух сменах хлороформа длительностью по 3 минуты, а затем заливали в парафин. Для получения гистологических препаратов получали срезы толщиной 7-10 мкм и окрашивали гематоксилин – эозином или пикрофуксинном по ван Гизону (Меркулов Г.А., 1969).

Для количественной оценки некоторых параметров костного регенерата (толщина и высота), и интактной кости (толщина кортикальной пластинки) проводили морфометрические исследования срезов минеральных структур по Г.Г. Автандилову (1980).

Образцы печени, взятой из одной и той же доли, фиксировали в растворе Шабдаша, окраску на гликоген проводили с помощью Шифф – реакции (ШИК – PAS - реакция), сущность которой заключается в окислении перйодной кислотой спиртовых групп полисахарида до альдегидных, дающих с реактивом Шиффа лилово-красное окрашивание. Для контроля использовали обработку срезов забуференным раствором амилазы (Пирс Э., 1962).

Во время изучения детали препаратов описывались и фотографировались. Фотографирование препаратов осуществлялось цифровым фотоаппаратом «Olimpus C-725». Окрашенные гистологические препараты исследовались под световым микроскопом с объективами x10, x40 и окуляром x10.

Весь цифровой материал был обработан методом вариационной статистики (Плохинский Н.А, 1970; Меркурьев Е.К., 1970) с использованием стандартной компьютерной программы Microsoft Excel, а достоверность определяли по t – критерию Стьюдента.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенного исследования было установлено, что гипоксен оказывает защитный эффект при остеопорозе и заживлении экспериментального диафизарного перелома бедренной кости у белых крыс при исследовании механизмов репаративного остеогенеза и его оптимизации, являющихся классическими и хорошо изученными объектами под влиянием разнообразных фармакологических препаратов, изучение которых имеет длительную историю и которое продолжается в настоящее время. Не имея возможности отразить широчайший спектр соединений, которые используются как факторы, предотвращающие потерю костной массы и оптимизирующие остеогенез, отметим только те из них, которые изучены в последние 10 - 12 лет. Так, было установлено, что применение некоторых силатранов, например, мивала ускоряет рост и увеличивает прочность костей цыплят-бройлеров (Скопцов В.А., 1998). Сходный эффект был обнаружен при использовании  $\alpha$  - кетоглутаровой кислоты при слабости конечностей (leg weakness) у индеск (Tatara M.R., 2004).

Хорошие результаты при лечении переломов получены при использовании диметилсульфоксида (Концева С.Ю., 1997), коллапана (Башкатова Н.А., 1999), препаратов, полученных из кости (Козлов Н.А., 2006; Хубутия М.Ш., 2008), белков яичного желтка (Леет К.Н., 2004),  $\beta$ -интерлейкина (Столяров С.Г., Виденин В.Н., 2000), гомеопатические препараты (Узелкова С.Ю., 2004), травмагин и травмагель (Славецкая М.Б., 2006), препаратов сел - плекса (Сахно Н.В., 2006а) и «Дафес» (Пальцев С.С., 2006), тимогена (Леонова С.В., 2006; Сахно Н.В., 2008). Весьма интересными можно считать продолжение работ по использованию для лечения переломов таких гормональных препаратов, как метил - андростеналон и кальцитонин (Козлов Н.А., 2000а) и опиоидных пептидов (Ляшев Ю.Д., 2005). Перспективными являются попытки оптимизировать репаративный остеогенез у 8 - месячных крыс Wistar с помощью воздействия на систему генерации оксида азота (Chi D.,

2005) и систему перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты (Sontakue A.N., Tare R.S., 2002).

Перечень приведенных здесь препаратов и точки их приложения на отдельные метаболические системы костной ткани и ее регенерата не охватывает всего объема реальных научных исследований и эмпирических подходов, так или иначе имеющие своей целью предотвратить потерю костной массы у старых животных или у животных с напряженным обменом минеральных солей. Это положение характерно также и для применения разнообразных фармакологических факторов, потенциально перспективных для оптимизации механизмов восстановления поврежденной кости.

