

Влияние остеоиндуктивных компонентов плазмы крови на гематологические показатели у мышей

О.Л. Гребнева, М.А. Ковинька, С.П. Изотова

The effect of the osteoinductive components of blood plasma on hematologic indices of mice

O.L. Grebneva, M.A. Kovinika, S.P. Izotova

Федеральное государственное учреждение науки

«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росздрава», г. Курган (директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

Исследовано влияние компонентов плазмы крови от доноров с активным остеогенезом на показатели кроветворения у интактных мышей. Установлено, что показатели эритропоэза и лейкопоэза периферической крови животных после введения компонентов плазмы обладают выраженной отрицательной корреляцией.

Ключевые слова: сыворотка крови, остеогенез, периферическая кровь, эксперимент.

The effect of blood plasma components from the donors with active osteogenesis on hemopoietic indices in intact mice have been studied. The indices of peripheral blood erythropoiesis and leukopoiesis in animals have been determined to possess marked negative correlation after being infused into plasma components.

Keywords: blood serum, osteogenesis, peripheral blood, experiment.

Известно, что сыворотка или плазма крови от доноров с активным остеогенезом способна стимулировать репаративный процесс в костной ткани у ее реципиентов [4, 7, 8]. Показано, что остеоиндуцирующими свойствами обладают компоненты плазмы крови с определенными физико-химическими свойствами [5]. Возможность использования остеоиндуктивных компонентов плазмы для создания фармпрепаратов требует, с одной стороны, выяснения механизмов остеоиндуцирования, с другой – изучения влияния этих компонентов на функционирование других систем организма. Установлено, что важными компонентами гуморальных механиз-

мов взаимосвязи между процессами кроветворения и остеогенеза при физиологических и репаративных процессах являются белки крови – факторы роста, интерлейкины, колониестимулирующие гемопоэтические факторы [3, 12, 13]. Таким образом, при разработке рекомендаций по применению остеотропного препарата, включающего компоненты сыворотки крови, необходимы исследования их влияния на кроветворение.

Целью работы явилось изучение влияния компонентов плазмы от доноров с активным остеогенезом на клеточный состав периферической крови у интактных реципиентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на белых лабораторных мышцах-самцах массой 25-30 г. Кровь для получения тестируемой фракции забирали после декапитации животных на третьи сутки после перелома голени. Из сыворотки крови, разведенной 1:1 раствором хлорида натрия 0,15 М, высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония выделяли компоненты, преципитирующие в диапазоне концентрации соли от 30 до 50 %. Осадок растворяли и диализовали против физиологического раствора. Полученный раствор вводили интактным животным-реципиентам внутривенно в дозе 50 мг

белка/кг массы. Контрольной группе животных производили инъекции 0,15 М хлорида натрия.

До инъекции и через 48 ч после нее в периферической крови мышей общепринятыми методами производили подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов, ретикулоцитов, лейкоцитарной формулы [11].

В математическую обработку результатов входили оценка достоверности различий в группах непараметрическими критериями Вилкоксона для связанных и несвязанных выборок, оценка корреляционных соотношений методом Юла [1, 6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Традиционная статистическая обработка результатов показала отсутствие достоверных различий значений показателей у контрольной и опытной групп (табл. 1, 2). Было обнаружено, что по изменению количества эритроцитов и лейкоцитов животные экспериментальной группы могут быть разделены на две подгруппы: первая, в которой происходило повышение общего количества эритроцитов и понижение общего количества лейкоцитов, и вторая - с понижением количества эритроцитов и повышением

количества лейкоцитов. Корреляция между этими признаками, вычисленная по коэффициенту ассоциации Юла, характеризует высокую степень тесноты связи признаков (-0,746) и достоверна с уровнем значимости < 0,01. Подгруппы 1 и 2 достоверно различались по количеству эритроцитов, лейкоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов (табл. 2, рис. 1).

