

НАКОСКИН Александр Николаевич

**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ПОЛОВЫЕ
РАЗЛИЧИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА
КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА**

03.00.04 – биологическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Тюмень – 2004

Работа выполнена в Государственном учреждении науки Российском научном центре «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова

Научные руководители: доктор биологических наук
Светлана Николаевна Лунева
доктор медицинских наук,
Александр Николаевич Дьячков

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор

Петр Низамиевич Шараев

доктор биологических наук, профессор

Ирина Викторовна Ральченко

Ведущая организация: Челябинская государственная
медицинская академия, г. Челябинск

Защита диссертации состоится « » декабря 2004 года на заседании диссертационного совета ДМ 212.274.07 при Тюменском Государственном Университете (625043, г. Тюмень, ул. Пирогова, 3)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тюменского Государственного Университета (625003, г. Тюмень, ул. Семакова, 10)

Автореферат разослан « » 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор
биологических
наук, профессор



Е.А. Чирятьев

Общая характеристика работы

В настоящее время в экономически развитых странах Европы и Америки, а в последние годы и России, наблюдается выраженное старение населения (А.С. Аврунин, 1999). Эти демографические сдвиги представляют собой социально обусловленный процесс. Старение населения планеты делает актуальными ряд проблем социально-экономического и медико-санитарного характера. Сегодня исследователи уже говорят не о простом увеличении количества лет прожитой жизни человека, а о продлении его творческого долголетия (О. М. Лесняк, 2003).

Старение костной ткани проявляется, прежде всего, интенсификацией и рассогласованием процессов костеобразования и резорбции, в результате чего развивается разрежение костной ткани — остеопороз (Л.Б. Лазебник, 1999). Сенильный (возрастной) остеопороз определяется у подавляющего большинства людей старше 45—50 лет и является почти универсальным признаком старения организма человека. По данным ВОЗ, остеопоротические изменения выявляются у 15—50 % всего населения России старше 55 лет, при этом у 30% rareфикация кости настолько выражена, что может привести к переломам (Б.Л. Риггз, 2000; Л.Я. Рожинская, 2000; Н.В. Корнилов, 1998).

Несмотря на огромное количество исследований по данной проблеме, невыясненными остаются вопросы об изменениях в химическом составе межклеточного матрикса кости, возникающих с возрастом, и схожести этих изменений с дегенеративными при различной патологии. С каждым годом увеличивается число остеопоротических переломов, лечение их весьма трудоемко и долговременно. Доля переломов у трудоспособного населения также увеличивается (Е.Е. Михайлов, 2003; Л.В. Меньшикова, 2002). Однако недостаточное знание механизмов этого заболевания не позволяет эффективно бороться с ним. Многие исследователи находят в основе патогенеза остеопороза потерю минеральной фазы кости (Л.Я. Рожинская, 1998), некоторые обнаруживают потерю костной ткани в целом (А.А. Свешников 2002; Л.В. Меньшикова и др, 2003), и практически полностью отсутствуют данные о состоянии биополимеров органического матрикса костной ткани.

С развитием техники и урбанизацией населения России и других стран в последние десятилетия участились случаи массовых катастроф, ведущих к появлению неопознаваемых фрагментов тел их жертв. В связи с этим в бюро судебной медицинской экспертизы (СМЭ) все чаще возникает вопрос об определении пола и возраста трупа по его останкам (В. В. Щербаков, 2000). На сегодняшний день нет общепринятой системы оценки возраста человека по остеологическим данным, за исключением методов с применением атомно-абсорбционной спектрометрии, которые недоступны подавляющему большинству бюро СМЭ.

Отсутствие достоверных данных о составе и строении костной ткани людей различного возраста определили направление предпринятых нами исследований. Их необходимость связана также с тем, что остаются неизученными различия в составе костной ткани мужчин и женщин. Кроме того, изучение минерального состава, характеристики состояния биополимеров и ферментных систем костной ткани человека позволят более точно определять возраст индивидуума в судебно-криминалистических целях.

Цель исследования. На основе биохимических показателей охарактеризовать возрастные изменения и половые отличия химического состава компактной и губчатой костной ткани человека.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать возрастные изменения химического состава компактного и губчатого вещества бедренной кости человека.
2. Изучить возрастное изменение количества минеральных веществ и отношения органической компоненты к неорганической в бедренной кости человека.
3. Оценить различия в составе компактной и губчатой костной ткани бедренной кости мужчин и женщин в возрастные периоды 21-35, 36-60, 61-74 и более 74 лет. Исследовать различие содержания уроновых кислот, сиаловых кислот, гексозаминов, нуклеиновых кислот, коллагена, кальция, фосфатов, магния в компактной костной ткани (КК) бедренной кости и губчатой кости (ГК) головки бедра человека биохимическими методами.
4. Исследовать ферментативную активность белков, выделенных из компактной костной ткани человека в различные возрастные периоды.

Положения, выносимые на защиту.

1 Биохимический состав и строение костной ткани человека зависят от пола и возраста. С возрастом наиболее изменяются содержание анионов (SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) минеральной фазы костной ткани. Наибольшие половые различия наблюдаются во втором зрелом возрасте в составе и строении губчатой костной ткани, выражающиеся в достоверном изменении содержания уроновых кислот, увеличении сульфатов и превышающем, более чем в 5 раз содержании ДНК у женщин.

2 Активность биосинтетических процессов, протекающих в губчатой костной ткани человека, выше, чем в компактной кости, что выражается в большем содержании в губчатой кости количества нуклеиновых кислот и невысоком содержании коллагена.

Научная новизна исследования. Впервые комплексно изучены изменения содержания ионов Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , коллагена, нуклеиновых, сиаловых, уроновых кислот, гексозаминов, компактной и губчатой костной ткани человека в возрастном аспекте. Впервые в возрастном аспекте изучены активность щелочной и кислой фосфатаз в нормальной компактной костной ткани человека. Впервые показано различие в биохимических процессах, протекающих в компактной и губчатой ткани человека, отражающееся на биохимическом составе кости. Впервые изучены различия в обменных процессах протекающих в костной ткани у мужчин и женщин в зрелом, пожилом и старческом возрасте.

Практическое значение. В комплексе оценены изменения в химическом составе костной ткани человека в течение жизни, что позволит внести ясность в исследование патогенеза сенильного остеопороза. По результатам работы в лабораторию биохимии Центра внедрены методы исследования, характеризующие состояние биополимеров костной ткани и методы получения биологически активных веществ. Показано, что результаты работы могут быть использованы при определении паспортного возраста в условиях бюро СМЭ.

