

Очеретина Р.Ю., Стогов М.В.

Белково-азотистый обмен в печени мышей в восстановительном периоде после скелетной травмы

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, 640014, г.Курган, ул. М. Ульяновой, д. 6

Цель исследования. Определение динамики изменения показателей белково-азотистого обмена в печени в восстановительном периоде после перелома костей голени и после перелома костей голени у мышей на фоне острой печеночной недостаточности. **Методика.** Опыты проведены на 134 самцах мышей СВА в возрасте 2 мес. массой 25—30 г. В 1-й группе перелом костей голени моделировали путем механического повреждения сегмента конечности в верхней трети с медиальной стороны; во 2-й группе воспроизводили острую печеночную недостаточность (ОПН) внутривенным введением 20% раствора четыреххлористого углерода на оливковом масле; в 3-й группе перелом костей голени осуществляли на 3-и сутки после воспроизведения ОПН. В печени и сыворотке крови на 3-и сутки определяли содержание общего белка, мочевины, активность аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы, химический состав кости травмированного сегмента конечности через 3, 7, 28 сут. после нанесения травмы и травмы на фоне интоксикации четыреххлористым углеродом. **Результаты.** Обнаружено снижение содержания коллагена в костной ткани, снижение в раннем посттравматическом периоде уровня общего белка и мочевины в печени, снижение концентрации общего белка в сыворотке крови у мышей после перелома костей голени на фоне острой печеночной недостаточности. У мышей в посттравматическом периоде без острой печеночной недостаточности отмечалось повышение содержания общего белка и мочевины в печени в раннем периоде после травмы при стабильном уровне общего белка в сыворотке крови. **Заключение.** Установлено, что в восстановительном периоде изменения показателей белково-азотистого обмена в печени, индуцированные переломом костей голени, являются частью адаптивных перестроек направленных на поддержание уровня белков сыворотки крови. Действие двух повреждающих факторов (интоксикация и травма) может являться причиной нарушения костного обмена.

Ключевые слова: травма; печень; белково-азотистый обмен.

Для корреспонденции: Очеретина Руфина Юрьевна, e-mail: rufoch@mail.ru

Для цитирования: Очеретина Р.Ю., Стогов М.В. Белково-азотистый обмен в печени мышей в восстановительном периоде после скелетной травмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(2): 81—86.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта.

Поступила 11. 10.14

Ocheretina R.Iu., Stogov M.V.

Protein and nitrogen metabolism in the liver of mice during recovery period after skeletal injury

Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics; 6, ul. M.Ulianovoy, 640014, Kurgan, Russia

Purpose of study. Study the dynamics of protein and nitrogen metabolism in the recovery period after tibia fracture and after fracture of tibia bones in mice against a background of acute liver failure. **Methods.** Experiments were conducted on 134 male CBA mice at the age of two months of postnatal period, weighing 25—30 grams. In the first group were simulated fractured shin bones by mechanical damage to the limb segment in the upper third of the medial surface; in the second group acute liver failure was simulated by intraperitoneal injection of 20% carbon tetrachloride solution in olive oil; in the third group was simulated acute liver failure, then on the 3 day — tibia fracture. It was studied content of total protein in liver and blood serum, urea, alanine and aspartate, chemical composition of the bone of the injured limb segment in 3, 7, 28 days after tibia fracture and after fracture of tibia bones against a background of acute liver failure intoxication by carbon tetrachloride. **Results.** It was found a decrease bone tissue collagen, reduction of total protein level and urea in the liver in early posttraumatic period, reduction in the concentration of total serum protein in mice after tibia bones fracture against acute liver failure. It was noticed increase of total protein and urea in early posttraumatic period in mice without acute liver failure. **Conclusion.** It was found that in the recovery period changes in the indices of protein-nitrogen metabolism in the liver induced

by tibia fractures are a part of the adaptive restructuring aimed at maintaining the protein levels in the serum. Deepening of functional disorders of the liver under the influence of two damaging factors (intoxication and trauma) can cause disturbances of the bone metabolism.

