

ЭКСПЕРИМЕНТ

© Группа авторов, 1996.

Конструирование и экспериментальная апробация фармпрепаратов из зрелой костной ткани

**В.И. Шевцов, К.С. Десятниченко, О.Б. Устюжанина, А.Н. Дьячков, А.А. Ларионов,
С.Н. Лунева, О.Л. Гребнева, С.П. Изотова, Н.К. Махнина, С.И. Алиева,
О.Н.Фадеева**

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган
(Генеральный директор — академик РАМТН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

В работе описаны способы получения из зрелой компактной костной ткани препаратов, ускоряющих созревание дистракционного регенерата кости, стимулирующих кроветворение и иммуногенез, восполняющих дефицит фосфата кальция в организме, коллагена и гликозаминогликанов, а также результаты апробации этих препаратов на животных в эксперименте.

Ключевые слова: костная ткань, химический состав, получение фармпрепаратов, испытания в эксперименте.

Разработка и широкое внедрение способов коррекции врожденных и приобретенных нарушений опорно-двигательного аппарата (ОДА) посредством чрескостного компрессионно-дистракционного остеосинтеза по Г.А. Илизарову (ЧКДОС) совершили переворот в травматологии и ортопедии, принесли выздоровление, социальную и трудовую реабилитацию десяткам тысяч людей. Методы ЧКДОС постоянно совершенствуются, делая доступным лечение больных с практически любыми нозологическими формами повреждения и заболевания ОДА.

Вместе с тем, остается ряд проблем, трудно разрешимых или неразрешимых с помощью усовершенствования технологии ЧКДОС. По нашему представлению к ним в первую очередь относятся:

- анемизация, следующая за скелетной травмой [1, 2];
- нарушение иммунного статуса при повреждении ОДА [3, 4];
- деминерализация интактного скелета при лечении переломов и исправлении длины и формы отдельных костей [5, 6];
- значительная продолжительность фазы созревания (минерализации) - периода фиксации - в сравнении с периодом дистракции;
- дегенеративно-дистрофические изменения в синовиальных средах суставов, образованных как оперированными костями, так и контрлатеральными [7].

Эти осложнения, сопровождающие повреждение ОДА - общие для травматологии и ортопедии - не оставлены вниманием специалистов разного профиля - клиницистов, эксперименталь-

торов, теоретиков, предложивших применение анаболических стероидных, полипептидных остеотропных гормонов, иммуномодуляторов, хондропротекторов и пр., обзор которых не входит в задачу настоящего сообщения. Своей целью мы считаем необходимость привлечь внимание к костной ткани как источнику разнообразных биологически активных веществ (БАВ) и пластического материала для создания новых фармакологических препаратов, способствующих потенцированию влияния на репаративный остеогенез технических приемов ЧКДОС.

Ежегодно в мире миллионы тонн костной ткани животных на бойнях и мясоконсервных комбинатах используются, в лучшем случае, на производство не окупающих себя материалов или становятся предметом загрязнения окружающей среды. Только ничтожная часть идет на приготовление фармпрепаратов (например, оссопан фирмы Robapharm, Базель). На рис. 1 приведен аппроксимированный состав костной ткани. Примерно 70 % ее приходится на минеральную фазу, которая может служить источником для получения препарата, восполняющего дефицит фосфорно-кальциевых солей - около 10 % населения планеты страдает остеопорозом вследствие алиментарных, гормональных и других нарушений [8, 9]. Около 20 % костной ткани составляет коллаген типа I того же типа, что и в коже - практически единственном источнике получения коллагена, находящего все большее применение в медицине в виде гемостатических и бактериостатических губок, основы водорастворимых гелевых мазей и т. п. [10]. Неколлагеновые белки костной ткани (НКБ) - ее минорный компонент - включают в себя семей-

ство местных факторов роста (МФР), контролирующих физиологическую клеточную активность, способность стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток [11, 12]. Наконец, наиболее известные и применяемые широко в настоящее время хондропротекторы представляют собой продукты гидролиза гликозаминогликанов или входящие в их состав ингредиенты [13, 14], составляющие 3 - 5 % массы костной ткани.