Внедрение результатов исследования. По теме диссертации оформлено два изобретения: «Способ выделения гликозаминогликанов из минерализованной

соединительной ткани и косметическое средство по уходу за кожей на основе выделенных гликозаминогликанов» (приоритетная справка на изобретение № 2003131580 033777 от 27.10.2003) и «Способ выделения коллагена из минерализованной соединительной ткани и косметическое средство на его основе» (приоритетная справка на изобретение № 2003134131 036658 от 24.11.2003).

Материалы диссертации включены в планы выполнения курсовых и дипломных работ студентов Курганского государственного университета.

Апробация и публикация работы. Материалы работы доложены на Первом Всероссийском симпозиуме «Возрастные изменения минеральной плотности костей скелета и проблем профилактики переломов», Курган, 2002; работа стала лауреатом республиканской итоговой научно-практической конференции молодых ученых и студентов республики Башкортостан с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины», Уфа, 2004; IX Российском конгрессе «Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, Россия. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ в республиканских и областных изданиях.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, представлений о структуре и химическом составе соединительной ткани, материалов и методов исследования, результатов исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 191 работу (из них 113 отечественных, 78 зарубежных); изложена на 111 страницах машинописного текста, иллюстрирована 14 рисунками и 12 таблицами. Диссертационная работа выполнена по плану НИР РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова № 0,34/1-15 (номер гос. регистрации 01. 2. 00 109073).

Содержание работы

Материалы и методы исследования. Исследования были выполнены на 50 трупах людей в возрасте от 17 до 84 лет, умерших от травм, и не имевших костной патологии. Объектом исследования послужили 50 образцов компактной и 50 образцов губчатой костной ткани, выделенных из верхней трети диафиза бедренной кости и головки бедра трупов. Материал для исследования извлекался в соответствии с приказом Минздрава № 694 от 21 июля 1978 г. п. 2.24 «Инструкция о производстве судебно-медицинской экспертизы в СССР». Полученные образцы костной ткани после выделения запаивались в пластиковый контейнер, подвергались заморозке при -70°C и хранились не более одной недели до препарирования. Для распределения материала по возрастным группам была использована схема, рекомендованная симпозиумом по возрастной периодизации в институте возрастной физиологии АМН СССР в 1969 году (Л.К. Семенова, 1986). Были исследованы образцы компактной и губчатой костной ткани 35 мужчин и 15 женщин нами были использованы статистические критерии для небольших выборок, таких как критерий Крускала – Уоллиса, Дана.

Препарированную ткань помещали во взвешенные заранее пенициллиновые флаконы, закрывали крышками и взвешивали на электронных весах Balance 6110 (Tecator, UK), После этого навески сырой компактной и губчатой костной ткани замораживали при -70°C и высушивали на лиофильной сушке НЕТО Liolab 3000 (Heto, Германия) в течение суток. Высушенные пробы костной ткани обезжиривали

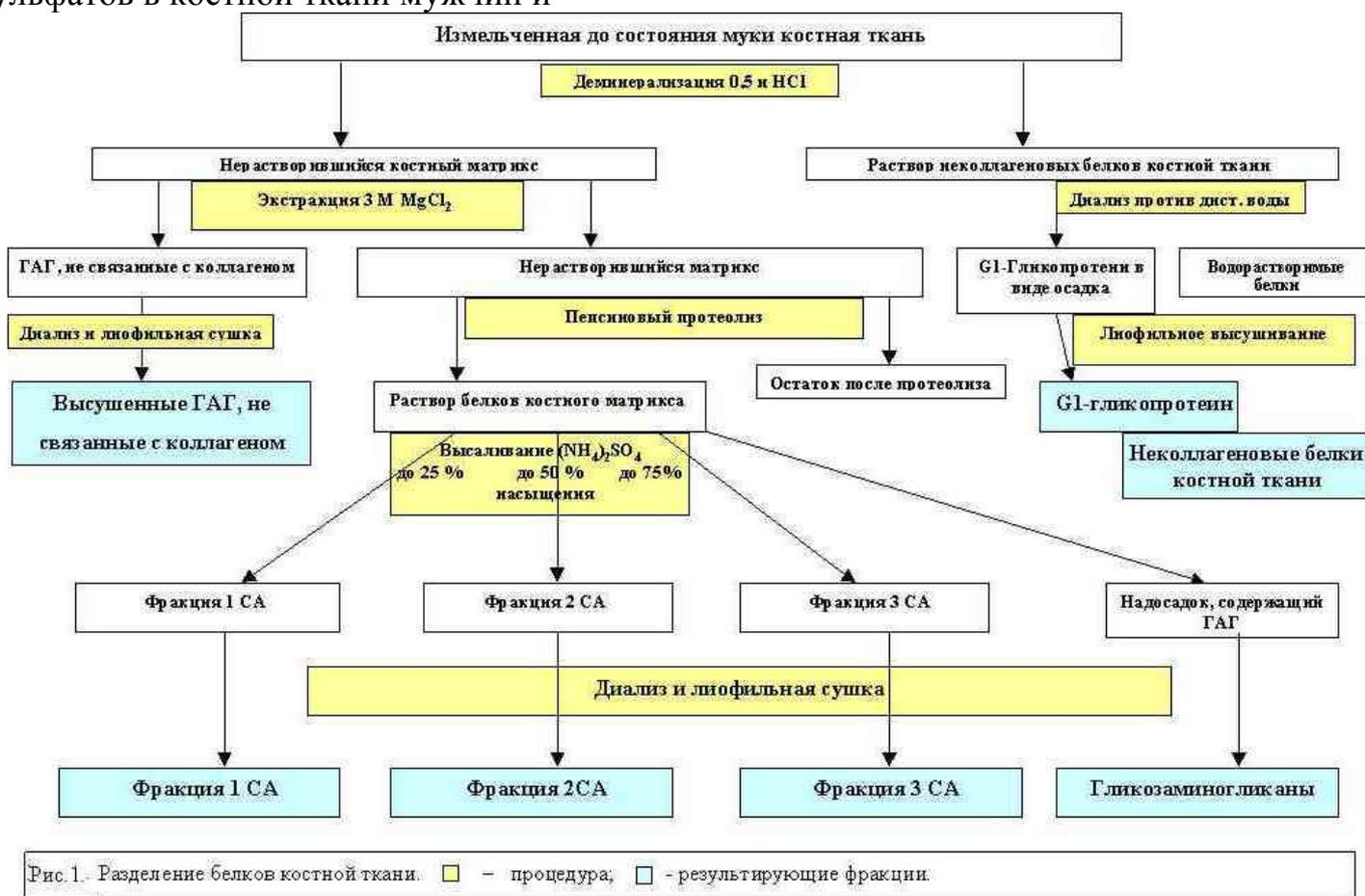
смесью этанол : эфир (1 : 1) в объеме 4 мл смеси на одну пробу. После интенсивного встряхивания жирорастворитель сливали, а костную ткань высушивали в сушильном шкафу в течение суток при температуре 110⁰С. Полученные таким образом пробы костной ткани хранились в холодильнике в закрытых флаконах на протяжении исследования.