Таблица 1

Влияние инъекции фракции из сыворотки крови на показатели периферической крови мышей

Показатель	Время забора крови*	Перцентили значений					
		25		50		75	
		абс. **	% **	абс.	%	абс.	%
контроль (n=12)							
Эритроциты, × 10 ¹² /л	0	5,5		5,9		6,3	
	48	5,3	95,9	5,8	99,2	6,0	100,9
Ретикулоциты, × 10 ⁹ /л	0	117,4		141,3		155,0	
	48	116,3	92,8	174,0	105,8	223,4	133,3
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л	0	7,1		10,0		12,8	
	48	7,9	99,5	10,4	113,3	17,8	141,8
Нейтрофилы, × 10 ⁷ /л	0						
	48	30,0		42,0		51,3	
Палочкоядерные	0	41,5	113,2	56,9	148,1	72,5	182,4
	48	269,6		420,0		560,1	
Сегментоядерные	0	325,5	110,8	518,2	121,4	917,5	158,9
	48	402,4		485,0		568,2	
Лимфоциты, × 10 ⁷ /л	0	387,8	93,2	436,0	100,0	499,4	100,0
	48	17,3		30,0		54,1	
Моноциты, × 10 ⁷ /л	0	21,9	119,3	40,6	130,1	71,0	148,3
	48	14,3		25,8		43,1	
Эозинофилы, × 10 ⁷ /л	0	12,0	96,6	35,8	122,5	53,3	141,8
	48						
опыт (n=8)							
Эритроциты, × 10 ¹² /л	0	5,6		5,8		5,9	
	48	5,0	86,6	5,7	99,2	5,9	102,3
Ретикулоциты, × 10 ⁹ /л	0	81,2		97,8		106,4	
	48	75,2	92,4	100,5	96,4	109,4	99,6
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л	0	8,4		9,7		12,0	
	48	10,5	92,3	14,0	120,9	15,3	171,6
Нейтрофилы, × 10 ⁷ /л	0						
	48	30,9		33,0		45,5	
Палочкоядерные	0	52,5	122,7	65,0	170,9	71,3	214,5
	48	360,5		411,8		555,0	
Сегментоядерные	0	493,9	106,4	616,0	112,6	731,3	179,8
	48	383,7		450,3		508,2	
Лимфоциты, × 10 ⁷ /л	0	347,6	66,7	475,0	85,0	537,0	131,6
	48	39,4		45,4		63,1	
Моноциты, × 10 ⁷ /л	0	51,6	121,8	69,5	136,6	89,3	177,7
	48	23,9		26,9		29,6	
Эозинофилы, × 10 ⁷ /л	0	33,2	95,8	37,8	129,6	42,0	158,5
	48						
подгруппа 1 (n=4)							
Эритроциты, × 10 ¹² /л	0	5,4		5,5		5,7	
	48	5,7	101,4	5,9	102,7	6,0	106,5
Ретикулоциты, × 10 ⁹ /л	0	85,1		97,8		105,9	
	48	85,8	93,7	105,0	96,4	114,5	104,4
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л	0	9,9		10,5		12,0	
	48	8,7	89,0	9,9	91,3	11,8	95,0
Нейтрофилы, × 10 ⁷ /л	0						
	48	28,0		37,5		45,5	
Палочкоядерные	0	40,3	110,3	49,0	120,9	58,5	168,3
	48	412,7		481,8		555,0	
Сегментоядерные	0	448,2	99,2	481,8	104,8	533,5	109,0
	48	455,5		480,3		570,0	
Лимфоциты, × 10 ⁷ /л	0	313,2	65,1	378,4	67,8	466,5	77,5
	48	39,4		42,0		51,8	
Моноциты, × 10 ⁷ /л	0	50,1	111,9	53,9	118,5	62,3	126,8
	48	26,2		29,1		33,5	
Эозинофилы, × 10 ⁷ /л	0	29,2	84,8	33,3	103,6	35,7	124,4
	48						
подгруппа 2 (n=4)							
Эритроциты, × 10 ¹² /л	0	5,8		5,9		5,9	
	48	4,8	81,3	5,0	85,4	5,2	90,4