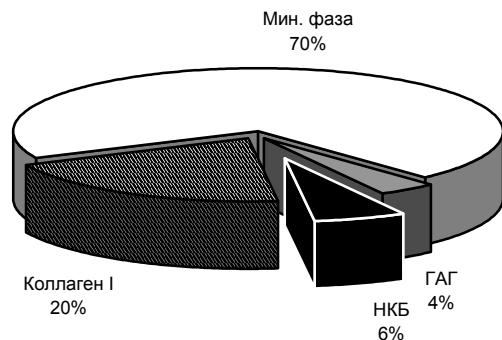


Рис. 1. Аппроксимированный состав костной ткани

В РНЦ "ВТО" им. акад. Г.А.Илизарова исследования по выделению, изучению физико-химических и биологических свойств НКБ зрелой костной ткани и распределению их в различных морфо-функциональных зонах дистракционного регенерата проводятся около двух десятков лет в комплексных НИР с участием 6 - 8 научных подразделений и составляют, по существу, новое научное направление, основные положения которого изложены нами в первом номере настоящего журнала. В данном сообщении мы представляем результаты некоторых разработок прикладного характера, перспективных, на наш взгляд, для создания фармсредств, потенцирующих стимулирующие морфогенез тканей свойства ЧКДОС и корректирующих его осложнения.

Приступая к конструированию фармпрепаратов из компонентов костной ткани, мы постулировали для себя несколько положений:

- лабораторный регламент их получения должен быть в достаточной мере технологичен - создание на его основе промышленного производства должно достигаться простым масштабированием лабораторных приемов;
- костная ткань в процессе приготовления серии препаратов различного назначения должна использоваться полностью, без отхо-

дов;

- для извлечения, фракционирования, очистки ингредиентов костной ткани, входящих в состав препаратов, не должны применяться вещества I - II класса вредности;
- все используемые реагенты должны возвращаться в технологический цикл или утилизироваться.

Кроме того, используя референтные данные [15] и собственные наблюдения, мы пришли к выводу, что фармпрепараты должны быть композиционными, с тем чтобы, действуя кооперативно и синэргично, каждый отдельный компонент усиливал эффект другого, а суммарное влияние композиции обладало качественно новым действием.

В основу лабораторного регламента получения фармпрепаратов из зрелой костной ткани положен описанный нами ранее [16, 17] комплекс приемов выделения НКБ, включающий кислотную декальцинацию, диссоциативное экстрагирование декальцинированного внеклеточного органического матрикса, диализ, фракционирование посредством высаливания, гелевой фильтрации и ионообменной хроматографии.

Основные этапы выделения и очистки БАВ костной ткани, костного коллагена и минерала приведены на рис. 2. Зная биологические и физико-химические свойства отдельных ингредиентов, можно, внося минимальные изменения в эту схему, получать композиции веществ с заранее заданными свойствами, т.е. конструировать по потребности новые фармпрепараты. В настоящем сообщении мы приводим несколько примеров получения таких веществ - потенциальных фармпрепаратов. Общее рабочее название, выбранное нами для них, - стимулон (от Stimulator from Bone).

Стимулон-1 - композиция неколлагеновых белков костной ткани, осаждающихся при насыщении сульфатом аммония 45 - 50 %, с молекулярной массой от 20 до 30 кД, не обладающих сродством к анионообменнику [18] (рис. 3).

Этот препарат при испытании в эксперименте на животных проявил следующие свойства. При однократном введении мышатам с массой тела 8 - 11 г в дозе 1 мг/кг массы тела уже к 5-м суткам после введения отмечено статистически достоверное опережение в приросте массы тела по сравнению с контролем, получавшим равный с препаратом объем 0,15 М раствора NaCl (рис. 4).