Для определения количества минеральных веществ в костной ткани применяли влажное озоление колбах Кьельдаля, изготовленных из стекла «Pirax», смесью уксусного ангидрида и хлорной кислоты 1:1. Колбу со смесью нагревали на песчаной бане до полного обесцвечивания содержимого. Полученные озолы нейтрализовали раствором NaOH до pH 6 – 7 по универсальной индикаторной бумаге. Определение ионов Ca²⁺ выполняли на анализаторе «Corning 940» (Corning, UK), используя реактивы той же фирмы. Исследование количества фосфат-ионов проводили фотометрическим методом с молибдатом аммония в присутствии малахитового зеленого (Г.А. Грибанов, Г.А. Базанов, 1976). Сульфатную серу определяли турбидиметрическим методом с хлористым барием в присутствии полиэтиленгликоля со степенью полимеризации n=20000 с использованием спектрофотометра Ultrospec II (США) (К.С. Десятниченко, 1978). Количество ионов Mg²⁺ в озолыах костной ткани определяли с помощью наборов «Vital diagnostics SPb» на приборе «Stat Fax-1904 Plus®» (США). Количество неорганических веществ выражали в граммах, рассчитанных на 100 граммов сухой обезжиренной костной ткани.

С целью исследования органических компонентов костной ткани нам проведено определение низкомолекулярных мономеров гликозаминогликанов и коллагена, а также общего содержания ДНК и РНК (С. Е. Северин, Г.А. Соловьева, 1989). Количество гексоз определяли орциновым методом (С. Holt, 1954). Гексозамины определяли после сухожарового солянокислого гидролиза цельной костной ткани в запаянных ампулах с реактивом Эрлиха. Определение урсонных кислот проводили карбазоловой реакцией (F. Bitter, Н.М. Muir, 1962). Сиаловые кислоты определяли тиобарбитуровым методом (Шараев, 1990). Содержание углеводных мономеров выражали в ммоль/100 г сухой обезжиренной костной ткани. Количество коллагена, содержащегося в костной ткани, выявляли по содержанию аминокислоты гидроксипролин, по методу П.Н. Шараева в модификации А.Л. Зайдес. Определение общего содержания ДНК и РНК в костной ткани проводили последовательной экстракцией хлорной кислотой после щелочного гидролиза сухой ткани. Расчет количества нуклеиновых кислот вели по неорганическому фосфату, содержащемуся в них, и выражали в мг/100 г сухой обезжиренной ткани.

Разделение костной ткани проводили по схеме, приведенной на рис.1, предложенной К.С Десятниченко. На первой стадии проводилось измельчение компактного костного вещества на мельнице с ручным приводом до частиц 180-360 мкм. Навеску порошка величиной 2 г помещали в виалу и добавляли 15 мл 0,5 М HCl для деминерализации. Виалу закрывали и помещали на магнитную мешалку в холодильник. Через некоторое время отмечалось повышение pH раствора, и его восстанавливали по универсальной индикаторной бумаге концентрированной соляной кислотой. Деминерализацию костной ткани вели до стабилизации pH, после чего суспензию центрифугировали на центрифуге ЦЛ-1 при 3000 об/мин (радиус ротора r=14 см) в течение 30 мин. Супернатант удаляли декантацией и диализовали против дистиллированной воды, используя диализную пленку фирмы CelluSep, не задерживающую белки весом менее 3500

Да. Содержимое диализного мешка высушивали на лиофильной сушке Heto Liolab 3000 (Heto, Германия). Таким образом, получали 1-ю фракцию. Из деминерализованного костного матрикса (осадка) экстрагировалась вторая фракция, добавлением 3 М хлористого магния. Экстрагирование проводили на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение суток, после чего также центрифугировали 3000 об/мин (радиус ротора $r=14$ см), диализовали и высушивали надосадочный раствор в условиях, описанных выше. Далее к костному матриксу добавляли 0,1 М соляной кислоты и подвергали пепсиновому протеолизу. К солянокислой суспензии добавляли пепсин (Пищепром, Россия) на кончике скальпеля, виалу закрывали и помещали на магнитную мешалку в термостат при 37°C , выдерживали в течение суток. После этого суспензия приобретала коллоидные свойства и практически не содержала нерастворенных частичек матрикса. Нерастворившийся остаток отделяли центрифугированием 1500 об/мин (радиус ротора $r=14$ см) и отбрасывали. Супернатант в дальнейшем подвергали сульфатов. В губчатой наблюдается схожая тенденция изменения ионов SO_4^{2-} . У женщин в период до 74 лет количество неорганической серы изменяется мало, однако и в компактной, и в губчатой кости в период после 74 лет выявлено достоверное снижение сульфатов практически втрое. Сравнение содержания сульфатов в костной ткани мужчин и



последовательному высаливанию насыщенным раствором сульфата аммония. Первую фракцию белков костной ткани осаждали при насыщении 25%, раствор выдерживали не менее часа при комнатной температуре, после чего осадок отделяли центрифугированием при 3000 об/мин (радиус ротора $r=14$ см) в течение 30 мин. К полученному надосадочному раствору добавляли раствор сульфата аммония до насыщения 50%. Осадок отделяли в условиях, описанных выше. Точно так же получали фракцию при 75% насыщении. Таким образом, после

высаливания получали четыре фракции костных белков: 1 СА, высаливаемая при 25% насыщении сульфатом аммония, 2 СА и 3 СА при 50% и 75% насыщении соответственно, четвертая фракция – супернатант, оставшийся после высаливания и содержащий белки и гликозаминогликаны, не осаждающиеся при 75% насыщении сульфатом аммония.

