

- диола //Кубанский науч. мед. вестн. — 2006. — N 9 (90). — С. 137–140.
4. **Насонов Е.Л.** Вторичный остеопороз: патогенез и клиническое значение при воспалительных заболеваниях суставов //Остеопороз и остеопатии. —1998. — N 3. — С. 18–20.
  5. **Пат. 2369390 РФ.** Способ коррекции остеопороза и профилактики возникновения остеопоротических переломов эналаприлом /Покровский М.В., Гудырев О.С., Файтельсон А.В. и др. — Бюл. № 28, зарегистрирован 10.10.09
  6. **Пат. 2369391 РФ.** Способ коррекции остеопороза и профилактики возникновения остеопоротических переломов лозартаном /Покровский М.В., Гудырев О.С., Файтельсон А.В. и др. — Бюл. № 28, зарегистрирован 10.10.09.
  7. **Atagiakrishnan K., Juby A., Hanley D. et al.** Role of vascular factors in osteoporosis //J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci. — 2003. — Vol. 58. — P. 362–366.
  8. **Laursen J.B., Rajagopalan S., Galis Z. et al.** Of superoxide in angiotensin II-induced but catecholamine-induced hypertension //Circulation — 1997. — Vol. 95. — P. 588–593.
  9. **Napoli C., Iquarro L.J.** Nitric oxide and atherosclerosis //Nitric. Oxide. — 2001. — Vol. 5. — P. 88–97.
  10. **Stimpel M., Jee W. S., Ma Y. et al.** Impact of anti-hypertensive therapy on postmenopausal osteoporosis: effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor moexipril, 17beta-estradiol and their combination on the ovariectomy-induced cancellous bone loss in young rats //J. Hypertens. — 1995. — Vol. 13. — P. 1852–1856.

**Сведения об авторах:** **Файтельсон А.В.** — канд. мед. наук, доцент кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ КГМУ; **Дубровин Г.М.** — профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой травматологии, ортопедии и ВПХ КГМУ; **Гудырев О.С.** — канд. мед. наук, докторант кафедры клинической фармакологии КГМУ; **Покровский М.В.** — профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой фармакологии КГМУ; **Иванов А.В.** — профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии КГМУ. **Для контактов:** Файтельсон Александр Владимирович. 305004, Курск, ул. Ленина, дом 65-22. Тел.: (4712) 58-73-14. E-mail: vladimirfatelson@gmail.com

© Коллектив авторов, 2010

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ОПТИМИЗАЦИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ ПЕРЕЛОМАХ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ

*Е.Ю. Масленников, И.И. Таранов, Т.М. Аль-Надджар, И.Б. Вовченко*

ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздравсопразвития», Ростов-на-Дону

*Целью исследования было изучение роли некоторых протеолитических ферментов (катепсина-D и нейтральной протеиназы серинового ряда) в формировании регенерата костной ткани при переломах костей. Исследования проведены у 138 больных с переломами длинных костей — свежими (80 переломов), несросшимися (38) и консолидированными (20). В качестве тестируемой среды использовали периостальный и промежуточный (межотломковая ткань) регенераты костной ткани. Материал для исследований получали во время операций остеосинтеза, выполнявшихся в разные сроки после травмы. Результаты исследования дают основание предположить, что кислые и нейтральные пептид-гидролазы играют определенную роль в реализации процессов синтеза и распада макромолекулярных компонентов органического матрикса кости при репаративном остеогенезе. Полученные данные позволяют наметить некоторые новые пути оптимизации репаративных процессов при переломах костей.*

**Ключевые слова:** переломы, регенерация, протеолиз.

### *Some Aspects of Reparative Osteogenesis Optimization in Long Bone Fractures*

*E.Yu. Maslennikov, I.I. Taranov, T.M. Al-Naddzhar, I.B. Vovchenko*

*The aim of the examination was to study the influence of some proteolytic enzymes (cathepsin-D, neutral proteinase of serine group) upon formation of bone regenerate in fractures. There were 138 patients with bone fractures: 80 fractures were fresh, 38 — nonunited, 20 — nonconsolidated. Periosteal and transfragmental tissues were studied. Those materials were obtained during osteosynthesis that was performed at different terms after trauma. Results obtained allowed to make a suggestion that acid and neutral peptide-hydrolyases influence the osteosynthesis and degradation of macromolecular components of bone organic matrix during reparative osteogenesis. That allowed detecting the new ways for optimization of reparative processes in fractures.*

