

*С.В. Иващенко, В.С. Улащик, И.В. Семак, Е.С. Иващенко,  
В.А. Горанов, И.И. Попова*

## **Изменение содержания в крови кроликов метаболитов костной ткани после воздействия на неё низкочастотным ультразвуком**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»  
Институту физиологии НАН Беларуси  
УО «Белорусский государственный университет  
ЦНИЛ БГМУ*

Представлены экспериментальные данные о содержании маркёров резорбции костной ткани в сыворотке крови животных после воздействия низкочастотным ультразвуком.

**Ключевые слова:** низкочастотный ультразвук, кальций, остеокальцин, кросс-лапс.

Воздействие ультразвуком вызывает многообразные тканевые и клеточные реакции в области озвучивания, влечет за собой развитие за счет нейрогуморального механизма опосредованных реакций со стороны органов и систем, вызывает развитие реакций компенсаторно-приспособительного характера, повышает неспецифическую резистентность организма.

Ультразвуковые волны нормализуют крово- и лимфообращение, улучшают обмен веществ, оказывают нормализующее влияние на все системы организма, обладают обезболивающим, спазмолитическим, противовоспалительным и десенсибилизирующим действием. Сегодня высокочастотная ультразвуковая терапия с успехом используется в самых различных областях медицины: стоматологии, неврологии, ортопедии, дерматологии, терапии и др. В последние годы в лечебную практику стал активно внедряться низкочастотный ультразвук (от 16 до 200 кГц), отличающийся более высокой биологической активностью и простотой применения [1,2].

В настоящее время накоплен уже достаточный опыт клинического применения низкочастотного ультразвука. При этом в ряде работ не только показана перспективность его использования при отдельных заболеваниях, но и доказана большая эффективность этого метода по сравнению с традиционной фонотерапией, основанной на использовании ультразвука высокой частоты (880-1000 кГц и 2640-3000кГц). Однако, несмотря на большое количество данных о благоприятном влиянии ультразвука на организм человека, все еще не достаточно изучены механизмы терапевтических эффектов низкочастотного ультразвука, его влияние на биохимические показатели крови.

Действие низкочастотного ультразвука на организм обусловлено совместным влиянием многих факторов, среди которых основными являются механический, тепловой и физико-химический. Благодаря им при низкочастотной фонотерапии развиваются разнообразные изменения в области воздействия, которые приводят к формированию сегментарно-рефлекторных и системных приспособительных реакций организма. За счет механических колебаний происходит микромассаж

тканей, их разрыхление, усиление микроциркуляции и регионального кровообращения, повышение сосудистой и эпителиальной проницаемости, усиление диффузионных и обменных процессов, деполимеризация крупномолекулярных белков и других биополимеров, изменение конформации мембран, стимуляция функций соединительной ткани.

Тепловой и физико-химические факторы усиливают указанные эффекты, а также изменяют активность ферментов и скорость биохимических процессов, дисперсность коллоидов клетки, ведут к образованию биологически активных веществ и др.

Эти и другие первичные изменения способны стимулировать компенсаторно-приспособительные и защитные реакции организма, нормализовать деятельность органов и систем, оказывать благоприятное влияние на общую и местную реактивность организма и обмен веществ.

Установлено, что низкочастотный ультразвук стимулирует внутриклеточный биосинтез и регенераторные процессы. Это связано, прежде всего, с активным усилением кровообращения в месте воздействия фактора. За счет улучшения микроциркуляции, устранения застойных явлений, повышения фагоцитарной активности лейкоцитов низкочастотный ультразвук оказывает противовоспалительное действие. В тканях стимулируются процессы транскапиллярного обмена, усиливается синтез белков.