Все полученные фракции костных белков растворяли в дистиллированной воде, подвергали диализу против воды, а затем лиофильно высушивали. В результате разделения получили шесть фракций компонентов костной ткани. В полученных фракциях определяли количество уроновых кислот, гексозаминов, коллагена по описанным выше методикам и общее количество белка методом Лоури (74), а так же исследовали их ферментативную активность. Для исследования энергетической функции изучали активность лактатдегидрогеназы (К.Ф. 1.1.1.27) Для исследования антиоксидантной защиты костной ткани исследовалась каталазная активность (К.Ф. 1.11.1.6) выделенных фракций по методу P. Hubl. Протеолитическую активность выделенных фракций определяли по количеству выделившихся ароматических аминокислот по Mirski в модификации Jorgensen. Активность щелочной и кислой фосфатаз определяли с помощью наборов «Vital diagnostics SPb» на приборе «Stat Fax-1904 Plus®» (США).

Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики, применяемым для малых выборок с принятием вероятности (P), равной 0,05. Нормальность выборок полученных результатов оценивали по критерию Титъена-Мура, которые в дальнейшем обрабатывали методами непараметрической статистики. Для сравнения нескольких возрастных групп использовали критерий Крускала-Уоллиса. В дальнейшем для выявления возрастных различий внутри исследуемой совокупности вычисляли критерий Дана. Достоверность различий между несвязанными выборками определяли W-критерием Вилкоксона для независимых выборок. Результаты исследования представляли медианами, 25 и 75 перцентиллями. Для исследования корреляционных связей применяли непараметрический критерий Спирмена. При статистической обработке результатов исследования был использован интеграторный модуль Atte Stat 1.0 для программы Microsoft Excel, разработанный в лаборатории информационно-вычислительного центра РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова И.П. Гайдышевым.

Результаты исследования и их обсуждение. *Исследование содержания коллагена и нуклеиновых кислот.* По полученным нами данным содержание коллагена в

компактной костной ткани мужчин уменьшается от 22 до 74 лет, а в дальнейшем возвращается до первоначальных значений и составляет 30 ± 3 г/100 г сухой обезжиренной ткани (Табл.1.). Кроме этого, нами выявлено, что в возрасте от 22 до 74 лет содержание коллагена в компактной костной ткани достоверно выше, чем в губчатой, как у мужчин, так и у женщин. После 74 лет достоверных отличий не обнаружено. У женщин динамика содержания коллагена несколько отличается от мужчин.

Таблица 1

Содержание коллагена в костной ткани практически здоровых лиц, г/100 г сухой обезжиренной ткани

	Мужчины		Женщины	
	Компактная кость	Губчатая кость	Компактная кость	Губчатая кость
1 гр. М - 22-35; Ж - 21-35 лет	24,2≤26,7≤27,9 3,4*	19,1≤21,7≤ 23,9	24,0≤27,1≤2	23,2≤23,5≤ 23,9
2 гр. М - 36-60; Ж - 36-55 лет	21,9≤23,2≤26,6 3,4*	18,6≤20,5≤ 23,0	22,1≤23,3≤2	19,2≤19,3≤ 22,2
3 гр. М - 61-74; Ж - 56-74	21,0≤22,3≤23,9 1,2,4*	18,2≤18,8≤ 21,2	23,1≤25,1≤2	20,0≤20,1≤ 20,2
4 гр. М и Ж более 74 лет	27,1≤30,0≤33,2 1,2,3	19,4≤23,9≤ 25,8	23,8≤27,0≤2	21,1≤22,3≤ 23,5

Примечание: здесь и далее в таблице приведены значения медиан для выборок и 25-й и 75-й процентиля; цифрой в верхнем регистре показана группа от которой выявлены отличия с уровнем значимости $P < 0,05$; * - отмечены данные, отличающиеся от губчатой кости, соответствующие полу и данной возрастной группе с уровнем значимости $P < 0,05$.

Так у женщин происходит снижение количества коллагена в возрасте 22-55 лет, а затем возрастание до конца исследуемого возрастного периода, от 23,3 до 27,0 г/100 г в компактной и от 19,3 до 22,3 г/100 г в губчатой костной ткани.

Таким образом, содержание коллагена в компактной костной ткани практически здорового человека составляет $25,5 \pm 5,0$ г/100 г, в губчатой ткани - $21,2 \pm 3,0$ г/100 г сухой обезжиренной ткани.

В отличие от наших данных Л.И. Слущким и Г.О. Пфафордом показано, что содержание коллагена практически не зависит от возраста, количество этого белка

в компактной кости ниже, чем в губчатой, и составляет $15,2 \pm 0,2$ и $19,6 \pm 4,6$ г/100 г соответственно (Л.И. Слуцкий, Г.О. Пфафорд, 1980).

Для исследования пролиферативной и экспрессивной функций клеток костной ткани определяли количество ДНК и РНК. По полученным данным у мужчин в компактной костной ткани в молодом возрасте количество ДНК достоверно выше, чем в последующие годы, в остальных группах колебания находятся в пределах ошибки (Табл. 2). Такие же изменения количества ДНК происходят и в губчатой кости, однако в последней обнаружено достоверно большее количество ДНК в возрасте 61-74 года по сравнению со вторым зрелым возрастом и старческим. Отмечается, что в спонгиозной кости содержание ДНК достоверно выше в первых трех возрастных группах, однако в возрасте старше 74 лет эти различия сглаживаются.

Таблица 2

Содержание ДНК в костной ткани практически здоровых лиц, мг/100 г сухой обезжиренной ткани

	Мужчины		Женщины	
	Компактная кость	Губчатая кость	Компактная кость	Губчатая кость
1 гр. М - 22-35; Ж - 21-35 лет	$58 \leq 59 \leq 68$ ^{2*}	$67 \leq 73 \leq 139$ ₂	$52 \leq 61 \leq 63$ ²	$76 \leq 88 \leq 255$
2 гр. М - 36-60; Ж - 36-55 лет	$31 \leq 40 \leq 49$ ^{*#}	$47 \leq 51 \leq 61$ _{1,3}	$140 \leq 205 \leq 304$ _{1,2*}	$54 \leq 59 \leq 62$ ⁴
3 гр. М - 61-74; Ж - 56-74	$41 \leq 49 \leq 58$ [*]	$58 \leq 95 \leq 112$ ₂	$58 \leq 71 \leq 75$ ^{2,4*}	$106 \leq 110 \leq 269$
4 гр. М и Ж более 74 лет	$36 \leq 37 \leq 38$	$37 \leq 39 \leq 40$	$39 \leq 44 \leq 48$ _{3,2*}	$263 \leq 451 \leq 483$

Примечание: # - обозначены значения показателя мужской группы отличающиеся с уровнем значимости $P < 0,05$ от женской, соответствующего возраста. Обозначения как в табл. 1.