**Key words:** fractures, regeneration, proteolysis.

Разработка методов регулирующего воздействия на репаративную регенерацию костной тка-

ни является актуальнейшей задачей травматологии. Процесс консолидации костных отломков при

переломах может быть условно разделен на две фазы: восстановление органического матрикса костной ткани и его минерализация [6]. Морфогенез кости является функцией биохимических компонентов органического матрикса. Формирование органической основы кости при репаративном остеогенезе характеризуется синтезом *de novo* белковых молекул (коллагена и белков неколлагеновой природы) вместо подвергшихся распаду. Преобладание процессов синтеза над распадом является одним из основных условий успешного течения процессов консолидации.

Целью нашего исследования было изучение роли некоторых протеолитических ферментов (катепсина-D и нейтральной протеиназы серинового ряда) в формировании регенерата костной ткани при переломах. Катепсин-D относится к категории кислых пептид-гидролаз, играющих важную роль в реализации аутолитических процессов, происходящих преимущественно в патологически измененных клетках, в которых реакция среды смещается в кислую сторону. Нейтральные протеиназы ответственны за расщепление белковых молекул, подвергающихся обновлению в функционирующих клетках [4].

Большинство публикаций, касающихся протеолитических ферментов костной (соединительной) ткани, посвящено изучению их роли в условиях физиологического остеогенеза [7, 10–12]. Сообщений, основанных на клиническом материале, в которых освещалась бы роль данных ферментных систем в формировании регенерата костной ткани в процессе заживления перелома, мы в литературе не встретили.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены у 138 больных с переломами длинных костей. Преобладали пациенты в возрасте от 17 до 60 лет (127 человек). Были выделены три клинические группы:

*1-я группа* — свежие переломы (80 больных). По локализации переломы распределялись следующим образом: диафизарный отдел бедренной кости — 25, большеберцовой кости — 40, плечевой — 15. Накостный остеосинтез был произведен в 48 случаях, интрамедуллярный — в 21, кортикальный и другие виды остеосинтеза — в 11. В 1-ю неделю с момента травмы оперированы 13 больных, на 2-й неделе — 23, на 3-й — 16, на 4-й — 14, через 4–8 нед — 14;

*2-я группа* — замедленно консолидирующиеся (несрастающиеся) и несросшиеся переломы (38 больных). Перелом бедренной кости был у 11 больных, большеберцовой — у 21, плечевой — у 6. Исследования проводили в сроки от 4 до 8 мес с момента травмы. Накостный металлоостеосинтез был выполнен в 28 случаях, интрамедуллярный — в 10. В 26 случаях погружной остеосинтез сочетался с различными вариантами костной аутопластики;

*3-я группа* — консолидированные переломы (20 больных). У 8 больных был перелом бедренной, у 12 — большеберцовой кости. Во всех случаях применялся накостный металлоостеосинтез.

В качестве тестируемой среды использовали периостальный и промежуточный (межотломковая ткань) регенераты костной ткани, рассматриваемые как специфическая разновидность грануляционно-фиброзной ткани [6]. Материал для исследования, фрагменты тканей, прилегающих к костным отломкам, извлекали во время операций остеосинтеза и гомогенизировали. У больных с консолидированными переломами (3-я группа) материал для исследования получали во время операций по удалению металлических фиксаторов. Исследованию подвергались ткани, располагавшиеся периостально, но не контактировавшие с металлоконструкциями.

Активность катепсина-D [К.Ф.3.4.4.23] в гомогенате определяли методом Barrett [9] с использованием в качестве субстрата гемоглобина. Активность фермента выражали в микрограммах тирозина, отщепившегося от гемоглобина за 60 мин инкубации при температуре 37 °С в расчете на 1 мг белка. Количество белка оценивали методом Lowry.

