

**Исследование остеогенных свойств фракционированной плазмы крови****О.Л. Гребнева, М.А. Ковинька, С.Н. Лунёва, Т.А. Силантьева, М.В. Стогов****Study osteogenic properties of blood plasma fractionation****O.L. Grebneva, M.A. Kovin'ka, S.N. Luneva, T.A. Silant'eva, M.V. Stogov**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган (директор — д. м. н. А. В. Губин)

**Цель.** Выяснение некоторых условий реализации феномена влияния на репаративный остеогенез инъекции фракции плазмы крови в зависимости от ее дозы и регенераторного статуса животного-реципиента. **Материалы и методы.** В экспериментальном исследовании изучено влияние инъекций фракционированной плазмы крови на репаративный остеогенез в зависимости от дозировки и исходного регенераторного статуса реципиента. Забор крови проводили у экспериментальных животных (собак) в период distraction при проведении остеосинтеза костей голени по Илизарову. Плазму фракционировали по оригинальной методике. Реципиентами являлись лабораторные мыши, которым проводили операцию по остеотомии ребра. Однократное введение фракции в диапазоне доз от 10 до 60 мг/кг осуществляли до и после операции. Морфологические и биохимические исследования крови и тканей проводили спустя 10 суток после операции. **Результаты.** Было обнаружено, что фракционированная плазма крови обладает как остеоиндуцирующими, так и ингибирующими свойствами. На выраженность и направленность действия влияет доза фракции и метаболическое состояние организма реципиента на момент инъекции. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения препаратов крови в целях оптимизации репаративного остеогенеза.

**Ключевые слова:** репаративная регуляция, факторы роста, плазма крови, репаративный остеогенез, эксперимент, остеосинтез по Илизарову.

**Purpose.** To clear some conditions for realization of the phenomenon of the influence of blood plasma fraction injection on reparative osteogenesis depending on the dose and recipient animal's regenerative status. **Materials and Methods.** The influence of blood fractionated plasma injections on reparative osteogenesis depending the dosage and initial recipient's regenerative status investigated in an experimental study. Blood taking performed in experimental animals (dogs) in the distraction period during leg bone osteosynthesis according to Ilizarov. Plasma fractionation made by original technique. Laboratory mice subjected to rib osteotomy served as recipients. A single injection of fraction within the doses from 10 to 60 mg/kg made before and after surgery. Morphologic and biochemical investigations of blood and tissues performed 10 days after surgery. **Results.** Blood fractionated plasma found to have both osteoinductive and inhibiting properties. The fraction dose and recipient organism's metabolic status at the time of injection influence the impact intensity and direction. **Conclusion.** The results evidence promising use of blood preparations in order to optimize reparative osteogenesis.

**Keywords:** reparative regulation, growth factors, blood plasma, reparative osteogenesis, experiment, osteosynthesis by Ilizarov.

## ВВЕДЕНИЕ

Сокращение сроков регенерации костной ткани после ее повреждения остается среди актуальных проблем современной медицины. Известен обширный перечень фармакологических агентов, используемых для решения этой проблемы; исследователями также ведется активный поиск новых средств. Ранее было обнаружено, что сыворотка или плазма крови животных с активным остеогенезом, фракционированная по

разработанной в РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова технологии, ускоряет репаративный остеогенез у реципиентов [12]. Целью настоящего исследования стало выяснение некоторых условий реализации данного феномена, а именно, влияния на репаративный остеогенез инъекции фракции плазмы крови в зависимости от ее дозы и регенераторного статуса животного-реципиента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Изучали воздействие на репаративный остеогенез однократной инъекции водного раствора фракции плазмы крови в диапазоне доз от 10 до 60 мг/кг, выполненной на фоне физиологической или репаративной регенерации животных-реципиентов. Донорами фракций были собаки, которым проводили distractionный остеосинтез костей голени по Илизарову. У животных через семь суток после поперечной остеотомии берцовых костей в средней трети голени проводили distraction в течение четырех недель с темпом 1 мм в сутки за 4 приема. Из плазмы крови, взятой у собак на 14-21-е сутки distractionного периода, проводили выделе-