Keywords: trauma; liver; protein-nitrogen metabolism

For citation: Ocheretina R.Iu., Stogov M.V. Protein and nitrogen metabolism in the liver of mice during recovery period after skeletal injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 81–86. (in Russ).

For correspondence: Rufina Iu. Ocheretina, Candidate of Biological sciences, Research worker «Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics»; 6, ul. M.Ulianovoj, 640014, Kurgan, 640014, Russia, e-mail: rufoch@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Ochretina R.Iu., <http://orcid.org/0000-0003-3023-891X>

Stogov M.V., <http://orcid.org/0000-0001-8516-8571>

Received 11.10.14

Введение

Несмотря на значительный прогресс в изучении патофизиологии посттравматических состояний остаются открытыми вопросы касающиеся роли системной регуляции репаративных процессов в травмированных тканях и органах. Показано, что сроки восстановления после травмы костей скелета зависят не только от характера и тяжести повреждений, но и от функционального резерва основных систем жизнеобеспечения [1] в том числе печени — жизненно важного полифункционального органа. [2, 3]. Так известно, что при функциональных нарушениях печени из-за токсического действия веществ (в том числе эндогенной интоксикации) на остеобласты снижается минеральная плотность кости [4, 5]. В то же время отмечается увеличение хронических заболеваний печени сочетанных с метаболическими заболеваниями костной ткани [6].

С другой стороны отмечается обратное влияние — при травме (синдром длительного раздавливания) нарушаются экскреторная и детоксикационная функции печени [7]. Однако в литературе немного сведений о функциональной морфологии печени [8, 9] и изменениях белково-азотистого обмена в печени [10] после травм костного скелета.

Цель исследования — изучение в динамике состояния белково-азотистого обмена в печени в восстановительном периоде после перелома костей голени и после перелома костей голени у мышей на фоне острой печеночной недостаточности.

Методика

Экспериментальное исследование выполнено на 134 самцах мышах СВА в возрасте двух мес. постна-

тального развития, массой 25—30 г. Животные были разделены на 3 группы: в 1-й группе (n = 36) моделировали перелом костей голени путем механического повреждения сегмента конечности в верхней трети с медиальной поверхности; во 2-й группе (n = 36) моделировали острую печеночную недостаточность (ОПН) внутрибрюшинным введением 20 % раствора четыреххлористого углерода (CCl₄) на оливковом масле; в 3-й группе (n = 36) моделировали ОПН, затем на 3-и сут. — перелом костей голени. Все манипуляции на мышцах проводили под диэтиловым наркозом. Развитие ОПН подтверждено данными гистологического исследования. В группу интактных животных вошли двухмесячные мыши (n = 14) и мыши трех мес постнатального развития (n = 12). Из эксперимента животных выводили в утренние часы декапитацией на 3, 7 и 28-е сут. после перелома (1-я и 3-я группы). Во 2-й группе 6-е сут. после введения CCl₄ соответствовали 3-м сут. после травмы, 31-е — 28-м сут.

Содержание животных, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 Минздрава СССР от 12.08.1977 г.) и требованиями инструкции № 12/313 Министерства здравоохранения РСФСР «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник» от 06.01.1973 г. На проведение исследования получено разрешение комитета по этике при ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России.

Для определения показателей белкового обмена после эвтаназии забирали образцы печени и крови. Используя ультрацентрифугу OPTIMA LE-80, Beckman-Coulter (США) при температуре 5°C получали супернатант гомогената печени. В супернатанте гомогената печени и крови определяли активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлАТ), концентрацию общего белка и мочевины. Концентрацию общего белка, мочевины и активность аминотрансфераз определяли на биохимическом фотометре Stat Fax 1904+, Awareness (США), используя наборы реагентов фирмы «Витал Диагностикс» (Россия). Для определения химического состава кости высушивали, измельчали и делили на две навески. В первой — определяли концентрацию фосфата и кальция (мг%), используя наборы реагентов фирмы «Витал Диагностикс» (Россия); во второй — концентрацию оксипролина по реакции с реактивом Эрлиха, по содержанию оксипролина в кости рассчитывали количество коллагена (мг %) [11].