Определение активности нейтральной протеиназы [КФ 3.4.2.2] проводили при pH 7.4 с использованием в качестве субстрата прогаминсульфата [2]. Активность фермента выражали в микрограммах аргинина, отщепившегося от протамина за 40 мин инкубации, в расчете на 1 мг белка. Аргинин определяли по методу Akamatsu [8].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В остром периоде травмы максимальная активность катепсина-D ( $0,87 \pm 0,13$  мкг тирозина на 1 мг белка) в периостальном регенерате отмечена в период с 15-го по 21-й день после получения перелома (рис. 1, а). В дальнейшем она имела тенденцию к снижению и через 2 мес составляла  $0,27 \pm 0,03$  мкг тирозина на 1 мг белка. Повторное возрастание активности фермента в периосте ( $0,9 \pm 0,04$  мкг тирозина на 1 мг белка) зарегистрировано через 4–8 мес с момента травмы в группе больных с несросшимися переломами. В промежуточном регенерате (рис. 1, б) максимум активности катепсина-D наблюдался в период с 7-го по 14-й день ( $0,61 \pm 0,05$  мкг тирозина на 1 мг белка), в дальнейшем активность этого фермента имела тенденцию к снижению. Повторный рост ее отмечен через 2 мес после травмы ( $0,51 \pm 0,04$  мкг тирозина на 1 мг белка).

Таким образом, во временном аспекте выявлено два пика активности катепсина-D, которые, вероятно, соответствуют периодам максимальной выраженности катаболических процессов в зоне перелома. В остром периоде травмы (первый пик) рост активности катепсина-D коррелировал с выраженностью клинических проявлений гипертензионно-тканевого синдрома (боль, отеки и т.д.) в

области поврежденного сегмента конечности. Это позволяет сделать предположение о роли данного фермента как медиатора реактивного воспалительного процесса в зоне перелома, который имеет важное значение в формировании регенерата костной ткани [6]. Возрастание протеолитической активности, вероятно, служит проявлением общей метаболической реакции организма на травму, имеющей катаболическую направленность и выражающейся в усиленном распаде тканевых белков [7].

Можно предположить, что в отдаленном периоде травмы (группа несросшихся переломов) рост активности катепсина-D (второй пик) в определенной степени обуславливает интенсивность распада органического матрикса периостального и промежуточного регенератов, что создает предпосылки к несращению отломков. В промежуточном регенерате интенсификация катаболических процессов началась раньше, чем в периосте. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что восстановительные возможности периостального регенерата выше, чем промежуточного. Это согласуется с рядом литературных данных, указывающих на решающее значение периостального регенерата (надкостницы) как фактора консолидации костных отломков. Активация протеолиза и связанные с ней катаболические процессы в остром периоде травмы являются следствием прямого патогенного воздействия (механическая деструкция тканей). Повторный рост активности катепсина-D и дальнейшее углубление дистрофических процессов на более поздних этапах регенераторной реакции, вероятно, являются результатом «эндогенного» снижения напряженности репаративной регенерации [5].

Максимальная активность нейтральной протеиназы в периостальном регенерате (рис. 2, а) выявлена на 6-8-й неделе с момента травмы ( $1,48 \pm 0,13$  мкг аргинина на 1 мг белка), в промежуточном регенерате (рис. 2, б) — на 4-й неделе ( $1,1 \pm 0,01$  мкг аргинина на 1 мг белка). Учитывая роль нейтральной протеиназы как фермента, ответственного за расщепление белковых молекул, подвергающихся обновлению в функционирующих клетках, можно предположить, что максимальная активность фермента в известной степени свидетельствует об интенсивности локального синтеза белков и достаточно высоком уровне потенции репаративных процессов в зоне перелома. Рост нейтральной протеолитической активности, вероятно, обусловлен необходимостью образования достаточного количества аминокислот, которые являются строительным материалом при синтезе белка, так как должное их количество не может быть обеспечено за счет гидролиза белков пищи [7].

В группе больных с консолидированными переломами активность катепсина-D и нейтральной протеиназы в периостальном регенерате была близка к нулевому уровню соответственно  $0,03 \pm 0,007$  мкг тирозина и  $0,01 \pm 0,006$  мкг аргинина на 1 мг белка.