ние материала способом [12], включающим выделение фракции, осаждающейся при 30-50 %-ном насыщении сульфатом аммония, ее разделение гель-проникающей хроматографией низкого давления с использованием хроматографического оборудования фирмы LKB (Швеция) на колонке с носителем Toyopearl-HW 50F (TOYONAAS, Япония) с получением фракции с молекулярной массой 20-30 кДа и последующим выделением фракции, сорбирующейся на анионообменнике ДЭАЭ-целлюлоза (НПО «Биохимреактив»), диализа, лиофильного высушивания и стерилизации бета-излучением в дозе 20 кГр на линейном резонансном ускорителе электронов ЛУЭ-8-5В. Выделенные компоненты плазмы перед инъекцией растворяли в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия. Для тестирования были выбраны четыре концентрации фракций: 60, 30, 15 и 10 мг/кг массы тела животного-реципиента.

Реципиентами фракционированной плазмы крови были 100 белых лабораторных мышей-самцов массой 25-30 г, распределенных на 2 серии опытов. В обеих сериях репаративный остеогенез моделировали с помощью операции остеотомии ребра [11]. В группу интактных животных входили 20 мышей. Животным первой серии опытов однократно инъецировали одну из доз фракционированной плазмы за 3 суток до проведения операции (серия 1, 4 группы, n = 10 в каждой группе) подкожно в области проекции будущей остеотомии. Животным второй серии инъекцию фракции в тех же дозах проводили через 24 часа после операции (серия 2, 4 группы, n = 10 в каждой группе). Контрольные группы (n = 10) для каждой серии опытов составили мыши, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия в том же объеме в соответствующий срок. Через 10 суток после операции животных обеих серий выводили из опыта и проводили морфологические исследования области перелома и биохимические исследования сыворотки крови, тканей печени и скелетных мышц бедра.

Материал для морфологических исследований составили фрагменты грудной клетки, взятые со стороны повреждения. Образцы фиксировали в 10 % растворе формалина. Костные фрагменты обезжиривали в ацетоне, декальцинировали в трилоне Б, нейтрализовали в 5 % растворе алюмокалиевых квасцов. Промытый материал обезвоживали и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование проводили на микроскопе «Микмед 5» («ЛОМО», Россия). На гистологических препаратах исследовали

фрагменты тел реберных костей, включающие зону сращения перелома и прилежащие участки костных отломков. Для выполнения гистоморфометрического исследования на проекционном экране микроскопа Visopan ("Reichert-Jung", Австрия) размещали тестовую систему в виде решетки с ячейми известной площади. В произвольно выбранных, не перекрывающихся полях зрения производили подсчет количества профилей дифференцированных форм клеток костной и хрящевой ткани, а также открытых функционирующих капилляров в составе параоссальной соединительной ткани. Остеоиндуцирующий эффект тестируемых препаратов оценивали по соотношению численной плотности костных и хрящевых клеток в составе периостального костного регенерата.

В сыворотке крови определяли содержание молочной кислоты, кальция, магния, фосфора и хлоридов, активности щелочной (КФ 3.1.3.1.) и кислой (КФ 3.1.3.2.) фосфатаз – с помощью наборов фирмы Vital Diagnostics (СПб), концентрацию пировиноградной кислоты – модифицированным методом Умбрайт [5]. Содержание гликогена в тканях определяли с помощью антронового метода [8], содержание креатина – по реакции с диацетилем, креатинфосфата – по содержанию фосфора в безбелковом экстракте [7], общих липидов – по Фолчу [8]. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса, критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони, корреляционного анализа по Спирмену. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех группах животных 1-й серии опытов отмечали значимое увеличение численной плотности костных клеток и открытых капилляров, а также уменьшение количества хрящевых клеток в области регенерата по сравнению с контролем (рис. 1). Данный эффект обладал линейной зависимостью от дозы: положительной по отношению к численности клеток костной ткани и микрососудов, отрицательной – в отношении количества хрящевых клеток (табл. 1).