Иммуностимулирующий эффект ультразвука низкой частоты реализуется через макрофагальное звено иммунитета, активируя фагоцитарную и регуляторную функцию макрофагов. Кроме того, под влиянием низкочастотного ультразвука происходит увеличение содержания Т-розеткообразующих лимфоцитов в периферической крови, гипертрофия Т-зависимых зон в лимфатических узлах и селезенке, интенсифицируются процессы образования антител при антигенной нагрузке.

Низкочастотный ультразвук активизирует трансагипофизарный и парагипофизарный пути нейроэндокринной передачи, нормализуя функции гипофиза, надпочечников, щитовидной и половых желез, стимулирует обмен катехоламинов и других биогенных аминов.

Низкочастотная ультразвуковая терапия способствует нормализации функции внешнего дыхания, повышает усвоение тканями кислорода; усиливает энзиматическую активность лизосомальных ферментов альвеолоцитов, стимулирует репаративную регенерацию альвеолярной ткани, устраняет спазм бронхов и сосудов легких.

На основании проведенных морфологических и физико-химических исследований образцов костной ткани после воздействия низкочастотным ультразвуком, нами установлено, что эти воздействия приводят к локальной прижизненной деминерализации и реструктуризации костной ткани, поэтому целью настоящего исследования было определение биохимических маркеров костного метаболизма в крови кроликов после воздействия низкочастотным ультразвуком.

Все биохимические маркеры костного метаболизма могут быть разделены на маркеры образования кости и маркеры костной резорбции. К маркерам

костеобразования относятся щелочная фосфатаза и остеокальцин, к маркерам резорбции кости – тартрат-резистентная кислая фосфатаза и продукты деградации коллагена 1 типа (С-терминальный телопептид коллагена 1 типа, пиридинолин, дезоксипиридинолин).

Остеокальцин (ОС) - основной неколлагеновый белок костного матрикса - имеет небольшие размеры, состоит из 49 аминокислот и содержит много глутаминовой кислоты (ГЛК) . Остеокальцин также известен как костный GLA-белок. Кроме костной ткани, он также обнаружен в дентине. Функция остеокальцина полностью не определена, однако, установлено, что он может служить местом для размещения кристаллов гидроксилатапата. В процессе синтеза матрикса некоторое количество остеокальцина выделяется и циркулирует в крови с коротким периодом полураспада, который зависит от почечного клиренса. Хотя неповрежденный остеокальцин не выделяется в период резорбции кости, его фрагменты *in vitro* определяются также при резорбции и формировании КТ . Уровень остеокальцина может быть определен с помощью иммуноферментного метода в плазме или сыворотке. Остеокальцин является лабильной субстанцией в крови. Уровень его снижается в липидемической сыворотке через связывание остеокальцина липидами. Исследования уровня остеокальцина не стандартизованы , и различные антитела, очевидно, выявляют разные его фрагменты . Антитела, определяющие как неповрежденную молекулу, так же как и большой N-конечный среднемолекулярный фрагмент, вероятно, обеспечивают наилучшую клиническую информацию .

ОС – один из наиболее распространенных неколлагеновых белков кости, который продуцируется остеобластами. ОС долгое время считался маркером костеобразования. В дальнейшем было показано, что сывороточный уровень ОС отражает увеличение продукции данного протеина, который не интегрируется в матрикс костной ткани или образуется в результате резорбции кости. Поэтому считается, что остеокальцин отражает не только процессы костеобразования, но и общий уровень (скорость) метаболизма кости. Современные наборы для радиоиммунометрического определения сывороточной концентрации ОС, используя специфические моноклональные антитела, позволяют оценить уровень интактного ОС и не оценивают его фрагменты. Однако сывороточный уровень ОС обладает низкой стабильностью и выделяются из организма через почки. Уровень ОС зависит от пола и возраста (наличия менопаузы) [7].