Важно подчеркнуть, что внедрение в практику ветеринарной остеологии современных хирургических методов лечения разнообразных видов костной патологии, включая адаптированные к животным универсальные технологии, связанные с применением метода Г.А. Илизарова, не решило проблемы разработки эффективных способов лечения переломов костей, не говоря уже о защите скелета от потери костной массы. Следует отметить, что применяемый во многих странах мира метод чрескостного остеосинтеза по Г.А. Илизарову для лечения травматических повреждений костей и ортопедических заболеваний первоначально был разработан на собаках. Главная трудность, с которой столкнулись специалисты в области лечения патологии костей, заключается в том, что техническое совершенство хирургических методов оказалось недостаточным для того, чтобы восстановить сложные взаимодействия органов и систем, нарушенных при повреждении костей или вследствие врожденных или приобретенных дефектов метаболизма, в том числе ятрогенного характера.

Осознание этого факта явилось той движущей силой, мощным мотивационным стимулом, которые обусловили появление огромного количества работ по изысканию фармакологических средств, которые в комплексе с адекватными хирургическими методами могут кардинально решить

проблему разработки эффективных методов лечения не только механических повреждений костей, но и обусловленных метаболическими поломками. Вместе с тем, применение в экспериментальной и клинической практике ветеринарной остеологии фармакологических факторов, некоторые из которых были нами перечислены выше, связано с воздействием их на отдельные этапы жизнедеятельности или метаболические процессы минерализованной ткани. Исходя из общетеоретических представлений о любом органе, включая кость, он представляет собой функциональную систему, поддерживающий свой гомеостаз за счет многосторонних взаимодействий компонентов внутри системы с одновременной интеграцией в целостный организм, который в данной случае является для нее системой высшего порядка. Среди разнообразных факторов, участвующие в поддержании гомеостаза любой системы, а также при грубом ее повреждении целесообразно выделить факторы, которые лимитируют функционирование значительного числа компонентов, являясь для других компонентов системы структурами высшего порядка.

Таковыми факторами, по мнению большого, числа исследователей, являются механизмы биоэнергетики, которые являются термодинамической основой для протекания реакций анаболизма, без которых немыслима реализация любых восстановительных процессов костной ткани и поддержание на генетически заданном уровне соотношения органических и минеральных компонентов, обеспечивающем костному органу уникальные биомеханические характеристики.

### **3.1 Влияние гипоксена на метаболизм глюкозы и морфолого – гистохимическую картину печени**

Исследование влияния гипоксена на состояние репаративного остеогенеза через 2 дня после его начала, проведенное в настоящем диссертационном исследовании показало, что изученный антигипоксический препарат на модели экспериментального диафизарного перелома бедренной кости у белых крыс

снижает содержание молочной кислоты в сосудистом русле, препятствует развитию посттравматической гипергликемии, сохраняет энергетический потенциал в форме стабилизации депо гликогена печени и активирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, направляющей метаболизм по анаболическому пути. Стабилизации пула гликогена в печени подтверждается результатами морфогистохимических исследований, которые указывают на снижение содержания этого запасного полисахарида через 2 дня после перелома в экспериментах без применения гипоксена и его сохранение при потреблении этого антигипоксического препарата с кормом.

Таблица 1 - Влияние гипоксена, добавленного в корм крысам (10 мг в сутки в течение 2 суток), на показатели метаболизма глюкозы при экспериментальном переломе через 48 часов  $M \pm m$ ,  $n = 10$

Показатели	Интактные крысы			Перелом			Перелом+гипоксен		
	$M \pm m$	t	Уровень значимости	$M \pm m$	t	Уровень значимости	$M \pm m$	t	Уровень значимости
Глюкоза, ммоль/л	3,9± 0,14	27,86	P< 0,001	6,1± 0,15	40,67	P< 0,001	4,5± 0,17	26,4 7	P< 0,001
Лактат, моль/л	1,7± 0,13	13,08	P< 0,001	3,1± 0,15	20,67	P< 0,001	1,5± 0,14	10,7 1	P< 0,001
Гликоген, мг/г	45,9± 2,80	16,39	P< 0,001	21,4± 1,70	12,59	P< 0,001	61,8± 5,70	10,8 4	P< 0,001
Г-6-ФДГ, нмоль в мин на мг бслка	5,8± 0,55	10,55	P< 0,001	3,0± 0,46	6,52	P< 0,001	8,1± 0,59	13,7 3	P< 0,001