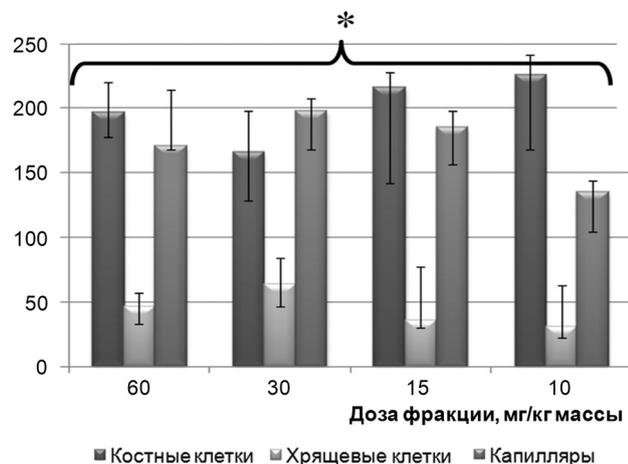


Рис. 1. Медианы морфометрических показателей у животных 1-й серии опытов, % от значений в контрольной группе; \* – p<0,05 по сравнению с контрольной группой

Таблица 1

Коэффициенты корреляции концентрации фракций и значений показателей морфометрии

	Количество животных	Коэффициент Спирмена, R	Уровень p
Костные клетки	37	0,394	0,016
Хрящевые клетки	37	-0,394	0,016
Капилляры	34	0,715	2,0×10 <sup>-6</sup>

В биохимических показателях крови (рис. 2) и тканей не отмечалось достоверных изменений, за исключением значений пировиноградной кислоты после инъекций фракционированной плазмы в дозе 60 мг/кг.

В группах животных 2-й серии опытов действие фракции плазмы крови обладало более сложной зависимостью. Если концентрация фракции 60 мг/кг отчетливо стимулировала периостальное костеобразование, то концентрация 15 мг/кг оказывала ингибирующее влияние как на остео-, так и на хондрогенез (рис. 3).

Линейной зависимости морфометрических показателей от дозы фракции в этой серии опытов обнаружено не было. Биохимические исследования показали, что в каждой группе животных 2-й серии экспериментов формируется своя метаболическая картина (рис. 4), по видимому, соответствующая большому напряжению компенсаторно-адаптационных механизмов в сравнении с таковой в группах 1-й серии опытов (рис. 2).