Продукты деградации коллагена 1 типа. С-терминальный телопептид коллагена 1 типа ( $\beta$ -СТх) – это дериват коллагена, который выделяется в кровь при резорбции кости. Более 90 % органического матрикса кости состоит из коллагена I типа, который синтезируется в основном в костной ткани. Анаболизм и катаболизм основного вещества костной ткани находится под контролем регулирующих механизмов. При нормальном костном метаболизме зрелый коллаген I типа распадается, небольшие фрагменты его попадают в кровоток и экскретируются почками. Активность костного метаболизма можно оценить с помощью определения маркеров костной резорбции. При физиологически или патологически повышенной резорбции кости (например, в пожилом возрасте или в результате остеопороза), коллаген I типа деградирует более интенсивно и,

соответственно, увеличивается уровень фрагментов коллагена в крови. Тест b-Кросс-Лапс специфичен для фрагментов коллагена I типа независимо от природы поперечных связей в этих фрагментах (например, пиррол, пиридинолин и т.д.). Специфичность метода гарантирована использованием двух моноклональных антител, каждое из которых «узнает» линейные октапептиды b-8AA. Повышенное содержание в крови фрагментов коллагена I типа наблюдается у пациентов с повышенной костной резорбцией. Содержание в крови этих фрагментов возвращается к норме после анти-резорбтивной терапии. Назначение этого теста рекомендовано для мониторинга эффективности антирезорбтивной терапии (например, бисфосфонатами или при гормон-заместительной терапии) при остеопорозе и других заболеваниях костной ткани. Индуцированные терапией изменения могут быть заметны спустя всего несколько недель[8].

Кальций в организме играет важную роль. Он входит в состав апатитов и придаёт механическую прочность костям, выполняет гемостатическую функцию, играет определённую роль в возникновении и развитии потенциала действия, вызывает сокращение мышц, способствует (запускает) выделению нейромедиаторов и гормонов, является внутриклеточным мессенджером (гормоном). В организме содержится примерно один килограмм кальция. Девяносто девять процентов этой массы находится в костях и зубах. Костная ткань достаточно динамична, в ней постоянно протекают процессы резорбции и образования. Однако основная масса кальция обычно не участвует в обменных процессах. Только примерно один процент кальция из общего количества вовлекается в метаболизм, являясь важным источником для внеклеточной жидкости. В плазме кальций находится в трёх формах: в виде комплексов с органическими кислотами, связанный с белками и в форме ионов. Около 6% всего кальция входит в состав комплексов с цитратом, фосфатом и другими анионами, а оставшийся примерно поровну делится между кальцием, связанным с белками, и свободным кальцием (ионизированный кальций). Если концентрация кальция падает, могут развиваться судорожные синдромы и возбуждение ЦНС, если увеличивается - могут наступить мышечный паралич или кома[6].

### **Материал и методы исследования**

Эксперимент проведен на 36 кроликах породы шиншилла одинакового веса и возраста. Кроликов разделили на шестнадцать групп. Одну контрольную - 6 особей и пять опытных – по 6 особей в каждой. В первой опытной группе проводили озвучивание костной ткани и слизистой альвеолярного отростка нижней челюсти в области центральных резцов ультразвуком частотой 22 кГц до десяти минут по 5, 10 и 15 процедур соответственно. Во второй опытной группе проводили озвучивание костной ткани и слизистой в этой же области ультразвуком частотой 44 кГц до десяти минут, также по 5, 10 и 15 процедур соответственно. В третьей опытной группе проводили озвучивание костной ткани и слизистой в этой же области ультразвуком частотой 60 кГц до десяти

минут, также по 5,10 и 15 процедур. В четвёртой опытной группе проводили озвучивание костной ткани и слизистой в этой же области ультразвуком частотой 80 кГц до десяти минут, также по 5,10 и 15 процедур. В пятой опытной группе проводили озвучивание костной ткани и слизистой в этой же области ультразвуком частотой 100 кГц до десяти минут, также по 5,10 и 15 процедур. Животные находились на стандартном рационе вивария. Забор крови осуществляли из краевой вены уха после 5, 10 и 15 процедур УЗ, проводимых ежедневно или через день, а так же через месяц после окончания процедур. Для определения уровней кальция, ОС,  $\beta$ -СТх кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. для отделения сыворотки. Образцы сыворотки крови замораживали и хранили в микропробирках. Уровни ОС,  $\beta$ -СТх определяли электрохимилюминесцентным методом с использованием коммерческих наборов фирмы Roche Diagnostics GmbH на автоматическом анализаторе Modular.