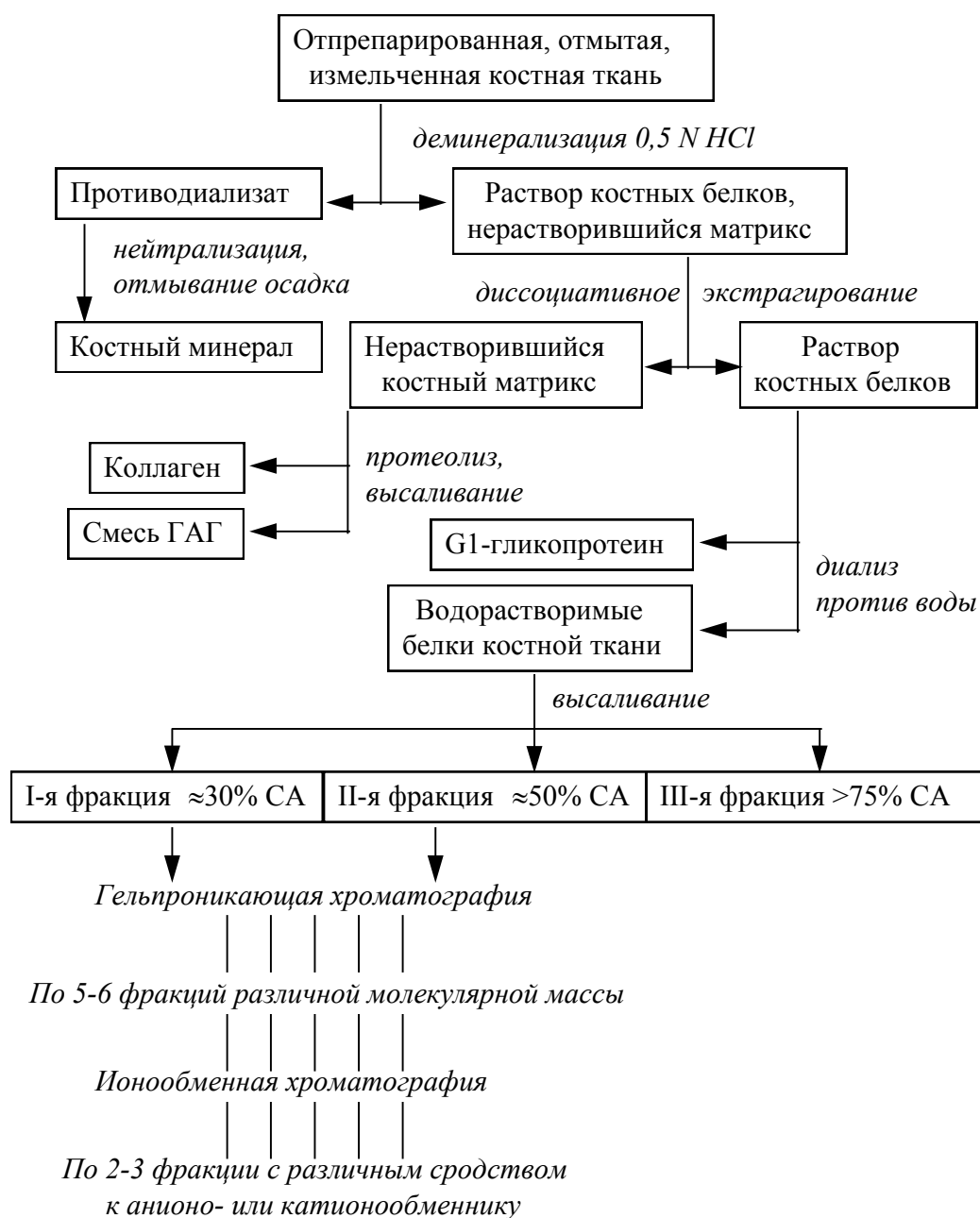


Рис. 2. Схема выделения и очистки ингредиентов костной ткани

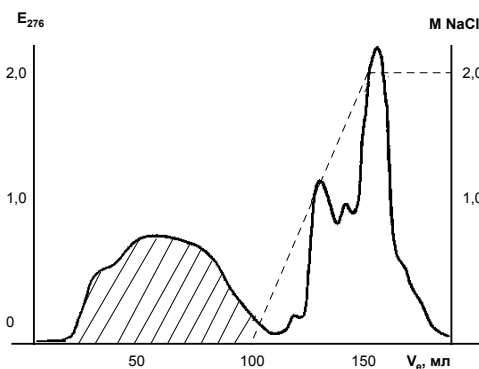


Рис. 3. Заключительная фаза выделения препарата стимубон-1. Колонка ДЕАЕ-сефадекса А-25 (20×2см)

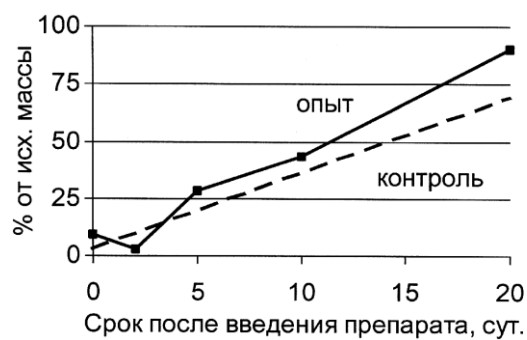
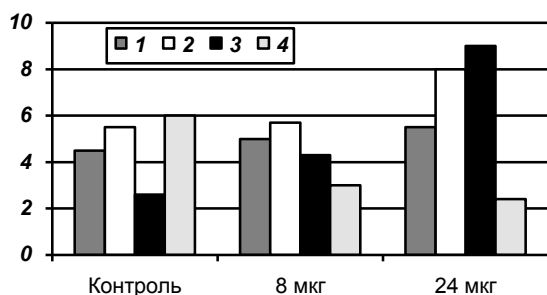


Рис. 4. Влияние препарата стимубон-1 на скорость прироста массы тела растущих мышей

На рис. 5 представлены результаты влияния препарата на красное кроветворение в зависимости от дозы, парентерально введенной взрослым мышам. Все использованные тесты подтверждают стимулирующий эффект стимбона-1 на эритропоэз. Влияние на костеобразование проверено в двух экспериментах.



- 1 Содержание эритроцитов $\times 10^{12}$ клеток/л
- 2 Индекс массы селезенки
- 3 Абсолютное количество 9 эритроидных клеток селезенки на 100 спленоцитов
- 4 Лейкоцитарно-эритроцитарное соотношение костного мозга

Рис. 5. Влияние препарата стимбон-1, стимулирующего физиологическую и репаративную регенерацию, на гематологические показатели в зависимости от дозы.

На рис. 6 показан результат замещения стандартного дефекта малоберцовой кости у кролика после однократного введения 2 мл препарата (0,8 мг/мл) и того же объема 0,15 M NaCl на 3-и сутки после создания дефекта. В таблице 1 приведены показатели минерализации дистракционного регенерата у собак, которым после завершения дистракции дважды вводили по 1 мг/кг массы тела стимбон-1 или одинаковый объем физраствора.

Приведенные в таблице данные показывают, что влияние стимбона-1 не ограничивается влиянием на отложение фосфата кальция во внеклеточном матриксе новообразованной кости, но ускоряет созревание минеральной фазы, т.е. обладает свойством инициировать кристаллизацию гидроксилапатита.

