

ЭНЕРГООБМЕН В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ СОБАК В ХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ ПЕРЕЛОМА КОСТЕЙ ГОЛЕНИ ПО ИЛИЗАРОВУ

М.В. Стогов, А.В. Смирнов

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»
им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России,
директор – д.м.н. А.В. Губин
г. Курган

Цель – исследовать динамику восстановления энергетических ресурсов в передней большеберцовой мышце (ПББМ) собак после перелома костей голени.

Материал и методы. Изучены концентрация субстратов энергетического обмена, скорость гликолиза и гликогенолиза в ПББМ у 25 собак при лечении перелома костей голени по Илизарову. Значения показателей экспериментальных животных сравнивали с показателями интактных (неоперированных) собак.

Результаты. В ПББМ в течение 14 суток фиксации снижался уровень гликогена и глюкозы. На 28-е сутки фиксации уровень этих метаболитов соответствовал уровню интактных животных. К концу фиксации обнаружено, что скорость утилизации гликогена в ПББМ экспериментальных животных была достоверно снижена относительно интактных животных, а скорость утилизации глюкозы не изменялась, при этом вся глюкоза практически полностью утилизовалась по аэробному пути. Через месяц после окончания лечения в ПББМ отмечался рост уровня гликогена и активности ММ-изофермента лактатдегидрогеназы. При добавлении в бесклеточную культуру мышц раствора гликогена обнаружена значительная его утилизация и накопление пирувата.

Выводы. Анаэробный энергообмен в ПББМ травмированного сегмента преобладал до 14-х суток после травмы, аэробный – после 28-х суток. Обнаружен феномен роста анаэробного энергетического метаболизма ПББМ травмированного сегмента в течение трех месяцев после лечения.

Ключевые слова: перелом, скелетные мышцы, углеводный обмен.

ENERGY METABOLISM IN SKELETAL MUSCLES IN DOGS DURING TREATMENT OF SHIN FRACTURES WITH ILIZAROV'S TECHNIQUE

M.V. Stogov, A.V. Smirnov

Russian Ilizarov Scientific Center of Restorative Traumatology and Orthopaedics
Kurgan

Aim – to study the dynamics of the recovery of energy resources in the tibialis anterior (TA) in dogs after shin fractures.

Material and methods. The concentration of energy metabolism substrates, the rate of glycolysis and glycogenolysis in TA in 25 dogs during the treatment of tibial fractures by Ilizarov were studied. The values parameters in the experimental animals were compared with values in the intact (non-operated) dogs.

Results. The level of glycogen and glucose decreased in TA within 14 days of fixation. On the 28th day of fixing the level of these metabolites corresponded to the level in intact animals. By the end of fixation the rate of glycogen utilization in TA of experimental animals was significantly reduced relative to intact animals, and the rate of glucose utilization was unchanged, though all glucose was almost entirely utilized by aerobic way. A month after treatment there was an increase of glycogen levels in the TA and activity of lactate dehydrogenase MM-isoenzyme. When glycogen solution added to the cell-free culture of muscle the its considerable utilization and the pyruvate accumulation were found.

Conclusions. Anaerobic energy metabolism of in the TA of injured segment have prevailed before the 14-th day after the injury, the aerobic energy metabolism – after 28-days. The phenomenon of growth of anaerobic energy metabolism in TA of injured segment within three months after treatment was revealed.

Key words: fracture, skeletal muscle, carbohydrate metabolism.

Введение

Решение проблемы лечения и реабилитации травматологических пациентов может быть достигнуто только при понимании фундаментальных закономерностей протекания метаболических процессов, происходящих в тканях

опорно-двигательного аппарата. Исследования показали, что после переломов костей конечностей в клинике и эксперименте к концу лечения и в отдаленные сроки полного восстановления функциональных характеристик скелетных мышц травмированной конечности не происхо-

дит [1–3]. В связи с этим нерешенной остается проблема раннего восстановления функциональной активности скелетных мышц, формирующейся, прежде всего, на основе высокого КПД реакций тканевого энергообмена. В этом плане изучение эффективности реакций энергообмена в мышцах является актуальной фундаментально-прикладной задачей.

Цель работы – исследовать динамику восстановления энергетических ресурсов в передней большеберцовой мышце собак после перелома костей голени.