Содержание кальция в сыворотке крови определяли при помощи набора реактивов для определения кальция фотометрическим методом с глиоксаль-бис (2-гидроксианилом). Глиоксаль-бис (2-гидроксианил)(ГБОА) образует в щелочной среде окрашенное соединение, которое фотометрируют.

Результаты исследования обработаны с помощью специальных прикладных программ с вычислением средней арифметической величины (M), стандартного отклонения (SD), критериев достоверности Стьюдента (t), вероятности достоверности сравниваемых величин (P). Различия рассматривались как достоверные при  $P < 0,05$  [5].

#### Результаты и обсуждение

Полученные данные экспериментальных исследований приведены в табл. 1-3.

Таблица 1. Содержание кальция в сыворотке крови (ммоль/л) опытных животных

Сроки определения	22кГц	44 кГц	60 кГц	80 кГц	100 кГц
5процедур N	2,89± 0,2 6	2,9± 0,2* 6	3,01± 0,1* 6	3,1± 0,1* 6	3,15± 0,2* 6
10процедур N	3,04± 0,2* 6	3,1± 0,1* 6	3,17± 0,2* 6	3,2 ±0,2* 6	3,28± 0,2* 6
15процедур N	3,11 ±0,2* 6	3,25± 0,2* 6	3,28± 0,2* 6	3,37 ±0,2* 6	3,49 ±0,3* 6
Ч-з месяц N	2,59±0,2 6	2,59±0,3 6	2,59±0,2 6	2,6±0,2 6	2,63±0,2 6

\*Различия достоверны в сравнении с контролем (2,59±0,2)

N -количество животных

Как видно из данных, представленных в табл.1 , после 10 процедур воздействия ультразвуком частотой 22 кГц содержание кальция в сыворотке крови подопытных животных достоверно повышается, по сравнению с контролем .В дальнейшем эта разница увеличивается с увеличением количества процедур и частоты озвучивания. Наибольшая разница по сравнению с контролем выявлена при частоте озвучивания 100 кГц в количестве 15-ти процедур. Важно отметить, что в самой кости после озвучивания наблюдается уменьшение содержания кальция [1].

Через месяц после окончания процедур все показатели соответствуют контролю.

Таблица 2.Содержание остеокальцина в сыворотке крови (пг/мл)

Сроки определения	22кГц	44 кГц	60 кГц	80 кГц	100 кГц	контроль
5процедур N	25,0± 1,6 6	26,1± 1,2 6	26,1 ±1,4 6	26,4± 0,8 6	26,5±0,9 6	26,4±1,7 6
10процедур N	26,6± 1,7 6	26,6± 1,4 6	27,2 ±1,7 6	26,5± 1,7 6	26,9± 1,1 6	
15процедур N	26,9 ±1,6 6	26,4± 1,8 6	26,1 ±1,2 6	27,0± 1,9 6	27,7± 1,2 6	
Ч-з месяц N	26,6 ±1,7 6	27,1±1,4 6	24,7± 0,5 6	27,1±1,1 6	28,2± 1,4 6	

N -количество животных

Проведенное исследование не выявило достоверных различий содержания остеокальцина в сыворотке крови подопытных животных в сравнении с контролем и между группами. Во всех опытах содержание остеокальцина примерно одинаковое и соответствует контролю, что может свидетельствовать об отсутствии грубых повреждений коллагенового матрикса костной ткани при воздействии ультразвуком низкой частоты.