В компактной костной ткани женщин наблюдается достоверное увеличение содержания ДНК во втором зрелом возрасте практически в 2,5 раза. В отличие от мужчин, в первом зрелом возрасте у женщин не выявлено достоверных отличий содержания ДНК в компактной и губчатой костной ткани. Во втором зрелом, пожилом и старческом возрасте выявлено статистически значимое отличие содержания ДНК. В связи с представленными данными нельзя не отметить тот факт, что количество ДНК имеет широкую вариабельность значений, но не имеет статистически значимых отличий. Скорее всего это связано с невысокой выборкой женской группы, и с тем, что ДНК способна сохраняться в достаточном количестве даже в необменивающейся активно костной ткани.

Результаты исследования РНК свидетельствуют о том, что в губчатой кости мужчин и женщин происходит достоверное снижение ее содержания во втором зрелом возрасте по сравнению с первым зрелым возрастом (Табл.3). В остальных

группах достоверных различий нами не выявлено, однако наблюдается тенденция к возрастному снижению содержания РНК у мужчин и увеличению - у женщин. В компактной кости на протяжении всего исследуемого возрастного периода достоверных различий в содержании РНК не выявлено. По полученным нами данным содержание РНК в губчатой кости достоверно выше, чем в компактной кости исследуемых групп мужчин и женщин. В среднем количество РНК в компактной кости составляет 0,028-0,112 г/100 г сухой обезжиренной ткани.

Таблица 3

Содержание РНК в костной ткани практически здоровых лиц, мг/100 г сухой обезжиренной ткани

	Мужчины		Женщины	
	Компактная кость	Губчатая кость	Компактная кость	Губчатая кость
1 гр. М - 22-35; Ж - 21-35 лет	48≤58≤72*	202≤214≤255 ^{2,3}	65≤69≤71*	198≤214≤256 ^{2,4}
2 гр. М - 36-60; Ж - 36-55 лет	30≤51≤61*	94≤124≤156 ₁	46≤46≤46	134≤137≤137 ^{1,3}
3 гр. М - 61-74; Ж - 56-74	28≤42≤62*	134≤139≤140 ^{1#}	51≤60≤92*	290≤437≤622 ²
4 гр. М и Ж более 74 лет	75≤93≤112	106≤107≤108	44≤46≤62*	304≤348≤352 ²

Обозначения как в табл. 1 и 2.

Литературных данных о содержании ДНК и РНК в костной ткани очень немного. Так, Л.И. Слущкий показывает, что содержание ДНК составляет 0,21 г/100 г, РНК 0,14 г/100 г сухой обезжиренной ткани человека (Л.И. Слущкий, 1969). Наибольшее количество ДНК и РНК обнаружено нами в губчатой кости, а количество основного белка матрикса коллагена больше в компактной ткани. На наш взгляд, данный факт свидетельствует о том, что активность экспрессивных и биосинтетических процессов в губчатой костной ткани выше, чем в компактной. Коэффициент РНК/ДНК практически во всех группах выше единицы (Рис.2). Наиболее высок этот показатель в губчатой кости и составляет в среднем 2,5, а в компактной - 1,5. Корреляционная зависимость между количеством коллагена и нуклеиновыми кислотами носит обратный характер и составляет $r=-0,46$ $P=0,0001$ с ДНК и $r=-0,32$ $P=0,0001$ с РНК. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что биосинтетическая функция губчатой костной ткани выше, чем компактной.

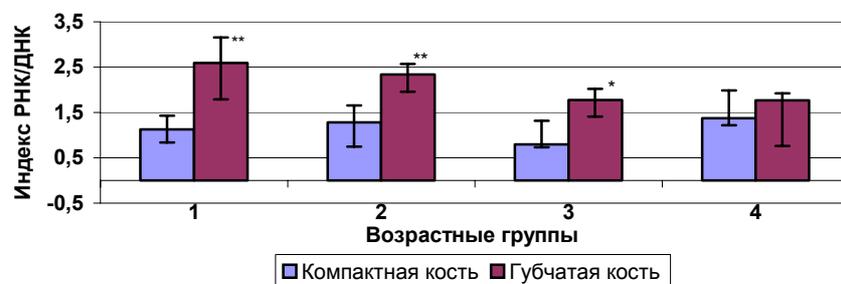


Рис. 2. Индекс РНК/ДНК в костной ткани человека
Примечание: * - показан уровень значимости различий по сравнению с губчатой костью при $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

С возрастом активность обмена компактной и губчатой костной ткани снижается, что приводит к накоплению нерастворимых форм коллагена. Об этом свидетельствует его высокое содержание в возрасте после 74 лет. Нами не выявлено достоверных половых различий в содержании коллагена и нуклеиновых кислот в зрелом возрасте, но после 55 лет у женщин количество последних достоверно выше.

Исследование гликозаминогликанов костной ткани. Для исследования состояния углеводных биополимеров костной ткани нами количественно определялись их мономерные звенья. Исследование показало, что содержание уроновых кислот (УК) в компактной кости мужчин увеличивается с возрастом. Обнаружено, что количество уроновых кислот в компактной кости достоверно ниже, чем в губчатой (Табл.4). Такая закономерность выявлена как у мужчин, так и женщин. Отмечено также, что динамика изменения содержания уроновых кислот в губчатой кости отличается от компактной.

Таблица 4

Содержание уроновых кислот и сульфатов в костной ткани практически здоровых людей в расчете на 100 г сухой обезжиренной костной ткани

	Уроновые кислоты, ммоль/100 г		Сульфаты, ммоль/100 г	
	Компактная кость	Губчатая кость	Компактная кость	Губчатая кость
М у ж ч и н ы				
1 гр. 22-35 лет	0,37≤0,40≤0,45 2,3,4*	1,02≤1,36≤1,4 5 2#	0,54≤0,56≤0,62 2,4*#	1,05≤1,32≤2,7 6
2 гр. 36-60 лет	0,40≤0,48≤0,50 1*	0,71≤0,98≤1,1 2 1,3#	0,87≤1,14≤1,32 ¹	1,09≤1,44≤1,6 3
3 гр. 61-74 лет	0,47≤0,50≤0,53 1,4*	0,97≤1,32≤1,4 1 2	0,67≤0,84≤1,17 [#]	0,91≤1,15≤1,8 0
4 гр. Более 74 лет	0,78≤0,95≤1,12 1,3	1,03≤1,26≤1,6 2	1,65≤2,09≤2,54 ¹	2,31≤2,85≤2,5 8
Ж е н щ и н ы				
1 гр. 21-35 лет	0,40≤0,41≤0,48*	0,73≤0,83≤0,9 5 2	1,16≤1,61≤2,12	0,88≤1,01≤1,9 7