### **3.2 Гистоморфологические и биохимические особенности посттравматического регенерата бедренной кости белых крыс в условиях применения гипоксена**

Исследование влияния гипоксена на формировании компонентов мозоли через четыре недели после перелома выявило определенную закономерность в его фармакологической активности: препарат вызывал ускорение образования органических составляющих регенерата (коллаген, не коллагеновые белки, протеогликаны, гексуроновые и нуклеиновые кислоты), которые к моменту окончания эксперимента вытеснялись активным включением в органическую матрицу минеральных веществ, в связи, с чем их содержание в мозоли было ниже, а минеральных веществ выше, чем аналогичных веществ в регенерате крыс, не получавших антигипоксант.

В этих исследованиях было также установлено, что антигипоксический препарат активировал биосинтез и включение в минеральную фазу регенерата лимонной кислоты, высокое содержание которой в костной мозоли свидетельствует о более высокой степени развития регенерата по направлению к формированию зрелой биомеханически валидной структуры.

Гистоморфологические исследования костного регенерата при даче животным гипоксена также свидетельствуют о более высоком уровне развития костной мозоли, о чем говорит практически полное сращение пластинок плотной кости и незначительным объемом регенерата, в котором отсутствовали скопления хондроцитов в эндоосте. Участок плотной костной ткани в месте перелома представляет вполне сформировавшуюся кость с хорошо выраженными каналами остеонов и надкостницей, хотя со стороны эндооста еще остаются небольшие полоски эндоостальной мозоли. О более высокой степени развития процесса репарации свидетельствуют также результаты морфометрических измерений, согласно которым высота и толщина регенерата

при использовании антигипоксического препарата статистически значимо меньше, чем аналогичные показатели у животных, не получавших гипоксен.

### 3.3 Определения суммарного содержания нуклеиновых кислот для оценки зрелости костного регенерата

В процессе изучения органических компонентов мозоли, образующихся в динамике консолидации сломанной кости (3, 6 и 10 недель после перелома), было установлено, что определение суммарного количества нуклеиновых кислот может служить высокоинформационным маркером зрелости регенерата и кости, содержание которых имеет отрицательную корреляционную зависимость высокой силы с концентрацией в этих структурах лимонной кислоты.

Потребление экспериментальными животными с кормом гипоксена в течение 28 дней после перелома бедренной кости показало, что этот препарат поддерживает низкий уровень лактата в крови и стабилизирует на уровне интактных животных соотношение активностей костного изофермента щелочной фосфатазы и тартрат-резистентной кислотой фосфатазы, которое свидетельствует о сохранении динамического равновесия между процессами костеобразования и остеокластической резорбции.

Таблица 2 - Суммарное содержание нуклеиновых кислот (мг/г ткани) и лимонной кислоты (мкмоль/г ткани) в интактной костной ткани белых крыс и в ее регенерате после экспериментального перелома, M±m, n=6

Время после перелома, нед.	Компоненты костного регенерата					
	Нуклеиновые кислоты			Лимонная кислота		
	M±m	t	Уровень значимости	M±m	t	Уровень значимости
Интакт. диафи з	2,1 ± 0,08	26,25	P<0,001	22,6 ± 0,60	37,67	P<0,001
3	9,1 ± 0,45	20,22	P<0,001	5,4 ± 0,40	13,50	P<0,001
6	5,3 ± 0,34	15,60	P<0,001	9,8 ± 0,80	12,25	P<0,001
10	3,0 ± 0,20	15,00	P<0,001	14,5 ± 0,70	20,71	P<0,001

\*представлены среднесарифметические величины из шести определений

### **3.4 Протективный эффект влияния гипоксена на потерю основных органических и минеральных компонентов костной ткани**

В опытах с применением гипоксена у старых крыс, у которых моделировался остеопороз, антигипоксический препарат гипоксен тормозил потерю костной массы, вызванную длительным поступлением препарата глюкокортикоидного гормона, о чем свидетельствовала стабилизация содержания в костной ткани общего кальция и фосфора. Наблюдаемый эффект гипоксена ассоциировался с сохранением концентрации молочной кислоты, торможением активности тартрат-резистентной кислой фосфатазы и некоторой стимуляцией костного изофермента щелочной фосфатазы, по сравнению с соответствующими показателями, измеренными у экспериментальных животных, которые с кормом не получали гипоксен.