Показатель	Время забора крови*	Процентили значений					
		25		50		75	
		абс. **	% **	абс.	%	абс.	%
Ретикулоциты, × 10 ⁹ /л	0	80,9		95,6		121,2	
	48	75,2	84,0	93,1	95,2	105,7	99,6
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л	0	8,0		8,3		10,1	
	48	14,8	159,0	15,5	178,5	17,3	194,2
Нейтрофилы, × 10 ⁷ /л	0						
	48	31,8		33,0		44,0	
Палочкоядерные	0	68,5	185,5	72,5	202,9	82,5	214,5
	48	320,0		347,0		465,5	
Сегментоядерные	0	694,0	151,9	742,5	194,9	783,8	228,6
	48	358,4		375,4		427,2	
Лимфоциты, × 10 ⁷ /л	0	568,5	159,1	622,0	166,0	733,5	170,8
	48	41,1		53,2		63,1	
Моноциты, × 10 ⁷ /л	0	75,0	163,0	94,5	185,1	110,3	206,1
	48	23,9		24,5		25,0	
Эозинофилы, × 10 ⁷ /л	0	42,8	171,6	43,5	178,5	44,3	185,4
	48						

Примечания: * 0 - до инъекции, 48 - через 48 ч после инъекции; ** приведены процентили для абсолютных значений и процентов изменения показателя от уровня до инъекции.

Таблица 2

Значения P при оценке достоверности различий между группами

	Критерий	P	P < 0,05
Эритроциты			
Контроль: 0 и 48	T-критерий	0,417	
Опыт: 0 и 48	T-критерий	0,072	
Сравнение контроля и опыта	W-критерий	0,454	
Сравнение опытов 1 и 2	W-критерий	0,010	*
Группа 1: 0 и 48	T-критерий	0,072	
Группа 2: 0 и 48	T-критерий	0,034	*
Ретикулоциты			
Контроль: 0 и 48	T-критерий	0,046	*
Опыт: 0 и 48	T-критерий	0,187	
Сравнение контроля и опыта	W-критерий	0,088	
Сравнение опытов 1 и 2	W-критерий	0,235	
Группа 1: 0 и 48	T-критерий	0,357	
Группа 2: 0 и 48	T-критерий	0,137	
Лейкоциты			
Контроль: 0 и 48	T-критерий	0,079	
Опыт: 0 и 48	T-критерий	0,131	
Сравнение контроля и опыта	W-критерий	0,281	
Сравнение опытов 1 и 2	W-критерий	0,010	*
Группа 1: 0 и 48	T-критерий	0,033	*
Группа 2: 0 и 48	T-критерий	0,034	*
Нейтрофилы палочкоядерные			
Контроль: 0 и 48	T-критерий	0,014	*
Опыт: 0 и 48	T-критерий	0,009	*
Сравнение контроля и опыта	W-критерий	0,149	
Сравнение опытов 1 и 2	W-критерий	0,156	
Группа 1: 0 и 48	T-критерий	0,072	
Группа 2: 0 и 48	T-критерий	0,034	*