Результаты исследования обрабатывали методами непараметрической статистики. Значимость различий между двумя выборками оценивали с помощью W-критерия Вилкоксона для независимых выборок при уровне значимости $p < 0,05$. Значимость межгрупповых различий определяли с помощью непараметрического критерия Крускала—Уоллиса.

Результаты и обсуждение

По результатам исследования, химического состава кости травмированного сегмента конечности, выявлены статистически значимые изменения: увеличение содержания фосфата в группе после моделирования перелома костей голени (1-я группа), снижение содержания кальция и коллагена в группе после моделирования ОПН (2-я группа) относительно интактных животных (рис. А).

У мышей после перелома костей голени на фоне ОПН (3-я группа) обнаружено статистически значимое снижение фосфата и коллагена (рис. А), а отношение суммарного содержания кальция и фосфата к коллагену значимо повышалось относительно животных интактной и 1-й групп (рис. Б).

Содержание общего белка в печени и сыворотке крови у мышей всех экспериментальных групп через 3 сут. после перелома соответствовало норме (табл. 1).

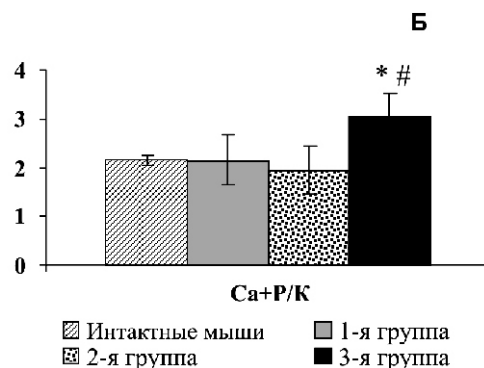
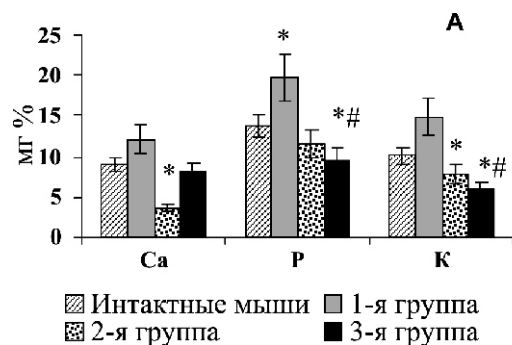
У мышей 3-й группы через 3 сут. после травмы отмечено значимое снижение содержания общего белка в печени и сыворотке крови относительно животных 1-й группы. Через 7 сут. после травмы уро-

вень общего белка в печени и сыворотке крови значимо снижался, у животных с переломом на фоне ОПН, относительно показателей животных интактных и 1-й группы.

Значимое повышение содержания мочевины в печени отмечено через 3-е сут. после травмы в 1-й группе относительно показателей животных интактных и 3-й группы (табл. 2).

В 3-й группе уровень мочевины на этом сроке эксперимента существенно снижался по сравнению с интактными животными. На 7-е сут. после травмы выявлено снижение содержания этого метаболита до значений нормы у животных 1-й группы, к концу эксперимента отмечено значимое снижение относительно показателей интактной и 3-й групп.

Статистически значимое снижение содержания мочевины в сыворотке крови обнаружено на 7 сут. после перелома у животных 1-й и 3-й групп (на фоне высокого содержания мочевины печени) и к концу эксперимента в 1-й группе относительно нормы.



Химический состав кости травмированного сегмента конечности у мышей на 28-е сут. после перелома костей голени (Ме, мг/100 г ткани).

А — Ca — кальций, P — фосфат, K — коллаген;

Б — Ca+P/K — соотношение суммарного содержания кальция и фосфата к коллагену.