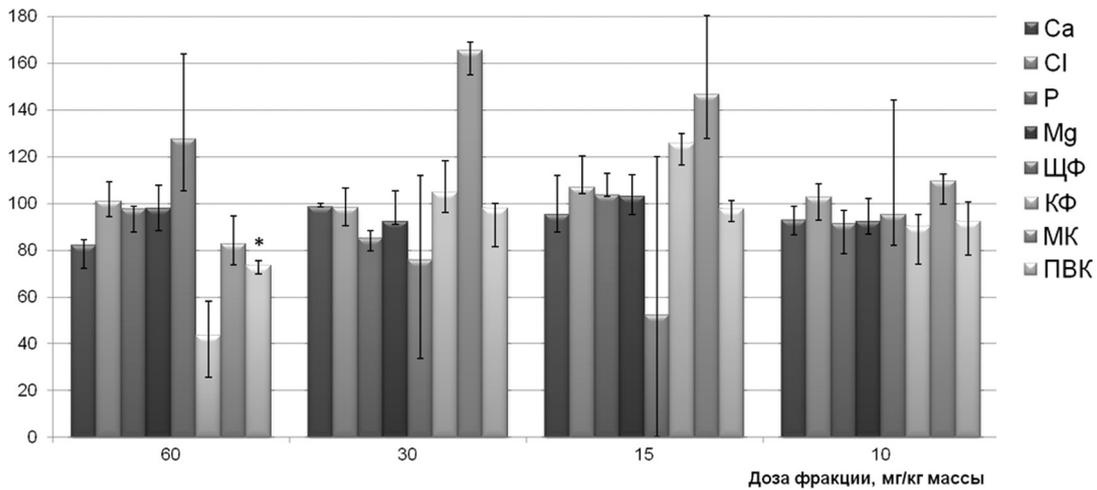


Рис. 2. Медианы биохимических показателей крови у животных 1-й серии опытов, % от контроля. Са – кальций, Cl – хлориды, Р – фосфор, Mg – магний, ЩФ – щелочная фосфатаза, КФ – кислая фосфатаза, МК – лактат, ПВК – пировиноградная кислота; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

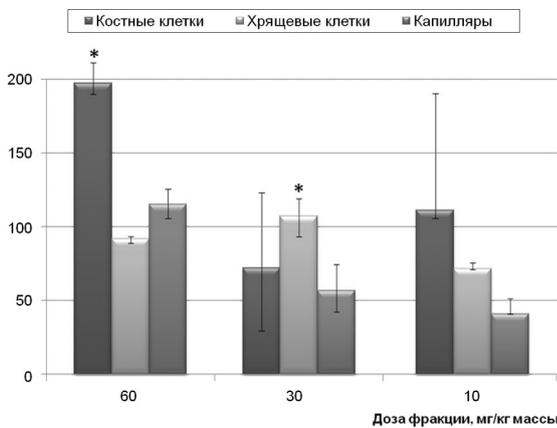


Рис. 3. Медианы морфометрических показателей в животных 2-й серии опытов, % от значений в контрольной группе; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

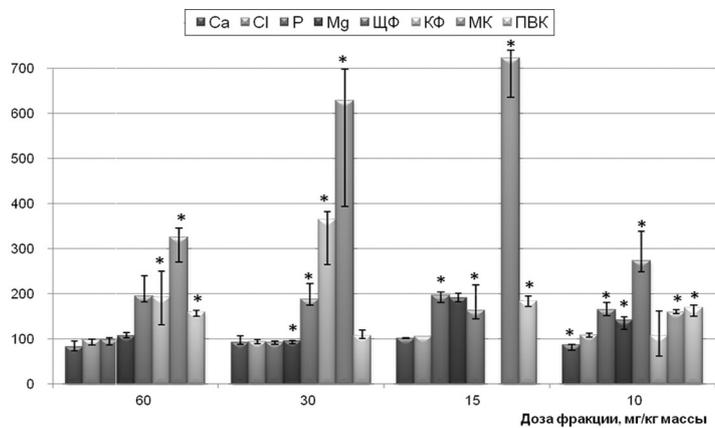


Рис. 4. Медианы биохимических показателей крови у животных 2-й серии опытов. Обозначения: см. рис. 2; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой

Интересно отметить, что в группе с инъекцией 15 мг/кг, где были зафиксированы нулевые значения всех морфометрических показателей, активность кислой фосфатазы оказалась ниже уровня чувствительности метода, а уровень лактата превысил 700 % от контрольных значений. Возможно, что метаболический сигнал от компонентов этой дозы фракции вызвал общий эффект, отраженный как в изменении программы развития капилляров и хемотаксиса клеток, так и в своеобразии значений биохимических показателей. Снижение активности кислой фосфатазы может быть показателем торможения процессов перестройки в костной ткани, а повышение концентрации лактата, известного в качестве общего регулятора аэробных и анаэробных процессов метаболизма, – показателем сбоя в сопряжении этих механизмов в ходе регенерации. В пользу этого предположения говорит то, что группе с дозой 30 мг/кг, показавшей снижение количества капилляров, также наблюдали высокие концентрации лактата в крови.