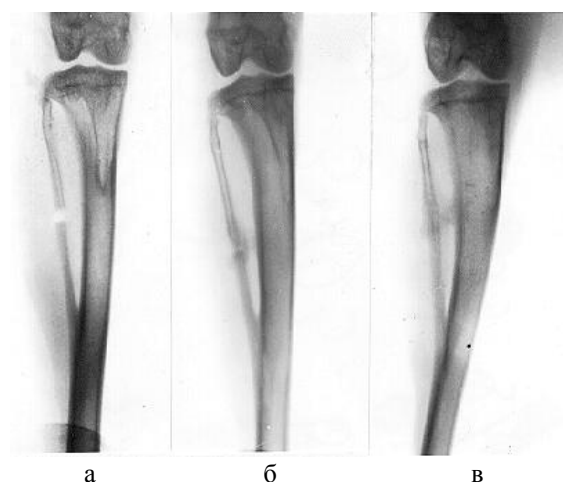


Рис. 6. Рентгенограмма дефекта малоберцовой кости кролика: а - исходный дефект, б - через 18 суток после введения 0,15M NaCl, в - через 18 суток после введения препарата стимбон-1.

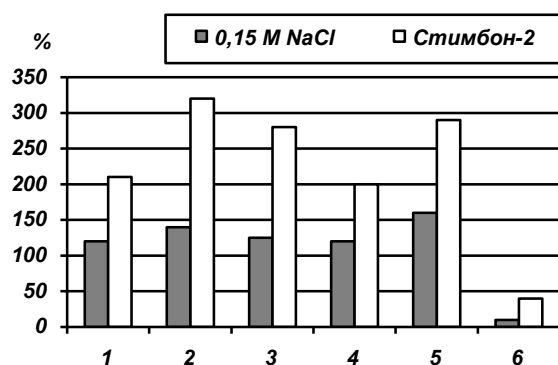
Стимбон-2 - композиция неколлагеновых белков костной ткани, осаждающихся при 45 - 50%-м насыщении сульфатом аммония, с относительной молекулярной массой 20 - 30 кД, не проявляющих сродства к катионообменнику [19] (кислые и нейтральные белки). Этот препарат, в отличие от предыдущего, наиболее выраженное действие оказывает на белое кроветворение. На рис. 7 представлены некоторые изменения в составе крови белых взрослых мышей через 48 часов после введения 5 мг/кг массы тела: в 2 раза увеличивается общее содержание лейкоцитов, обеспечиваемое повышением уровня всех анализируемых клеточных форм; кроме того, более чем в 5 раз возрастает содержание плазматических клеток в селезенке, однако всего лишь на 30% возрастает лейкоцитарно-эритробластическое соотношение костного мозга, т.е. стимулирование белого кроветворения практически не ухудшает состояние эритропоэза.

Таблица 1

Влияние препарата стимбон-1 на минерализацию дистракционного регенерата большеберцовой кости кролика

Показатель	Ткань		
	Интактная кость	Дистракционный регенерат	
		контроль	опыт
Содержание Са (г/100г сухой обезжиренной ткани)	24,62±0,84	18,37±0,71	21,02±0,81*
Содержание Р (г/100г сухой обезжиренной ткани)	13,20±0,41	12,05±0,32	12,83±0,81*
Показатель кристаллизации минеральной фазы (Са/PO ₄)	1,49±0,10	1,18±0,04	1,31±0,07*
Показатель минерализации (Са+3Р)	63,9±1,8	54,5±1,6	59,4±1,3*

* показатели, отличающиеся от контрольных с уровнем > 95 %



1 - общее содержание лейкоцитов (% исходного уровня)
 2 - молодые формы нейтрофилов (% исходного уровня)
 3 - общее содержание нейтрофилов (% исходного уровня)
 4 - содержание лимфоцитов (% исходного уровня)
 5 - содержание моноцитов (% исходного уровня)
 6 - плазмциты селезенки $\times 10^{-1}$ (на 100 спленоцитов)
 Рис. 7. Влияние стимбона-2 на клеточный состав периферической крови и другие показатели лейкопоэза и иммуногенеза

Испытание иммуномодулирующих свойств стимбона-2 было осуществлено на 7 интактных собаках, имевших до введения препарата физиологические уровни ауторозеткообразования (0-2 %) и циркулирующих иммунокомплексов (0 - 25 усл. ед.). Влияние препарата на иммунный статус собак приведено в таблице 3.