* — значимые отличия с интактными животными при уровне значимости $p < 0,05$; # — значимые отличия относительно животных 1-й группы при $p < 0,05$.

Активность аминотрансфераз в печени животных 1-й, 2-й и 3-й групп к 3-м сут. эксперимента значимо повышалась относительно интактных животных (табл. 3). На последующих сроках активность АсАТ в этих группах сохранялась на одном уровне, а активность АлАТ в печени планомерно возрастала у мышей 1-й и 3-й групп до конца эксперимента. У животных 1-й группы активность АлАТ существенно повышалась относительно показателей мышей 3-й группы.

В сыворотке крови выявлены следующие статистически значимые изменения: повышение активности аминотрансфераз (АсАТ и АлАТ) через трое сут. в 1-й, 2-й и 3-й группах, через 7 сут. активности АсАТ в группах с переломом костей голени 1-й и 3-й и АлАТ во 2-й группе относительно показателей интактных мышей (табл. 4).

Анализ результатов исследования позволил выявить повышение отношения суммарного содержания кальция и фосфата к коллагену в костной ткани травмированного сегмента конечности после перелома костей голени на фоне ОПН.

У мышей без сопутствующих повреждений печени (1-я группа) динамика показателей субстратов и ферментов белково-азотистого обмена в печени отражает морфофункциональное состояние печени, индуцированное травмой костей голени. Отмеченное на ранних

этапах восстановительного периода повышение уровня мочевины в печени (3-и сут.) и стабильность содержания общего белка сыворотки крови (3-и и 7-е сут.) свидетельствуют об активации белково-азотистого обмена в печени. Вероятно, в восстановительном периоде после травмы компенсаторные реакции печени, с одной стороны, были направлены на поддержание уровня белка в крови, а с другой — на утилизацию катаболического азота тканей поврежденных травмой органов.

Выявленное снижение содержания мочевины в печени (3-и сут.) и общего белка в печени и сыворотке крови (7-е сут.) при высокой активности аминотрансфераз после травмы на фоне ОПН (3-я группа), отражает морфофункциональные нарушения печени обусловленные токсическим эффектом четыреххлористого углерода (нарушение радиальной ориентации печеночных балок, нарушение гемодинамики, каролизис, вакуолоизация цитоплазмы, лизис клеток) [12] и последствиями адаптационных изменений индуцированных травмой тканей [9].

Следовательно, дополнительная метаболическая нагрузка на печень после травмы костей голени на фоне функциональных нарушений печени (3-я группа) на ранних этапах восстановительного периода (3—7-е сут.) вызывала снижение интенсивности белково-азотистого обмена в органе. Последнее об-

Таблица 1

Содержание общего белка в печени и сыворотке крови мышей в динамике эксперимента ($\bar{X} \pm m\bar{x}$)

Группа	3-и сутки эксперимента		7(6 [#])-е сутки эксперимента		28(31 [#])-е сутки эксперимента	
	Печень, (мг/100 г ткани)	Сыворотка крови, (г/л)	Печень, (мг/100 г ткани)	Сыворотка крови, (г/л)	Печень, (мг/100 г ткани)	Сыворотка крови, (г/л)
Интактные животные	85,6 ± 9,1	59 ± 9	85,6 ± 9,1	59 ± 9	85,6 ± 9,1	59 ± 9
1-я	94,4 ± 5,5 ⁽³⁾	62 ± 10 ⁽³⁾	91,1 ± 6,1 ⁽³⁾	55 ± 10 ⁽³⁾	74,3 ± 5,1*	56 ± 7
2-я	80,1 ± 9,2	53 ± 8	85,4 ± 7,7	59 ± 12	88,4 ± 4,6	62 ± 9
3-я	73,1 ± 9,2 ⁽¹⁾	51 ± 10(1)	72,4 ± 5,0* ⁽¹⁾	50 ± 7* ⁽¹⁾	87,7 ± 5,6	54 ± 7

Примечание. * — значимые различия при сравнении с показателями интактных животных при $p < 0,05$; # — сутки эксперимента для животных 2-й группы; ⁽¹⁾ — значимые различия при сравнении с показателями указанной группы животных при $p < 0,05$.