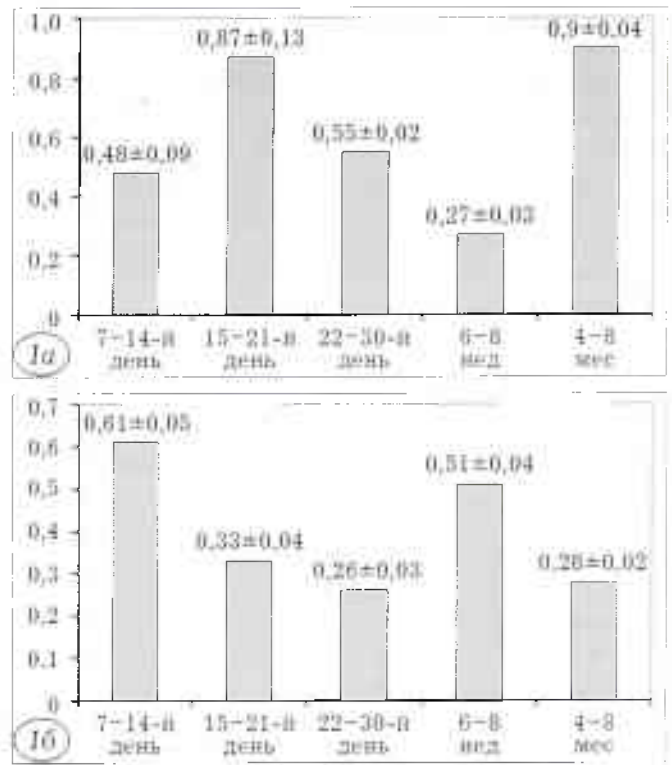


Рис. 1. Активность катепсина-D в периостальном (а) и в промежуточном (б) регенерате.

По оси абсцисс — срок после травмы; по оси ординат — активность катепсина-D (в микрограммах тирозина, отщепившегося от гемоглобина за 60 мин инкубации при температуре 37 °С, в расчете на 1 мг белка,  $M \pm m$ )

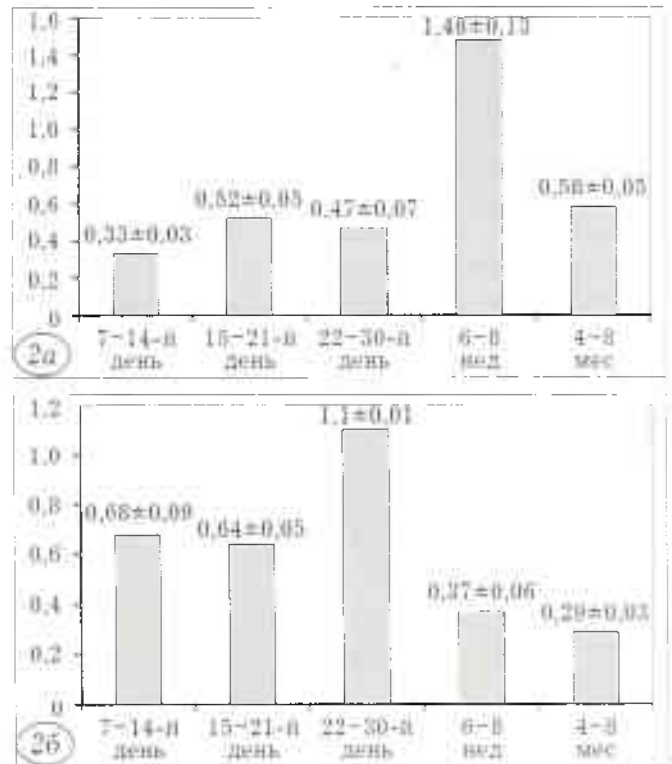


Рис. 2. Активность нейтральной протеиназы в периостальном (а) и в промежуточном (б) регенерате.

По оси абсцисс — срок после травмы; по оси ординат — активность нейтральной протеиназы (в микрограммах аргинина, отщепившегося от протамина за 40 мин инкубации, в расчете на 1 мг белка,  $M \pm m$ ).



При анализе полученных данных обращает на себя внимание тот факт, что катепсин-D и нейтральная протейназа проявляют свое действие в тканях регенератов в значительной степени обособленно (несовпадение пиков ферментативной активности). Это согласуется с данными литературы, указывающими на то, что кислые протеолитические ферменты не гидролизуют пептидные связи (или гидролизуют их весьма незначительно) при рН-оптимуме нейтральных протейназ.