Аналогичные показатели выявлены и через месяц после окончания курса ультразвуковой терапии.

Таблица 3.Содержание Кросс-Лапса в сыворотке крови (пг/мл)

	22кГц	44 кГц	60 кГц	80 кГц	100 кГц	контроль
5процедур	0,30± 0,01	0,30± 0,01	0,31± 0,01*	0,31± 0,01*	0,32± 0,01*	0,27± 0,02
N	6	6	6	6	6	6
10процедур	0,31± 0,01*	0,31± 0,01*	0,31± 0,01*	0,32± 0,01*	0,33± 0,01*	
N	6	6	6	6	6	
15процедур	0,31± 0,01*	0,32± 0,01*	0,33± 0,02*	0,34± 0,03*	0,34± 0,02*	
N	6	6	6	6	6	
Ч-з месяц	0,27± 0,02	0,27± 0,02	0,28± 0,01	0,29± 0,01	0,3± 0,01	
N	6	6	6	6	6	

\* Различия достоверны в сравнении с контролем

N -количество животных

Данные, представленные в табл.3, свидетельствуют о том, что после десяти процедур озвучивания ультразвуком частотой 22 кГц наблюдаются достоверные отличия содержания кросс-лапса в сыворотке крови подопытных животных по сравнению с контролем. Эта разница растёт с увеличением количества процедур и частоты озвучивания. Наибольшие различия выявлены после 15-ти процедур при частоте воздействия 100 кГц. Это согласуется с полученными ранее морфологическими и электронно-микроскопическими данными об усилении процессов резорбции в костной ткани при увеличении частоты озвучивания и количества процедур[3,4].

Через месяц после окончания процедур все показатели соответствуют контролю.

### **Проведенное исследование позволило сделать следующие выводы :**

1. Воздействие низкочастотным ультразвуком независимо от частоты и количества процедур не вызывает повышения содержания остеокальцина в сыворотке крови подопытных животных.
2. Применение ультразвука низкой частоты вызывает локальную кратковременную резорбцию костной ткани, что подтверждается данными о незначительном повышении содержания кросс-лапса в сыворотке крови животных, и восстановлении его уровня через месяц после курсового воздействия.
3. Под влиянием низкочастотного ультразвука наступает обратимая деминерализация костной ткани, о чём свидетельствует кратковременное и незначительное повышение содержания кальция в сыворотке крови подвергнутых озвучиванию животных.

## Литература

1. Ивашенко, С. В. Изменение костной ткани после воздействия низкочастотным ультразвуком /С. В. Ивашенко// Медицинский журнал. 2007. № 2. С. 46–48.
2. Ивашенко, С. В. Физические факторы в комплексном лечении зубочелюстных аномалий и деформаций / С. В. Ивашенко, В. С. Улащик // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. Россия. 2006. № 6. С. 44–49.
- 3.Ивашенко, С. В. Сравнительная морфологическая оценка костной ткани челюсти кролика после воздействия ультразвуком низкой частоты по данным световой микроскопии / С. В. Ивашенко, Г. А. Берлов // Медицинский журнал. 2009. № 4. С. 36–40.
4. Ивашенко, С. В. Изменения костной ткани челюсти после воздействия низкочастотным ультразвуком / С. В. Ивашенко, Е. Л. Рыжковская, В. С. Улащик // Современная стоматология. 2010. № 1. С. 70–73.
5. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей / В. Долгов [и др.]. М.: «Лабинформ», «Центр», 1995. 224 с.
6. Олецкий, Э. И. Биохимия соединительной ткани и органов полости рта: пособие / Э. И. Олецкий, А. Д. Таганович, В. К. Кухта. Минск: БГМУ, 2002. 62 с.
7. Biochemistry Dawn B. Marks Williams& Wilkins. Baltimor-Paris-Wroclaw. 1994. 337 p.
- 8.Mosenbach, K. O-Biochemie fur Zahnmediziner, 1986. 557 s.