	Критерий	P	P < 0,05
Нейтрофилы сегментоядерные			
Контроль: 0 и 48	T-критерий	0,008	*
Опыт: 0 и 48	T-критерий	0,013	*
Сравнение контроля и	W-критерий	0,485	
Сравнение опытов 1 и 2	W-критерий	0,010	*
Группа 1: 0 и 48	T-критерий	0,233	
Группа 2: 0 и 48	T-критерий	0,137	
Лимфоциты			
Контроль: 0 и 48	T-критерий	0,041	*
Опыт: 0 и 48	T-критерий	0,288	
Сравнение контроля и	W-критерий	0,230	
Сравнение опытов 1 и 2	W-критерий	0,010	*
Группа 1: 0 и 48	T-критерий	0,034	*
Группа 2: 0 и 48	T-критерий	0,034	*
Моноциты			
Контроль: 0 и 48	T-критерий	0,006	*
Опыт: 0 и 48	T-критерий	0,006	*
Сравнение контроля и	W-критерий	0,209	
Сравнение опытов 1 и 2	W-критерий	0,010	*
Группа 1: 0 и 48	T-критерий	0,034	*
Группа 2: 0 и 48	T-критерий	0,034	*
Эозинофилы			
Контроль: 0 и 48	T-критерий	0,079	
Опыт: 0 и 48	T-критерий	0,034	*
Сравнение контроля и	W-критерий	0,294	
Сравнение опытов 1 и 2	W-критерий	0,056	
Группа 1: 0 и 48	T-критерий	0,357	
Группа 2: 0 и 48	T-критерий	0,034	*

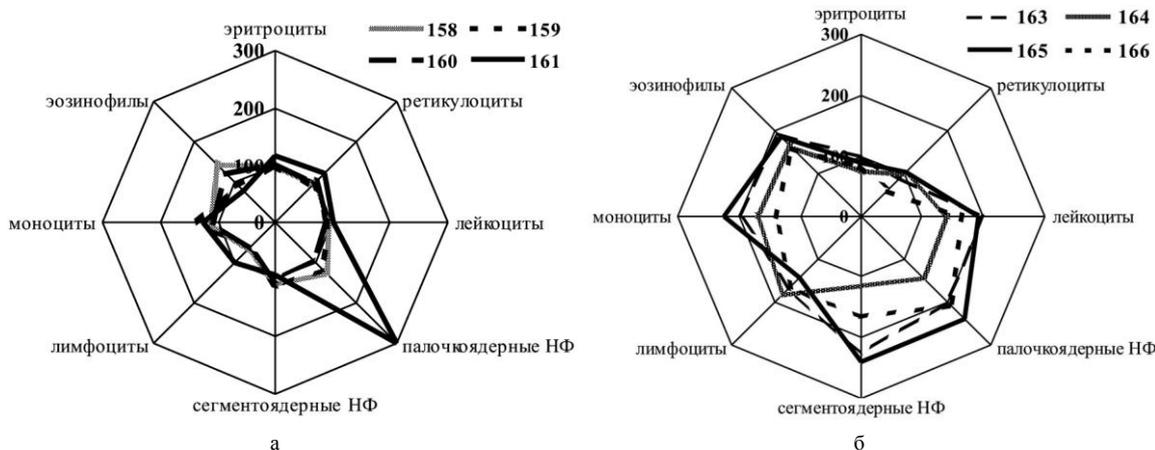


Рис. 1. Влияние инъекции фракции на показатели периферической крови у мышей подгруппы 1 (а) и 2 (б). По осям - процент от исходного уровня. НФ - нейтрофильные лейкоциты

Полученные нами данные показали перmissивность влияния одного и того же набора компонентов сыворотки на показатели кроветворения. Известно, что травма вызывает появление в крови веществ, способствующих регенерации костной ткани. Ранее проведенными экспериментами доказано, что тестируемая фракция содержит компоненты, обладающие остеиндуктивными свойствами [5, 9]. Установлено, что при деструкции костного матрикса, индуцированного травмой или операцией на скелете, в кровь высвобождаются стимуляторы и ингибиторы костеобразования, депонированные в костной ткани [2]. Известные факторы роста представлены несколькими родственными по строению группами белков, одной из которых является семейство трансформирующего фактора роста β (ТФР β). Белки этого семейства способны вызывать резорбционные и формообразующие эффекты в костной ткани в зависимости от условий эксперимента: pH, концентрации, времени инкубации, наличия других факторов в среде и др. [12]. Показано, что они способны оказывать негативное регуляторное влияние на клетки-предшественники различных линий крове-

творения [14]. Возможно, что действие сыворотки и ее компонентов обусловлено наличием не одного вида молекулы (определенного фактора роста или другой молекулы), а их некоторой композиции. Изучение природы компонентов сыворотки - внешнего фактора воздействия на биосистему - требует дальнейших исследований. Полученные нами данные свидетельствуют о существенной роли некоторого внутреннего фактора, определяющего выбор состояния системы. Анализ выбранной совокупности признаков не выявил разнородности опытной группы животных до воздействия препарата. Ряд исследователей полагает, что различная реакция биосистемы на воздействие обусловлена ее метаболическим статусом [10].