Материал и методы

У 25 взрослых беспородных собак моделировали ударный закрытый оскольчатый перелом костей правой голени (тип В по международной классификации АО/ASIF) путем удара груза массой 5 кг с высоты 1,5 м в свободном падении на латеральную поверхность конечности с помощью специального устройства для нарушения целостности кости (патент РФ 2321896). Затем голень временно иммобилизовали шиной, а на следующие сутки производили закрытый остеосинтез аппаратом Илизарова (оперативные вмешательства выполнены к.в.н. М.А. Степановым). В ходе лечения опорная функция травмированной конечности в статике у всех животных отмечалась уже на 7-е сутки фиксации, опорная функция при передвижении проявлялась не позднее 21-х суток фиксации.

Животных выводили из эксперимента на сроках фиксации (длительность нахождения в аппарате составила 49 суток), через 1 и 3 месяца после снятия аппарата. В качестве объектов исследования была взята передняя большеберцовая мышца (ПББМ) травмированного сегмента конечности. Результаты исследования в экспериментальной группе сравнивали с группой интактных животных ($n=7$). На проведение экспериментального исследования получено разрешение комитета по этике при ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ.

Материал для исследований с травмированной конечностей брали сразу же после эвтаназии. Затем ткань отмывали от эритроцитов охлажденным 0,05М раствором калий-фосфатного буфера, измельчали ножницами и растирали при 5°C в гомогенизаторе Поттера до получения однородного гомогената, который центрифугировали 15 мин при 14000g на ультрацентрифуге «Beckman&Coulter» (США). В полученном надосадке определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), концентрацию глюкозы, пировиноградной (ПВК) и молочной кислот (МК). В сырой ткани определяли содержание гликогена.

Скорость гликолиза и гликогенолиза оценивали при добавлении в полученный после центрифугирования мышечный экстракт растворов гликогена и глюкозы. Соотношение реагентов: 0,5 мл мышечного экстракта и 0,25 мл 0,33% раствора гликогена или 0,03М раствора глюкозы на 0,05М калий-фосфатном буфере. Время инкубации – 60 минут при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Для определения исходных концентраций субстрата параллельно ставили контрольную пробу, в которую ТХУ приливали к инкубационной смеси перед добавлением субстратов. Затем в депротеинизированном субстрате определяли концентрацию гликогена, глюкозы, пирувата и лактата. По разнице с контрольной пробой рассчитывали прибыль или убыль субстрата.

Активность ЛДГ, а также концентрацию глюкозы и лактата определяли на биохимическом фотометре Stat Fax 1904+ (США), используя наборы реагентов фирмы Vital Diagnostic (РФ). Концентрацию ПВК определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Электрофоретическое разделение ЛДГ проводили на системе Paragon (Beckman, США) с использованием реактивов и пластин этой же фирмы. Концентрацию гликогена определяли прямым антроновым методом.

Достоверность различий между значениями показателей, полученных на сроках эксперимента, и значениями интактных животных оценивали с помощью W-критерия Вилкоксона для независимых выборок.

Результаты

Динамика изменения концентрации продуктов энергетического обмена в передней большеберцовой мышце собак в ходе лечения закрытого оскольчатого перелома костей голени представлена в таблице 1.

Полученные данные показывают, что в раннем посттравматическом периоде происходило значительное снижение энергетических ресурсов в исследуемой мышце. В частности, концентрация гликогена и глюкозы в ПББМ экспериментальных животных на 14-е сутки после перелома была практически вдвое ниже уровня интактных животных. В последующие сроки концентрация этих субстратов в ткани восстанавливалась до уровня интактных животных. При этом содержание гликогена в мышце через 30 суток после окончания лечения было достоверно выше уровня нормы. Концентрация пирувата в ПББМ травмированного сегмента была значимо повышена на 28-е и 49-е сутки фиксации. Содержание лактата в ПББМ на сроках фиксации статисти-

чески значимо относительно интактных животных не изменялось, однако через 90 суток после снятия аппарата содержание этого метаболита в мышце оказалась значимо ниже нормы. Отмеченное изменение продуктов энергообмена свидетельствовало о том, что в ранний период после травмы в исследуемой мышце преобладали процессы анаэробного обмена, после 28-х суток посттравматического периода отмечалась активация аэробного метаболизма.