Таблица 2

Содержание мочевины в печени и сыворотке крови мышей в динамике эксперимента ($\bar{X} \pm m\bar{x}$)

Группа	3-и сутки эксперимента		7(6 [#])-е сутки эксперимента		28(31 [#])-е сутки эксперимента	
	Печень, ммоль/г ткани	Сыворотка крови, ммоль/л	Печень, ммоль/г ткани	Сыворотка крови, ммоль/л	Печень, ммоль/г ткани	Сыворотка крови, ммоль/л
Интактные животные	14,7 ± 3,6	5,89 ± 0,86	14,7 ± 3,6	5,89 ± 0,86	14,7 ± 3,6	5,89 ± 0,86
1-я	23,0 ± 5,9* ⁽³⁾	5,34 ± 0,56	16,6 ± 4,8	4,72 ± 0,43*	8,81 ± 2,3* ⁽³⁾	4,84 ± 0,79*
2-я	13,2 ± 4,4	5,55 ± 0,71	14,6 ± 5,7	6,11 ± 0,91	17,1 ± 5,6	6,02 ± 0,81
3-я	10,1 ± 3,2* ⁽¹⁾	5,76 ± 0,78	15,1 ± 4,0	5,13 ± 0,91	13,9 ± 2,9 ⁽¹⁾	6,14 ± 0,69

Примечание. * — значимые различия при сравнении с показателями интактных животных при $p < 0,05$; # — сутки эксперимента для животных 2-й группы; ⁽¹⁾ — значимые различия при сравнении с показателями указанной группы животных при $p < 0,05$.

Таблица 3

Активность АсАТ и АлАТ в печени мышей в динамике эксперимента ($\bar{X} \pm m\bar{x}$), мккат/мг белка

Группы	3-и сутки эксперимента	7(6 [#])-е сутки эксперимента	28(31 [#])-е сутки эксперимента
АсАТ	—	—	—
Интактные животные	0,088 ± 0,013	0,088 ± 0,013	0,088 ± 0,013
1-я	0,103 ± 0,010* (3)	0,115 ± 0,13* (3)	0,134 ± 0,003*
2-я	0,131 ± 0,014*	0,125 ± 0,019*	0,114 ± 0,011*
3-я	0,123 ± 0,011* (1)	0,141 ± 0,029* (1)	0,136 ± 0,021*
АлАТ	—	—	—
Интактные животные	0,282 ± 0,048	0,282 ± 0,048	0,282 ± 0,048
1-я	0,378 ± 0,014* (3)	0,362 ± 0,024* (3)	0,424 ± 0,014* (3)
2-я	0,354 ± 0,033*	0,457 ± 0,088*	0,311 ± 0,045
3-я	0,321 ± 0,067 (1)	0,333 ± 0,035* (1)	0,381 ± 0,078* (1)

Примечание. * — значимые различия при сравнении с показателями интактных животных при $p < 0,05$; # — сутки эксперимента для животных 2-й группы

Таблица 4

Активность аминотрансфераз в сыворотке крови у мышей в динамике эксперимента ($\bar{X} \pm m\bar{x}$), мккат/л

Группа	3-и сутки эксперимента	7(6 [#])-е сутки эксперимента	28-е сутки эксперимента
АсАТ	—	—	—
Интактные животные	0,207 ± 0,061	0,207 ± 0,061	0,207 ± 0,061
1-я	0,402 ± 0,089*	0,430 ± 0,085*	0,198 ± 0,066
2-я	0,271 ± 0,046*	0,239 ± 0,074	0,218 ± 0,049
3-я	0,312 ± 0,044*	0,274 ± 0,041*	0,226 ± 0,067
АлАТ	—	—	—
Интактные животные	0,267 ± 0,071	0,267 ± 0,071	0,267 ± 0,071
1-я	0,576 ± 0,098*	0,285 ± 0,041	0,226 ± 0,062
2-я	0,481 ± 0,098*	0,348 ± 0,079*	0,273 ± 0,093
3-я	0,370 ± 0,088*	0,307 ± 0,062	0,204 ± 0,091