Добавление в корм экспериментальным животным преднизолона более чем в 2,5 раза снижает активность щелочной фосфатазы (табл.3), что, исходя из представлений о клеточной локализации фермента, может свидетельствовать или о подавлении функции osteoобразующих клеток или о снижении их количества. Потребление экспериментальными животными одновременно с преднизолоном гипоксена увеличило активность костного изофермента щелочной фосфатазы, однако ее уровень оставался почти в два раза ниже по сравнению с аналогичной величиной в группе интактных животных (табл.3).

Тем не менее, отмеченное нами повышение активности фермента более чем на треть по сравнению с аналогичной величиной в подопытной группе с преднизолоном оказывает определенный положительный эффект на предотвращение развития остеопороза, так как свидетельствует о стимуляции остеобразования.



Таблица 3 - Влияние гипоксена на уровень системных показателей, связанных с гомеостазом костной ткани, при моделировании глюкокортикоидного остеопороза у старых белых крыс-самок,  $M \pm m$ ,  $n=9$

Показатели*	Характер экспериментальной серии								
	Интактные крысы			Преднизолон			Преднизолон + гипоксен		
	( $M \pm m$ )	t	Уровень значимости	( $M \pm m$ )	t	Уровень значимости	( $M \pm m$ )	t	Уровень значимости
Лактат, ммоль/л	1,5 ± 0,10	15,00	P < 0,001	4,3 ± 0,40	10,50	P < 0,001	2,2 ± 0,20	11,00	P < 0,001
Щелочная фосфатаза, мкмоль в час/л	149,0 ± 9,00	16,55	P < 0,001	57,0 ± 6,00	9,50	P < 0,001	79,0 ± 4,00	19,75	P < 0,001
Кислая фосфатаза, мкмоль в час/л	5,2 ± 0,50	10,40	P < 0,001	18,9 ± 0,70	27,00	P < 0,001	7,9 ± 0,60	13,16	P < 0,001
Отношение активностей	26,8 ± 1,80	14,88	P < 0,001	3,0 ± 0,20	15,00	P < 0,001	10,0 ± 0,90	11,11	P < 0,001

Таким образом, при использовании антигипоксического препарата в настоящем исследовании при различных видах костной патологии показало, что ведущим саногенетическим фактором при переломе кости и развитии глюкокортикоидного остеопороза является более эффективная утилизация молочной кислоты, что предотвращает дисрегуляцию энергетического обмена и состояния кислотно-основного равновесия, усиливает анаболическую направленность обмена, тормозит активность кислых протеиназ и остеокластической резорбции с повышением или сохранением уровня процессов новообразования кости. Совокупное действие этих факторов в результате приводит к оптимизации репаративного остеогенеза

при диафизарном переломе и стабилизации костной массы в условиях моделирования экспериментального остеопороза.

Таблица 4 - Содержание минеральных и органических компонентов костной ткани при совместном потреблении крысами преднизолона и гипоксена,  $M \pm m$ ,  $n=9$

Показатель*	Характер экспериментальной серии								
	Интактные крысы			Преднизолон			Преднизолон + гипоксен		
	( $M \pm m$ )	t	Уровень значимости	( $M \pm m$ )	t	Уровень значимости	( $M \pm m$ )	t	Уровень значимости
Коллаген, %	10,6± 0,20	53,00	P < 0,001	8,8± 0,30	29,33	P < 0,001	10,2 ± 0,30	34,00	P < 0,001
Неколлагено выс белки, %	7,0± 0,30	23,33	P < 0,001	5,9± 0,30	19,66	P < 0,001	6,8 ± 0,20	34,00	P < 0,001
Цитрат, мкмоль/г	19,0± 0,40	47,55	P < 0,001	6,7± 0,50	13,40	P < 0,001	9,1± 0,40	22,75	P < 0,001
Общий кальций, %	22,6± 0,40	56,50	P < 0,001	18,8± 0,40	47,00	P < 0,001	20,7 ± 0,40	51,75	P < 0,001