В пользу этого говорят и данные об изменении активности ЛДГ и ее изоферментного спектра в ткани (табл. 2). Общая активность ЛДГ в ПББМ травмированной конечности была статистически значимо повышена на 28-е, 49-е сутки фиксации и через месяц после снятия аппарата, при этом доля ЛДГ5 изоэнзима (анаэробного) в ПББМ травмированной конечности увеличивалась на 14-е сутки фиксации и в периоде лечения без аппарата. Снижение концентрации субстратов энергообмена на 14-е сутки фиксации с одновременным увеличением в изоферментном спектре ЛДГ пятой фракции говорило об анаэробной направленности гликолиза и гликогенолиза в ПББМ в этот период.

К моменту снятия аппарата (49-е сутки фиксации) в ПББМ травмированной конечности происходила существенная перестройка изоферментного спектра ЛДГ: достоверно увеличивалась доля ЛДГ1-ЛДГ3 фракций, при значительном снижении ЛДГ4 и ЛДГ5 фракций. Это приводило к тому, что суммарная доля анаэробных фракций ЛДГ4+ЛДГ5 на 49-е сутки после травмы составляла 54,0%, при норме в 64,0%, а сумма ЛДГ1+ЛДГ2 – 17,8% (в здоровой мышце – 10,6%).

К концу фиксации нами также обнаружено, что скорость утилизации гликогена в ПББМ экспериментальных животных была достоверно снижена относительно интактных животных, а скорость утилизации глюкозы не изменялась, при этом вся глюкоза практически полностью утилизировалась по аэробному пути (табл. 3). Такие изменения (сдвиг изоферментного спектра, изменения интенсивности утилизации и концентрация субстратов энергообмена в мышце) свидетельствовали о возрастании аэробного пути распада углеводов к моменту снятия аппарата, причем в основном за счет гликолиза.

Таблица 1

Содержание субстратов энергообмена в передней большеберцовой мышце собак при заживлении закрытого оскольчатого перелома костей голени (медиана; 25-й÷75-й процентиля)

Сроки эксперимента	Гликоген, мг/100 мг ткани	Глюкоза, ммоль/г ткани	ПВК, мкмоль/г ткани	МК, ммоль/г ткани
Интактные животные (n=8)	2,66; 2,37÷3,46	13,5; 11,2÷14,9	745; 560÷840	24,9; 20,3÷25,8
14-е сутки фиксации (n=4)	1,41*; 1,31÷19,6	6,9*; 4,9÷9,0	725; 431÷920	18,6; 16,2÷21,0
28-е сутки фиксации (n=5)	2,76; 2,55÷3,19	11,4; 9,1÷13,9	880*; 860÷1232	18,2; 16,7÷21,1
49-е сутки фиксации (n=5)	4,02; 2,40÷5,64	9,2; 7,8÷12,1	1243*; 1196÷1291	21,3; 18,2÷23,4
30-е сутки без аппарата (n=6)	5,11*; 4,76÷5,76	11,5; 10,3÷13,5	897; 747÷942	16,8; 13,7÷24,6
90-е сутки без аппарата (n=5)	3,25; 3,24÷3,25	10,9; 10,1÷13,9	808; 706÷888	11,3*; 9,4÷13,1

* – уровень значимости различий (p=0,05) по сравнению с интактными животными.

Таблица 2

Активность лактатдегидрогеназы (медиана; 25-й÷75-й процентиля) и ее изоферментный спектр (медиана) в передней большеберцовой мышце собак при заживлении закрытого оскольчатого перелома костей голени

Сроки эксперимента	ЛДГ, мкат/г белка	Изоферменты ЛДГ, %				
		1	2	3	4	5
Интактные животные (n=8)	21,5; 18,2÷22,0	0,8	9,8	22,6	27,0	37,0
14-е сутки фиксации (n=4)	21,1; 16,1÷23,2	1,2	9,0	21,3	21,6*	46,9*
28-е сутки фиксации (n=5)	31,1*; 28,6÷34,4	1,5	10,2	22,1	26,9	39,3
49-е сутки фиксации (n=5)	29,2*; 24,5÷33,9	3,8*	14,0*	28,1*	23,3*	30,7*
30-е сутки без аппарата (n=6)	31,2*; 27,9÷35,4	0,7	8,8	20,4	24,2	45,5*
90-е сутки без аппарата (n=5)	19,9; 16,8÷23,1	1,7	11,4	17,5*	22,2*	47,2*

* – уровень значимости различий (p<0,05) по сравнению с интактными животными.