Основные корреляционные отношения между биохимическими показателями крови и тканей во 2-й серии опытов (рис. 5) демонстрируют взаимосвязи метаболизма энергоносителей различных тканевых депо, формирующиеся в ходе эксперимента и не регистрируемые в нормально функционирующем организме. Так, тесная связь между магнием и фосфором крови может быть

обусловлена поступлением в гуморальное русло разрушенного комплекса «Mg-зависимая АТФ-аза – АТФ».



Рис. 5. Корреляции дозы фракционированной плазмы крови и биохимических показателей во 2-й серии опытов (модуль коэффициента Спирмена от 0,51 до 0,96,  $p < 0,05$ ). Сплошные стрелки – положительные, пунктирные стрелки – отрицательные значения коэффициента. Толстыми стрелками обозначены связи с модулем коэффициента выше 0,75. МС – микрососуды, ХК – хрящевые клетки, КК – костные клетки, МК – молочная кислота, ПВК – пировиноградная кислота

Итак, с одной стороны, полученные результаты доказывают возможность стимуляции остеогенеза с помощью фракционированной плазмы крови. Разработка фармакологических средств на основе крови включает дальнейшее детальное выяснение условий реализации остеогенного эффекта, зависящих как от донорского биологического материала, так и состояния метаболизма реципиента. Выделенные компоненты плазмы крови содержат комплекс биологически активных веществ. Известно, что они действуют нелинейно и пермиссивно, то есть в зависимости от местных условий [9]. Именно этими свойствами можно объяснить обнаруженное нами влияние дозы на эффект в рамках каждой серии опытов. Вероятно, эффект пермиссивности участвует в приводимых в литературе неудачах использования различных стимуляторов костной регенерации *in vivo* [13].

С другой стороны, результаты опытов иллюстрируют участие костной ткани в реализации адаптационных реакций типа стресса. Паратиреоидный гормон, под воздействием которого происходит резорбция костной ткани, является одним из первых сигналов стресс-реакции. При инъекции фракционированной плазмы на фоне физиологической регенерации в организме реципиента, по-видимому, осуществляется не патологическая стресс-реакция, ведущая к негативным последствиям, а адаптационная реакция, ведущая к укреплению физиологических структур и функций. Такого рода реакции известны под названиями реакций эустресса по Селье [10], реакций тренировки и активации [1], стресс-реакций с формированием феномена адаптационной стабилизации структур [4]. Они подразумевают положительные эволюционные изменения структур и

функций за счет дополнительно вскрывающихся в организме энергетических ресурсов. Изучение реакций на клеточном уровне показало, что оптимальным уровнем функционирования «энергетических станций» клетки – митохондрий – является не их полный покой или самая напряженная работа, а постоянный промежуточный по интенсивности уровень активности (М.Н. Кондрашова, 1987 – цит. по [6]). Мы полагаем, что операционный стресс в 1-й серии экспериментов происходил у животных при адаптации, близкой к формированию феномена адаптационной стабилизации структур под воздействием инъекций. Это в дальнейшем приводило к более быстрым темпам морфогенеза в остеогенном направлении. У животных 2-й серии опытов инъекции фракционированной плазмы создавали дополнительное стрессогенное воздействие непосредственно через сутки после операции, на фоне резко активизированного метаболизма. Это приводило как к стимуляции, так и к ингибированию морфогенеза в области регенерации в зависимости от дозы входящих в инъекцию компонентов. В этой серии опытов мощное стрессогенное воздействие сопровождалось значительной активацией энергетического обмена в масштабах целостного организма. По-видимому, именно различные неспецифические реакции лежат в основе различного реагирования на один и тот же эффектор, поскольку аналогичная картина описана при исследовании влияния антител к глутамату и  $\gamma$ -аминомасляной кислоте, вводимых экспериментальным животным интраназально до и после водноиммерсионной стрессорной нагрузки [2]. Мы полагаем, что дальнейшее развитие теорий регенерации и неспецифических адаптационных реакций лежит в направлении изучения энергообеспечения подсистем организма.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, доказано, что местная инъекция фракционированной плазмы крови от доноров с активным остеогенезом может как стимулировать, так и ингибировать репаративное костеобразование. На выраженность и направленность действия такой плазмы влияет ее доза, а также метаболическое со-