\*представлены среднесрифметические величины из 9 определений

Результаты, приведенные в таблице 4, показывают, что потребление экспериментальными животными преднизолона в течение 30 дней сопровождается статистически значимым ( $P < 0,001$ ) снижением концентрации коллагена на 17,0 % по сравнению с аналогичным показателем в группе интактных крыс. Снижение концентрации основного белка межклеточного матрикса костной ткани происходит параллельно с уменьшением общего

содержания не коллагеновых белков, которое составляет 84,3 % от уровня соответствующей величины у животных не получавших синтетический глюкокортикоидный препарат ( $P < 0,001$ ).

Сходным образом в этих экспериментах изменяется и концентрация лимонной кислоты: содержание цитрата в костной ткани с высокой степенью статистической значимости ( $P < 0,001$ ) снижается почти в три раза по отношению к аналогичной величине, измеренной у здоровых крыс.

Концентрация общего содержания кальция, отражающего уровень минерализации костной ткани, при моделировании остеопороза также снижается на 16,8 % ( $P < 0,001$ ) по сравнению с этой величиной, полученной при исследовании интактных животных.

Рассмотрение полученных результатов позволяет однозначно сделать вывод о потере костной ткани при длительном воздействии синтетического гормона коры надпочечников на старых крыс, переживших период фертильности. О потере костной ткани, а не об изолированном «выносе» ее отдельных компонентов, свидетельствует одновременное снижение концентрации коллагена, не коллагеновых белков (компоненты органического матрикса) и содержание общего кальция в образцах костной ткани.

В целом, оценивая результаты исследований, необходимо отметить, что исследуемый антигипоксикант при моделировании глюкокортикоидного остеопороза у старых крыс эффективно снижает накопление в сыворотке крови молочной кислоты, тормозит активность тартрат - резистентной щелочной фосфатазы и повышает активность щелочной фосфатазы. Эти метаболические факторы, которые отражают интенсивность процессов разрушения-новообразования костной ткани, сопровождаются сохранением органической матрикса кости у экспериментальных животных, степени ее минерализации и концентрации лимонной кислоты, интегрирующей основные фазы минерализованного органа.

## 4 ВЫВОДЫ

1. В динамике репаративного остеогенеза суммарное содержание нуклеиновых кислот сначала повышается, а на его поздних стадиях – снижается, что наряду с концентрацией цитрата является маркером зрелости костной мозоли.

2. Гипоксен при его добавлении в корм экспериментальным животным в дозе 10 мг в сутки в течение первых двух дней после перелома предотвращает развитие посттравматической гипергликемии и лактацидемии, стабилизирует депо гликогена в печени и активирует Г-6-ФДГ. Стабилизация депо гликогена печени, установленная биохимическим методом, подтверждается данными морфогистохимических исследований по выявлению гликогена с помощью Шифф-периодной реакции.

3. Потребление крысами 5 мг в сутки гипоксена в течение четырех недель после перелома сопровождается более низким уровнем молочной кислоты, активности тартрат-резистентной кислой фосфатазы в сыворотке крови, высоким содержанием минеральных веществ и цитрата и низкой концентрацией основных компонентов органического матрикса по сравнению с соответствующими показателями в группе животных, не получавших антигипоксический препарат.

4. Морфологически эффект гипоксена на течение репаративного остеогенеза выражается в создании более зрелых минерализованных структур с хорошо выраженными каналами остеонов и надкостницей. Объем остаточной мозоли через 28 дней после перелома при использовании гипоксена статистически значимо ниже, чем аналогичная величина в контрольной группе.