2 гр. 36-55 лет	0,46≤0,47≤0,48*	1,19≤1,26≤1,4 2 ¹	1,04≤1,07≤1,32 4	0,90≤1,31≤1,3 3 ⁴
3 гр. 56-74 лет	0,43≤0,46≤0,84*	0,93≤1,25≤1,4 9	1,52≤1,73≤1,86 ⁴	1,14≤1,59≤1,9 1 ⁴
4 гр. Более 74 лет	0,46≤0,49≤0,54*	0,70≤0,77≤1,0 2	0,31≤0,37≤0,51 2,3,4	0,37≤0,38≤0,3 9 ^{2,3}

Обозначения как в табл. 1 и 2.

Так, у мужчин выявлено достоверное снижение УК в период 35-60 лет по сравнению с периодом 21-35 лет и достоверное увеличение до прежних значений к 74 годам. У женщин в ГК, в отличие от мужчин, выявлено достоверное увеличение во втором зрелом возрасте относительно первого. Полученные нами данные согласуются с исследованием Л.И. Слуцкого с соавт., которые показали, что содержание уоновых кислот в диафизе большеберцовой кости человека составляет $0,09 \pm 0,03$ г/100г сухой обезжиренной ткани и $0,13 \pm 0,03$ г/100 г в губчатой кости коленного сустава (Л.И. Слуцкий и др., 1980). Отношение гексозамин/уроновые кислоты получилось равным в компактной кости мужчин и женщин 4,9, а в губчатой - 2,6.

Исследование содержания сульфатов показало, что в компактной кости мужчин в период 22-60 лет происходит нарастание общих женщин показало, что в период 22-35 лет в компактной кости мужчин содержится меньше неорганической серы, чем у женщин. Такая же зависимость наблюдается и в период 60-74 года. В период после 74 лет у мужчин происходит нарастание содержания неорганической серы, а у женщин, как уже отмечалось, снижается. У мужчин с возрастом в губчатой костной ткани нарастает коэффициент SO_4^{2-} /гексозамины, что свидетельствует об увеличении сульфатированности гликозаминогликанов. У женщин в возрасте до 74 лет содержание сульфатированных ГАГ практически не изменяется. После 74 лет отмечено значительное снижение коэффициента сульфаты/гексозамины.

Определение сиаловых кислот и гексоз показало, что с возрастом у практически здоровых людей не происходит изменения их содержания. Нами отмечено равномерное распределение гексоз между компактной и губчатой костью и не выявлено половых различий. Содержание сиаловых кислот в губчатой кости достоверно выше, чем в компактной, и составляет $0,36 \pm 0,02$ и $0,42 \pm 0,04$ ммоль/100 г сухой обезжиренной ткани соответственно. Нами не выявлено достоверных отличий в содержании гексозаминов в компактной и губчатой кости мужчин на протяжении всего изучаемого возрастного периода.

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о том, что количество углеводных компонентов различается в компактной и губчатой ткани, значимые половые различия выявлены только в возрасте после 74 лет, возрастные изменения носят разнонаправленный характер. В литературе нами не отмечалось подобных тенденций.

Выявлены достоверные отличия в содержании липидов в компактной кости и в губчатой, при этом их количество в спонгиозной кости выше и составляет от 40 до 50 % от веса сырой ткани, тогда как в компактной - около 15%.

Исследование неорганических компонентов кости. Нами обнаружены следующие возрастные особенности химического состава неорганической фазы костной ткани. У мужчин выявлено устойчивое повышение содержания ионов PO_4^{3-} в

компактной кости в возрасте 22-74 года и некоторое снижение после 74 лет до конца исследуемого возрастного периода. Максимальное значение достигается в пожилом возрасте и составляет $23,6 \pm 0,9$ г/100 г сухой обезжиренной ткани. У женщин выявлено достоверное повышение содержания фосфатов во второй группе по сравнению с первой, а в третьей и четвертой возрастных группах отмечалась устойчивая тенденция к снижению содержания этого иона. Сравнение содержания фосфатов в кортикальном и губчатом веществе мужчин показало, что в первой группе не выявлено достоверных отличий, а во второй и третьей содержание PO_4^{3-} в ГК достоверно ниже. Не выявлено и достоверных различий в возрасте после 74 лет. У женщин содержание ионов PO_4^{3-} так же, как у мужчин, ниже в спонгиозной костной ткани, причем достоверные различия выявлены во втором зрелом и пожилом возрасте.

Таблица 5

Содержание ионов PO_4^{3-} и Ca^{2+} в костной ткани практически здоровых лиц, г/100 г сухой обезжиренной ткани

	Мужчины		Женщины	
	PO_4^{3-} в КК	PO_4^{3-} в ГК	PO_4^{3-} в КК	PO_4^{3-} в ГК
1 гр. М - 22-35; Ж - 21-35 лет	$16,9 \leq 18,5 \leq 19,3$ 2,3,4	$16,0 \leq 17,4 \leq 18,3$	$17,8 \leq 18,7 \leq 19,8$	$16,6 \leq 17,2 \leq 17,8$
2 гр. М - 36-60; Ж - 36-55 лет	$17,8 \leq 19,8 \leq 23,0$ 1*#	$17,3 \leq 17,9 \leq 18,8$ #	$23,8 \leq 25,3 \leq 25,6$ 3,4	$18,1 \leq 18,7 \leq 18,8$ 8
3 гр. М - 61-74; Ж - 56-74	$22,4 \leq 23,6 \leq 25,3$ 1*	$17,2 \leq 18,5 \leq 21,8$	$22,2 \leq 23,1 \leq 23,3$ 2,4	$17,7 \leq 18,7 \leq 22,2$ 2
4 гр. М и Ж более 74 лет	$18,2 \leq 19,1 \leq 22,1$ 1*#	$15,8 \leq 19,0 \leq 20,3$	$16,8 \leq 17,4 \leq 18,8$ 2,3	$17,9 \leq 18,2 \leq 18,4$ 4
	Ca^{2+} в КК	Ca^{2+} в ГК	Ca^{2+} в КК	Ca^{2+} в ГК
1 гр. М - 22-35; Ж - 21-35 лет	$24,9 \leq 25,8 \leq 26,3$ 3*	$15,7 \leq 19,0 \leq 21,1$ 2,3,4	$22,3 \leq 33,8 \leq 46,9$ 2	$19,1 \leq 19,5 \leq 19,7$ 7
2 гр. М - 36-60; Ж - 36-55 лет	$25,7 \leq 26,4 \leq 34,2$ 3*#	$22,0 \leq 23,4 \leq 33,0$ 1,4	$34,2 \leq 42,1 \leq 46,6$ 1,3	$25,5 \leq 35,7 \leq 37,2$ 2
3 гр. М - 61-74; Ж - 56-74	$25,2 \leq 32,5 \leq 39,3$ 1,2	$20,9 \leq 27,8 \leq 35,6$ 1	$25,4 \leq 27,7 \leq 43,2$ 2	$19,6 \leq 22,0 \leq 34,7$ 7
4 гр. М и Ж более 74 лет	$22,6 \leq 26,7 \leq 40,2$	$29,8 \leq 36,2 \leq 37,4$ 1,2	$24,7 \leq 26,7 \leq 28,2$	$19,9 \leq 20,0 \leq 21,2$ 2