стояние организма реципиента. Показано участие процессов энергообеспечения при репаративной регенерации костной ткани. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения препаратов крови в целях оптимизации репаративного остеогенеза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гаркави Л. Х., Квакина Е. Б., Уколова М. А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов н/Д., 1979. 128 с. *Garkavi LKh, Kvakina EB, Ukolova MA. Adaptatsionnye reaktcii i rezistentnost' organizma [Organism's adaptation reactions and resistance]. Rostov na Donu, 1979. 128 s.*
2. Евсеев В. А., Захарова И. А., Ветрилэ Л. А. Стресс-протективное и стресс-потенцирующее действие антител к глутамату и  $\gamma$ -аминомасляной кислоте при интраназальном введении мышам C57B1/6 // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. Т. 148, № 7. С. 18-22. *Evscev VA, Zakharova IA, Vetrile LA. Stress-protektivnoe i stress-potentsiruiushchee deistvie antitel k glutamatu i  $\gamma$ -aminomaslianoi kislyote pri intranasal'nom vvedenii mysham C57B1/6 [Stress-protective and stress-potentiating effect of anti-Glutamate and anti- $\gamma$ -aminobutyric acid antibodies for intranasal infusion in mice C57B1/6]. Biul. eksperim. biologii i meditsiny. 2009;148(7):18-22.*
3. Исследование гуморальных компонентов, стимулирующих остеогенез / О. Л. Гребнева, М. А. Ковинька, С. Н. Лунева, Т. А. Ларионова, Е. Н. Овчинников, Д. В. Самусенко // Гений ортопедии. 2012. № 2. С. 72-76. *Grebneva OL, Kovin'ka MA, Luneva SN, Larionova TA, Ovchinnikov EN, Samusenko DV. Issledovanie gumoral'nykh komponentov, stimiliruiushchikh osteogenez [Studying the humoral components stimulating osteogenesis]. Genij Ortop. 2012;(2):72-76.*
4. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина, 1984. 269 с. *Meerson FZ. Patogenez i preduprezhdenie stressornykh i ishemicheskikh povrezhdenii serdca. M.: Meditsina, 1984. 269 s.*
5. Бабаскин Б. С. Определение пировиноградной кислоты модифицированным методом Умбрайта // Лаборатор. дело. 1976. № 3. С. 76-79. *Babaskin BS. Opredelenie pirovinogradnoi kisloty modifitsirovannym metodom Umbrait [Pyruvic acid determination by modified Umbreit technique]. Laborator. delo. 1976;(3):76-79.*
6. Пахомова В. М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология. 1995. Т. 37, № 1–2. С. 66–91. *Pakhomova VM. Osnovnye polozheniia sovremennoi teorii stressa i nespetsificheskii adaptatsionnyi sindrom u Rastenii [Fundamentals of the modern stress theory and the non-specific adaptation syndrome in plants]. Tsitologiya. 1995;37(1-2):66-91.*