5. При моделировании глюкокортикоидного остеопороза у крыс-самок в возрасте два с половиной и три года, гипоксен предотвращает лактацидемию и тормозит активность тартрат-резистентной кислой

фосфатазы, что сочетается с сохранением содержания органических и минеральных компонентов костной ткани и повышенным уровнем лимонной кислоты по сравнению с концентрацией цитрата у животных, не получавших антигипоксический препарат.

### **5 ПРЕДЛОЖЕНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ**

Результаты исследований рекомендуем для исследований:

1. В ветеринарной практике при лечении разных видов переломов трубчатых костей и остеопорозе животных.

2. При написании методических рекомендаций, учебных пособий, учебников по оперативной хирургии и монографий.

3. В учебном процессе при чтении лекций, проведении лабораторно-практических занятий по курсам хирургии, терапии, анатомии, гистологии, морфологии и патофизиологии домашних животных на факультетах ветеринарной медицины, слушателям ФПК.

### **6 Список работ, опубликованных работ по теме диссертации**

Список работ, опубликованных в рецензируемых журналах, включенных в Перечень ВАК РФ:

1. Шотников, Н.К. Суммарное содержание нуклеиновых кислот как маркер зрелости костного регенерата / Н.К. Шотников, С.Б. Власов, Р.В. Костин //Международный вестник ветеринарии.- Санкт – Петербург, 2009.- № 3. - С. 52.

2. Шотников, Н.К. Метаболические аспекты течения экспериментального репаративного остеогенеза под влиянием гипоксена /Н.К. Шотников, О.П. Ильина, Б.Я.Власов, Т.А. Балтухаева// Вестник БГСХА.- Улан-Удэ, 2009.-№3.- С. 25-29.

Прочие публикации:

1. Шотников, Н.К. Применение чрескостного остеосинтеза в ветеринарии / Н.К.Шотников, Е.А.Лозовская //«Актуальные вопросы развития регионального АПК» /Материалы научно-практической конференции. – Иркутск: ИГСХА. – 2007. – С.36.

2. Власов, С.Б. Макромолекулярные факторы стимуляции репаративного остеогенеза (научный обзор) / С.Б.Власов, Н.К. Шотников // «Совместная деятельность сельскохозяйственных товаропроизводителей и научных организаций в развитии АПК Центральной Азии» /Сборник материалов международной научно-практической конференции. - Иркутск: ИГСХА. – 2008. – С.88.

3. Шотников, Н.К. Эффект гипоксена на метаболизм глюкозы при экспериментальном переломе / Н.К. Шотников, О.П.Ильина //Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию заведующего кафедрой терапии и клинической диагностики профессора Тарнуева Ю.А. - Улан – Удэ, 2009 – С. 170.

### 7 Сокращения, применяемые в работе

АОЗ –	антиоксидантная защита
АТФ –	аденазинтрифосфат
АФК –	активная форма кислорода
ВКМ –	внеклеточный матрикс
ГАГ –	гликозамин гликаны
Г- 6-ФДГ –	глюкозо – 6 – фосфатдегидрогеназа
ГОА –	гидроксилапатит
Д <sub>3</sub> -	кальцитриол
ДНК –	дезоксирибонуклеиновая кислота
Е <sub>254</sub> –	эндогенная интоксикация
НАД –	никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ –	никотинамидадениндинуклеотид фосфат окисленный
ПГ –	протеогликаны
ПОЛ –	перекисное окисление липидов
ПТГ –	паратиреоидный гормон
РНК –	рибонуклеиновая кислота

*Шотников Николай Кириллович*

МОРФОЛОГО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ГИПОКСЕНА ПРИ ПЕРЕЛОМЕ КОСТИ  
И ГЛЮКОКОРТИКОИДНОМ ОСТЕОПОРОЗЕ  
(экспериментальное исследование)

*Автореферат*

Лицензия на издательскую деятельность

ЛР № 070444 от 11.03.98 г.

Подписано в печать 10.11.09 г.

Уч.-издл. – 1,0. Усл.-пл. – 1,5

Тираж 100 экз. Заказ № 1993.

Издательство Иркутской государственной  
сельскохозяйственной академии  
664038, Иркутская обл., Иркутский р-н,  
пос. Молодежный