В литературе описаны способы ферментной стимуляции репаративного остеогенеза при нарушении процессов консолидации костных отломков [1, 3]. В.И. Зоря и соавт. [3] сообщают о положительных результатах клинического применения кристаллического химотрипсина при лечении переломов и ложных суставов у 167 больных. Используемый авторами препарат является ферментом класса гидролаз, катализирующих гидролиз пептидных связей в молекулах белка. Предложенный способ стимуляции репаративного остеогенеза был применен в двух вариантах: 1) однократное пункционное введение между отломками кристаллического химотрипсина, растворенного в 5 мл 0,5% раствора новокаина, в сочетании с внеочаговым чрескостным компрессионно-дистракционным остеосинтезом; 2) однократное введение сухого вещества кристаллического химотрипсина после открытой репозиции и завершения накостного остеосинтеза. Доза вводимого фермента устанавливалась эмпирически и зависела от вида ложного сустава и размеров кости. Авторами отмечено положительное влияние химотрипсина на синтез основного белка соединительной ткани — коллагена.

Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что применение химотрипсина — фермента, относящегося к классу нейтральных протейназ, с целью оптимизации процессов репаративного остеогенеза является патогенетически обоснованным. Однако можно

предположить, что в ряде случаев однократное введение препарата может быть недостаточно эффективным. По нашему мнению, при определении дозы и периодичности введения препарата целесообразно исходить из метаболической ситуации в зоне перелома.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаков Н.Т. Лечение ложных суставов костей голени методом внеочагового остеосинтеза с применением химотрипсина //Травма. — 2008. — Т. 9, N 1. — С. 52–54.
2. Белик Я.В., Гриненко А.В., Смерчинская Л.С. Определение протеолитической активности тканей с использованием протамина в качестве субстрата //Укр. биохим. журн. — 1968. — Т. 40, N 5. — С. 533–537.
3. Зоря В.И., Ярыгин Н.В., Скляничук Е.Д., Васильев А.П. Ферментная стимуляция остеогенеза при лечении несросшихся переломов и ложных суставов костей конечности //Вестн. травматол. ортопед. — 2007. — N 2. — С. 80–85.
4. Паладин А.В., Белик Я.В., Поляков Н.М. Белки головного мозга и их обмен. — Киев, 1972.
5. Саркисов Д.С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. — М., 1987.
6. Сауцкий Л.И. Биохимия регенерата кости как специфической разновидности грануляционно-фиброзной ткани //Механизмы регенерации костной ткани. — М., 1972. — С. 172–189.
7. Торбенко В.П., Касавина Е.С. Функциональная биохимия костной ткани. — М., 1977.
8. Akamatsu S., Vatanaba G. The quantitative determination of arginine //J. Biochem. — 1961. — Vol. 11, N 3. — P. 457–460.
9. Barrett A.W. Cathepsin D. //Meth. Enzymol. — 1981. — Vol. 80. — P. 561–565.
10. Lutwak L., Singer F.P., Urist M.R. Current concepts of bone metabolism //Ann. Int. Med. — 1974. — Vol. 80. — P. 630–640.
11. Owen M., Triffitt S.T., Melick R.A. Hard tissue growth, repair and remineralization. — Philadelphia, 1973. — P. 263–287.
12. Vaes G. Lysosomes and cellular physiology of bone resorption //Lysosomes in biology and pathology. — 1969. — Vol. 1. — P. 217–253.

**Сведения об авторах:** Масленников Е.Ю. — канд. мед. наук, доцент кафедры ВПХ Ростовского ГМУ; Таранов И.И. — профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой ВПХ Ростовского ГМУ; Аль-Надджар Т.М. — аспирант той же кафедры; Вовченко И.Б. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. ЦНИЛ Ростовского ГМУ.  
**Для контактов:** Масленников Евгений Юльевич. 344068, Ростов-на-Дону, ул. Бодрая, дом 88/35, БСМП № 2, кафедра ВПХ. Тел.: (863) 233-79-95; (8) 918-509- 87-66. E-mail: mas\_eu@mail.ru