Таким образом, изменения количества эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови животных после введения компонентов плазмы обладают выраженной отрицательной корреляцией. Влияние тестируемой фракции в выбранной дозе на периферические показатели эритропоэза и лейкопоэза зависят от исходного состояния тестируемого объекта, характеристики которого требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер, Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е. В. Гублер, А. А. Генкин. - Л.: Медицина, 1973. - 141 с.
2. Десятниченко, К. С. Физико-химические свойства неколлагеновых белков органического матрикса костной ткани / К. С. Десятниченко, Ю. П. Балдин // Тезисы докладов V съезда травматологов-ортопедов республик Закавказья. - Ереван, 1984. - С. 153-155.
3. Долгушин, И. И. Иммунология травмы / И. И. Долгушин, Л. Я. Эберт, Р. И. Лифшиц. - Свердловск : Изд-во Урал. ун-та, 1989. - 188 с.
4. Дунаев, П. В. Влияние сыворотки крови животных с травмой органов скелета на процессы остеогенеза в имплантатах эмбрионального хряща / П. В. Дунаев, Г. С. Соловьев // Дифференцировка клеток в гисто- и органогенезах : материалы III Всесоюзного симпозиума. - Киев, 1975. - С. 112-116.
5. Костные рострегулирующие факторы - гуморальные регуляторы остеогенеза и кроветворения / О. Л. Гребнева, К. С. Десятниченко, А. А. Ларионов и др. // Гений ортопедии. - 1997. - № 4. - С. 15-19.
6. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. - М.: Высш. школа, 1973. - 343 с.
7. Лепехова, Н. П. Стимулирующее влияние плазмы крови собак с дистракционным остеосинтезом на содержание нуклеиновых кислот в регенерирующих, интактных костях и внутренних органах кроликов / Н. П. Лепехова // Чрескостный компрессионный и дистракционный остеосинтез в травматологии и ортопедии : сб. науч. трудов. - Л., 1977. - С. 63-65.
8. О гуморальных механизмах регуляции репаративного остеогенеза / В.И. Филимонов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1977. - №.12. - С. 725-727.
9. Пат. 2193868 РФ, МПК⁷ А 61 В 17/56, А 61 Р 5/50 Способ стимуляции репаративного остеогенеза / К. С. Десятниченко, А. А. Ларионов, О. Л. Гребнева, С. А. Ерофеев, М. А. Ковинька (РФ). - № 98105940/14; Заявл. 26.03.98; Опубл. 10.12.02. Бюл. № 34. - С.15.
10. Пахомова, В. М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений / В. М. Пахомова // Цитология. - 1995. - Т. 37, № 1/2. - С. 66-91.
11. Тодоров, Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии / Й. Тодоров. - София : Медицина и физкультура, 1968. - 1064 с.
12. Щепеткин, И. А. Полипептидные факторы остеогенеза / И. А. Щепеткин // Успехи современной биологии. - 1994. - Т. 114, вып. 4. - С. 454-466.
13. Ястребов, А. П. Система крови и регенерация костной ткани / А. П. Ястребов, А. В. Осипенко. - Свердловск : Изд-во Урал. ун-та, 1990. - 124 с.
14. Axelrad, A. A. Some hemopoietic negative regulators / A. A. Axelrad // Exp. Hematol. - 1990. - No 18. - P.143-150.

Рукопись поступила 02.12.03.