Обозначения как в табл. 1 и 2.

Выявлено достоверное увеличение содержания кальция в губчатой кости мужчин. При этом содержание этого же иона в компактной кости практически не изменяется во всех четырех группах и составляет $24,6 \leq 28,0 \leq 35,0$ г/100 г сухой обезжиренной ткани. В группах образцов костной ткани женщин наблюдалась широкая вариабельность содержания Ca^{2+} в компактной кости, где оно составило $26,7 \leq 32,6 \leq 41,2$

г/100 г. Максимальное значение достигается в возрасте 35-50 лет и составляет 42 ± 4 г/100 г. Не выявлено достоверных возрастных изменений в содержании ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} в спонгиозной кости у женщин. Содержание этих ионов составило $24,0 \pm 2,0$ и $18,2 \pm 0,5$ г на 100 г сухой обезжиренной костной ткани соответственно.

Таким образом, содержание минералов в костной ткани мужчин с возрастом увеличивается. У женщин имеется тенденция к снижению количества минеральных веществ, но это снижение относительно второго зрелого возраста. После 50 лет количество минералов практически не отличается от первого зрелого возраста. По нашим наблюдениям, у женщин в репродуктивном возрасте формируется запас ионов кальция, который очевидно расходуется на формирование плода и в постменопаузальный период.

Исследование содержания ионов магния показало, что его количество в костной ткани не изменяется с возрастом, в зависимости от пола и вида костной ткани и составляет $0,86 \leq 1,00 \leq 1,13$ г/100 г сухой обезжиренной ткани. Полученные нами данные согласуются с данными S. Tsuboi et all (S. Tsuboi, 1994), но, по мнению других авторов, содержание магния значительно увеличивается с возрастом в малоберцовой кости (В.Н. Богатов и др., 1977).

Исследование корреляции биохимических показателей с паспортным возрастом человека. Критерии, не имеющие численного значения, используемые на сегодняшний день в судебной медицине для установления возраста, приводят к широкому субъективизму и, как следствие, к ошибочному или неопределенному выводу о возрасте умершего. В настоящем исследовании нами была предпринята попытка обнаружить корреляцию химического состава костной ткани с паспортным возрастом. Так как отдельные показатели изменяются не линейно, нами были разработаны индексы, наиболее полно отражающие изменения, происходящие в костной ткани с возрастом. Существуют слабые корреляционные связи между паспортным возрастом и следующими показателями кости: Ca^{2+} , PO_4^{3-} , уоновые кислоты, нуклеиновые кислоты. Наибольшие изменения с возрастом происходят в губчатой кости, там выявлено большее количество исследуемых связей, как у мужчин, так и у женщин. Нами отмечено, что количество РНК имеет значимый коэффициент корреляции с возрастом в спонгиозной кости лиц обоего пола. Остальные корреляционные связи не совпадают у мужчин и женщин. Наилучших результатов удалось добиться при расчете индексов $\text{Ca}^{2+}/\text{коллаген}$, $\text{ДНК} \cdot \text{РНК} \cdot \text{коллаген} / (\text{Ca}^{2+})^2$. Выявили обратную корреляционную зависимость по Спирмену индекса $\text{Ca}^{2+}/\text{коллаген}$ от возраста в костной ткани мужчин $r=0,4$ $P=0,002$. У женщин подобная зависимость проявилась несколько слабее. Также в спонгиозной ткани мужчин нами выявлено нарастание с возрастом индекса $\text{ДНК} \cdot \text{РНК} \cdot \text{коллаген} / (\text{Ca}^{2+})^2$.

Таблица 11

Корреляция по Спирмену между возрастом и химическим составом костной ткани у практически здоровых людей

	Женщины			
	Компактная кость		Губчатая кость	
	г	Р	г	Р
PO_4^{3-}	-0,46	0,006	0,19	0,50

SO ₄ ²⁻	-0,40	0,137	-0,45	0,09
Ca ²⁺	-0,21	0,45	0,22	0,43
УК	0,23	0,41	-0,07	0,80
ГА	0,05	0,87	-0,60	0,02
ДНК	-0,22	0,44	0,42	0,12
РНК	-0,15	0,59	0,56	0,03
Ув/кол	0,03	0,90	-0,24	0,39
Неорг/орг	-0,20	0,48	0,58	0,02
Ca ²⁺ /кол	0,24	0,39	-0,25	0,36
Ca ²⁺ Mg ²⁺ /кол	-0,14	0,62	0,16	0,56
	Мужчины			
PO ₄ ³⁻	0,48	0,004	0,18	0,30
SO ₄ ²⁻	0,30	0,08	-0,008	0,96
Ca ²⁺	0,30	0,08	0,40	0,02
УК	0,44	0,008	-0,08	0,66
ГА	0,16	0,35	-0,05	0,79
ДНК	-0,18	0,29	-0,34	0,05
РНК	-0,06	0,73	-0,57	0,0003
Ув/кол	0,39	0,02	0,034	0,84
Неорг/орг	0,05	0,76	0,27	0,11
Ca ²⁺ /кол	-0,36	0,03	-0,41	0,02
Ca ²⁺ Mg ²⁺ /кол	0,39	0,02	0,20	0,25
ДНК*РНК * кол/(Ca ²⁺) ²	0,52	0,001	0,48	0,003

Примечание: курсивом выделены значения коэффициента корреляции значимо отличающиеся от нуля при уровне значимости $P < 0,05$; Неорг/орг – отношение неорганической фазы к органической; Кол – коллаген; Ув – углеводные компоненты;

Таким образом, нами выявлены наиболее изменяющиеся с возрастом показатели и предпринята попытка разработки индексов, наиболее линейно коррелирующих с паспортным возрастом человека.