7. Практикум по биохимии : учеб. пособие / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. М.: Изд-во МГУ, 1989. 509 с.  
*Praktikum po biokhīmii : ucheb. posobie. Pod red. S. E. Severina, G. A. Solov'evoi [Workshop on biochemistry: a manual. Eds. SE. Severin, GA. Solov'eva]. M: Izd-vo MGU, 1989. 509 s.*
8. Прохорова М. И., Тупикова З. Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1965. 220 с.  
*Prokhorova MI, Tupikova ZN. Bol'shoi praktikum po uglevodnomu i lipidnomu obmenu [Large workshop on carbohydrate and lipid metabolism]. L: Izd-vo Leningrad. un-ta, 1965. 220 s.*
9. Романчиков Ю. М. Факторы роста, вторичные мессенджеры и онкогены // Успехи соврем. биологии. 1991. Т.111, № 1. С. 19-33.  
*Romanchikov IuM. Faktory rosta, vtorichnye messenzhery i onkogeny [Growth factors, secondary messengers and oncogens]. Uspekhi sovrem. biologii. 1991;111(1):19-33.*
10. Селье Г. Стресс без дистресса. М: Прогресс, 1979. 123 с.  
*Sel'e G. Stress bez distressa [Stress free of distress]. M: Progress, 1979. 123 s.*
11. Экспериментальная модель для изучения процессов репаративного остеогенеза / О. Л. Гребнева, М. А. Ковинька, Т. А. Силантьева, О. В. Дюрягина, Л. И. Сбродова, Е. И. Кузнецова, Л. В. Розова, М. В. Стогов, Е. А. Ткачук // Сиб. мед. журн. 2011. Т. 26, № 1. Вып. 1. С. 135-139.  
*Grebneva OL, Kovin'ka MA, Silant'eva TA, Diuriagina OV, Sbrodova LI, Kuznetsova EI, Rozova LV, Stogov MV, Tkachuk EA. Eksperimental'naiia model' dlia izuchenīia protsessov reparativnogo osteogeneza [An experimental Model to study the processes of reparative osteogenesis]. Sib. med. zhurn. Вып. 1. 2011;26(1):135-139.*
12. Способ стимуляции репаративного остеогенеза : пат. 2193868 Рос. Федерация. № 98105940/14 ; заявл. 26.03.1998 ; опубл. 10.12.2002, Бюл. № 34.  
*Pat. 2193868 RF. Sposob stimulatsii reparativnogo osteogeneza [A technique for reparative osteogenesis Stimulation]. No. 98105940/14; zaiavl. 26.03.1998; opubl. 10.12.2002. Biul. № 34.*
13. Growth factor interactions in bone regeneration / D.H. Kempen, L.B. Creemers, J. Alblas, L. Lu, A.J. Verbout, M.J. Yaszemski, W.J. Dhert // Tissue Eng. Part B. Rev. – 2010. – Vol.16, No. 6. – P. 551-566.  
*Kempen DH, Creemers LB, Alblas J, Lu L, Verbout AJ, Yaszemski MJ, Dhert WJ. Growth factor interactions in bone regeneration. Tissue Eng. Part B Rev. 2010 Dec;16(6):551-566. doi: 10.1089/ten.teb.2010.0176.*

Рукопись поступила 29.12.2012.

#### Сведения об авторах:

1. Гребнева Ольга Леонидовна – ФГБУ "Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова" Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории биохимии, к. б. н.; e-mail: olgrebneva@bk.ru, т. 8912-572-97-15.
2. Ковинька Михаил Александрович – ФГБУ "Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова" Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории биохимии, к. б. н.; e-mail: mkovinka@mail.ru, т. 8(3522) 45-05-38.
3. Лунёва Светлана Николаевна – ФГБУ "Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова" Минздрава России, руководитель лаборатории биохимии, д. б. н., профессор, e-mail: luneva\_s@mail.ru, т. 8(3522)-45-05-38.
4. Силантьева Тамара Алексеевна – ФГБУ "Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова" Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории морфологии, к. б. н.; e-mail: tsyl@mail.ru, т. 8(3522) 41-52-27.
5. Стогов Максим Валерьевич – ФГБУ "Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова" Минздрава России, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, д. б. н.; e-mail: stogo\_off@list.ru, т. 8(3522)-45-05-38.