Таблица 3

Скорость образования/убыли (+/-) субстратов обмена при инкубации мышечного экстракта с добавлением в среду растворов гликогена и глюкозы (медиана)

Группа исследования	Δгликоген, мкг/час	Δглюкоза, мкмоль/час	Δпируват, мкмоль/час	Δлактат, мкмоль/час
Гликоген				
Интактные животные	-26,6	-21,8	-4,4	+27,1
Экспериментальные животные				
конец фиксации	-7,1*	-17,9	+6,7	+26,2
месяц после снятия аппарата	-500,4*	-23,9	+16,2*	+31,7
Глюкоза				
Интактные животные	-29,2	+4,1	-6,7	+21,6
Экспериментальные животные				
конец фиксации	+23,1	+6,9	-4,2	0*
месяц после снятия аппарата	-224,6*	+4,7	-8,4	+15,8

* – уровень значимости различий ($p=0,05$) по сравнению с интактными животными.

Однако наиболее интересные изменения наблюдались в ПББМ через несколько месяцев после окончания лечения. Так, через месяц после снятия аппарата на фоне роста уровня гликогена в ткани в ПББМ заметно увеличивалась доля ЛДГ5 анаэробной фракции. При добавлении в бесклеточную культуру раствора гликогена обнаружены значительная его утилизация и накопление пирувата. При добавлении глюкозы скорость утилизации гликогена также оставалась повышенной. Такие изменения свидетельствовали о значительном потреблении тканью гликогена, что говорило сохраняющемся в этом периоде дисбалансе энергетического обмена.

Выводы

Таким образом, энергетическое обеспечение ПББМ в посттравматическом периоде характеризовалось ростом реакций гликолиза: до 14-х суток после травмы – анаэробного, после 28-х суток – аэробного. В восстановительном периоде (в течение 3-х месяцев после снятия аппарата) нами обнаружен феномен роста анаэробного энергообмена в ПББМ травмированного сегмента. Такие изменения могут являться причиной замедления восстановления функциональных характеристик скелетных мышц в период после окончания лечения. Соответственно этому в плане реабилитационных мероприятий (лечебная физкультура) у травматологических

пациентов должны преобладать нагрузки преимущественно аэробной направленности.

Литература

1. Стогов М.В., Лунева С.Н., Гайдышев А.И. Кинетические характеристики миозиновой АТФазы в скелетных мышцах собак после перелома костей голени. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011;(4):398-400.
Stogov M.V., Luneva S.N., Gaydyshev A.I. Kineticheskie kharakteristiki miozinovoy ATF-azy v skeletnykh myshtsakh sobak posle pereloma kostei goleni [Kinetic characteristics of the myosin adenosine triphosphatase in skeletal muscles of dogs after a shin fracture]. Byulleten' eksperimental' noy biologii i meditsiny. 2011;(4):398-400.
2. Щуров В.А., Сагымбаев М.А., Горбачева Л.Ю. Сократительная способность мышц – тыльных сгибателей стопы при заболеваниях и травмах голени. Гений ортопедии. 2003;(4):57-60.
Shchurov V.A., Sagymbaev M.A., Gorbacheva L.Yu. Sokratitel'naya sposobnost' myshts – tyl'nykh sgbateley stopy pri zabolevaniyakh i travmakh goleni [Contractility of the dorsal flexor muscles of the foot in diseases and injuries of the shin]. Geniy ortopedii. 2003;(4):57-60.
3. Щуров В.А., Швед С.И., Щуров И.В., Сазонова Н.В. Опорная и опорно-динамическая функция нижних конечностей у больных с переломами костей голени. Гений ортопедии. 2008;(2):9-12.
Shchurov V.A., Shved S.I., Shchurov I.V., Sazonova N.V. Opornaya i oporno-dinamicheskaya funktsiya nizhnikh konechnostey u bol'nykh s perelomami kostey goleni [The support and support-dynamic function of the lower extremities in patients with fractures of the shin]. Geniy ortopedii. 2008;(2):9-12.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Стогов Максим Валерьевич – д.б.н. ведущий научный сотрудник клинко-экспериментального лабораторного отдела

E-mail: stogo_off@list.ru;

Смирнов Александр Викторович – аспирант

E-mail: smirnov_sasha@mail.ru.

Рукопись поступила 28.05.2012