Исследование ферментативной активности показало, что суммарная активность протеаз незначительно изменяется с возрастом.

Нами установлено, что с возрастом в костной ткани человека создаются условия, при которых увеличивается активность кислой фосфатазы при неизменной активности щелочной фосфатазы.

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что существуют значимые различия в обменных процессах протекающих, в компактной и губчатой кости. Это выражается в большем содержании ключевых метаболитов, таких, как нуклеиновые кислоты, сиаловые кислоты, гексозамины и некоторые другие. Установлено, что химический состав костной ткани зависит от возраста, и эта зависимость является далеко не однозначной. Наибольшему изменению подвержена минеральная компонента костной ткани как наиболее лабильная, органическая также претерпевает определенные

изменения. Кроме этого, нами установлено, что химический состав костной ткани мужчин отличается от такового у женщин.

Практические рекомендации. По итогам проведенного исследования нам представляется целесообразным рекомендовать:

1. Применять измерение биохимических показателей при определении паспортного возраста человека. Наиболее эффективными для этих целей являются индекс Ca^{2+} /коллаген в компактной кости и $\text{ДНК*РНК*коллаген}/(\text{Ca}^{2+})^2$, рибонуклеиновые кислоты в губчатой кости.

2. Использовать полученные нами нормальные показатели при проведении исследования костной патологии жителей г. Кургана, с учетом возраста и пола.

Выводы:

1. С возрастом в костной ткани человека происходят биохимические изменения, отражающиеся на химическом составе внеклеточного матрикса. Изменения компактной и губчатой костной ткани имеют общие черты: до 74 лет происходит снижение общего количества коллагеновых белков, содержание которых в старческом возрасте возвращается к значениям первого зрелого возраста (21-35 лет); снижается количество нуклеиновых кислот; увеличивается общее число анионов.

2. Наиболее активно с возрастом изменяется количество неорганических веществ – кальция, фосфатов, сульфатов. Линейная корреляционная связь установлена между паспортным возрастом и индексом $\text{ДНК*РНК*колл}/(\text{Ca}^{2+})^2$.

3. Половые различия в составе и строении костной ткани наиболее интенсивно проявляются в компактной кости начиная со второго зрелого возраста, в котором содержание кальция и фосфатов у женщин в 1,5 раза, количество ДНК более чем в 5 раз превышают таковое у мужчин. У женщин в возрасте до 74 лет количество кальция, фосфатов, сульфатов возрастает, в старческом возрасте содержание кальция, фосфатов, сульфатов снижается до значений первого зрелого возраста.

4. Активность биосинтетических процессов, протекающих в губчатой костной ткани выше, чем в компактном веществе, что отражается на большем содержании нуклеиновых кислот, гексозаминов, липидов.

5. Активность кислой фосфатазы в компактной костной ткани увеличивается в течение жизни, в то время как активность протеолитических ферментов и щелочной фосфатазы остается неизменной.

Основные материалы исследования опубликованы в следующих работах.

1 Накоскин А.Н. Аминоацильные комплексы кальция и их структура /А.Н. Накоскин // Материалы первого Всероссийского симпозиума «Возрастные изменения минеральной плотности костей скелета и проблем профилактики переломов», Курган. -2002., -С. 174-175.

2 Лунева С.Н. Препарат для возмещения костной массы и его характеристика. /С.Н. Лунева, А.Н. Накоскин // Материалы первого Всероссийского симпозиума «Возрастные изменения минеральной плотности костей скелета и проблем профилактики переломов», Курган. -2002., -С. 177-178.

3 Ковинька М. А. Индекс гидроксипролина как способ оценки состояния костной ткани / М. А. Ковинька, Л. С. Кузнецова, А. Н. Накоскин // Клиническая лабораторная диагностика. 2002.- № 10. - С.17.

4 Накоскин А.Н. Аминоацильный комплекс кальция его характеристика и влияние на организм мышей /А.Н. Накоскин // Сборник тезисов докладов научной конференции студентов Курганского ГУ вып. 2. Курган. -2001. -С. 97-98.

5 Накоскин А.Н. Метод определения содержания фракций гидроксипролина в сыворотке крови /А.Н. Накоскин, Н.В. Накоскина // удостоверение на рац. предложение № 46/2003 г.

6 Лунева С.Н., Матвеева Е.Л., Накоскин А.Н. Способ выделения гликозаминогликанов из минерализованной соединительной ткани и косметическое средство по уходу за кожей на основе выделенных гликозаминогликанов (приоритетная справка на изобретение №2003131580 033777 от 27.10.2003).

7 Лунева С.Н., Ковинька М.А., Матвеева Е.Л., Талашова И.А., Накоскин А.Н. Способ выделения коллагена из минерализованной соединительной ткани и косметическое средство на его основе (приоритетная справка на изобретение №2003134131 036658 от 24.11.2003).

8 Лунева С.Н. Возрастные изменения и половые различия содержания ионов кальция и фосфатов в костной ткани человека / С.Н. Лунева, А.Н. Накоскин // Ижевск 2004 –С. 87-90.

9 Накоскин А.Н. Возрастные изменения содержания ионов кальция и фосфатов в костной ткани / А.Н. Накоскин // Материалы республиканской итоговой научно-практической конференции молодых ученых и студентов республики Башкортостан с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины». Уфа. –2004. -С. 46.

10 Лунева, С.Н. Содержание коллагена и нуклеиновых кислот в костной ткани человека в различные возрастные периоды /С.Н. Лунева, А.Н. Накоскин // Гений ортопедии. -2004. - №3. – С. 12-15.

11 Содержание нуклеиновых кислот в костной ткани человека / С.Н. Лунева, А.Н. Накоскин // Материалы IX Российского конгресса «Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, -2004. -С. 178.

12 Возрастные изменения содержания Ca^{2+} и PO_4^{3-} в костной ткани /С.Н. Лунева, А.Н. Накоскин // Материалы IX Российского конгресса «Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, -2004. -С. 179.

Отпечатано в типографии ООО «Мак энд Мак», заказ № 1652, лицензия № А 001931, г. Курган, ул. Кирова, 108.