Примечание. * — значимые различия при сравнении с показателями интактных животных при $p < 0,05$; # — сутки эксперимента для животных 2-й группы

стоятельство влияло на химический состав кости травмированного сегмента конечности у животных после перелома костей голени на фоне ОПН.

Таким образом, представленные результаты исследования позволяют заключить, что изменения показателей белково-азотистого обмена в печени, индуцированные переломом костей голени, являются частью адаптивных перестроек направленных на поддержание уровня белков сыворотки крови. Усугубление функциональных нарушений печени при действии двух повреждающих факторов (интоксикация и травма) может являться причиной нарушения костного обмена.

References

1. Panteli M., Pountos I., Jones E., Giannoudis P.V. Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. *J Cell Mol Med.* 2015; 19(4): 685-713.

2. Duckworth A.D., Bennet S.J., Aderinto J., Keating J.F. Fixation of intracapsular fractures of the femoral neck in young patients: risk factors for failure. *J Bone Joint Surg. Br.* 2011; 93(6): 811-16.

3. Chakkalakal D.A., Novak J.R., Fritz E.D., Mollner T.J., McVicker D.L., Garvin K.L., McGuire M.H., Donohue T.M. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol.* 2005; 36(3): 201-14.

4. Guanabens N., Pares A. Osteoporosis in liver cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2012; 35(6): 411-20.

5. Guanabens N., Monegal A., Cerda D., Muxi A., Gifre L., Peris P., Pares A. Randomized trial comparing monthly ibandronate and weekly alendronate for osteoporosis in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2013; 58(6): 2070-8.

6. Mansueto P., Carroccio A., Seidita A., Di Fede G., Craxm A. Osteodystrophy in chronic liver diseases. *Intern Emerg Med.* 2013; 8(5): 377-88.

7. Zarubina I.V., Yunisov I.A., Shabanov P.D. Efficiency of antihypoxants in compression syndrome. *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v cherezvychaynykh situatsiyakh.* 2009; 2: 68-72. (in Russian)

8. Lebed M.L., Benemansky V.V., Bocharov S.N., Puseva M.E., Mikhailov I.N., Korzun A.N., Lepehova S.A. Changes of internal organs in the long-term period of bone injury in experiment. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SO RAMN*. 2006; 5: 224-7. (in Russian)

9. Ocheretina R.Iu., Mkrchan O.Z., Stogov M.V. Morphometric parameters of vessels of the liver lobule in mice in the recovery period after tibial injury. *Morfologiya*. 2012; 141(2): 32-4. (in Russian)

10. Luneva S.N., Grebneva O.L., Boychuk S.P., Lukin S.Yu., Romanenko S.A. Peculiarities of liver function in pati-

ents with closed fractures of the lower limbs, combined with a brain injury. *Geniy Ortopedii*. 2005; 1: 49-52. (in Russian)

11. Men'shikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P., Andreeva Z.M., Ankirskaya A.S., Balakhovskiy I.S. *Laboratory Methods in the clinic: A Handbook. [Laboratory methods of research in the clinic: A Handbook. Spravochnik] M.: Meditsina; 1987. 368 s. (in Russian)*

12. Ocheretina R.Iu., Stogov M.V. Functional state of the liver after fracture of the tibial bones: (experimental study). *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2013; 99(12): 1389-96. (in Russian)

Сведения об авторах:

Очеретина Руфина Юрьевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. биохимии, email: rufoch@mail.ru

Стогов Максим Валерьевич, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии, e-mail: stogo_off@list.ru