Как оказалось, стимбон-2 обладает, кроме того, адаптогенными свойствами: введение его "стрессированным" мышам изменяло их показатели белой крови в направлении к физиологической норме.

Особенности внеклеточного органического матрикса костной ткани создают определенные трудности для получения из него коллагена и гликозаминогликанов, которые находят все более широкое применение в фармации и парфюмерной промышленности. Нами разработан

сравнительно простой и дешевый способ получения этих ингредиентов из нерастворимого материала, остающегося после деминерализации и диссоциативного экстрагирования.

Матрикс в соотношении 1 : 1 по объему заливают 0,01 М раствором HCl и добавляют пепсин (для производства антитоксических сывороток, Московский мясокомбинат) 1 г/л; оставляют при комнатной температуре, периодически перемешивая. 1 раз в 2 дня сиропообразный раствор коллагена сливают, а к нерастворившемуся материалу добавляют новую порцию переваривающего раствора. За 3 - 4 приема удается переварить не менее 80 % костного матрикса.

Дальнейшая очистка коллагена и гликозаминогликанов заключается в высаливании коллагена при 25 - 30%-м насыщении сульфатом аммония и диализе против дистиллированной воды. При этом коллаген получают в виде плотного геля, легко отделяющегося от раствора гликозаминогликанов. Тот и другой перед дальнейшим использованием лиофильно высушивают.

Мы нашли возможность использования и костного минерала в удобной для усвоения организмом форме. С этой целью мы в щелочной среде осаждаем фосфат кальция противодиализата, получаемого при деминерализации костной ткани, отмываем его дистиллированной водой, высушиваем, размалываем в тонкий порошок, который до тестообразной консистенции смешиваем с кислотным гидролизатом, полученным из остатков нерастворившегося матрикса и других белков, не использованных для приготовления препаратов, предназначенных для парэнтерального введения. Химический состав опытного образца стимбона-4, как названо это вещество, приведен в таблице 3.

Таблица 2
 Влияние парэнтерального введения препарата стимбон-2 на иммунный статус собак

Показатель	Срок после введения			
	До введения	24 часа	48 часов	7 суток
Т-РОК (от общего числа лимфоцитов, %)	22,6 $\pm$ 3,1	30,9 $\pm$ 7,0	33,2 $\pm$ 7,7	22,3 $\pm$ 5,6
Количество Т-лимфоцитов (клеток $\times 10^9$ /л)	0,20 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,07	0,21 $\pm$ 0,05
В-РОК (от общего числа лимфоцитов, %)	7,5 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 1,0	10,4 $\pm$ 2,1	7,4 $\pm$ 0,8
Количество В-лимфоцитов (клеток $\times 10^9$ /л)	0,08 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,1
Активные Т-лимфоциты (% от их общ. числа)	11,3 $\pm$ 1,7	17,1 $\pm$ 2,0	17,8 $\pm$ 1,4	11,6 $\pm$ 1,6
Фагоцитарная активность нейтрофилов (%)	84,3 $\pm$ 2,5	91,4 $\pm$ 2,2	92,7 $\pm$ 1,4	89,7 $\pm$ 1,6
Фагоцитарное число	8,9 $\pm$ 0,7	10,3,0 $\pm$ 0,4	10,4 $\pm$ 0,6	9,2 $\pm$ 0,5

Таблица 3
Химический состав препарата стимбон-4

Вещество	Количество, г / 100 г препарата
Кальций	32,02±1,30
Фосфор	19,42±0,50
Магний	2,16±0,22
Хлорид-ион	3,37±0,07
Сера сульфатов	1,24±0,06
Натрий	0,43±0,08
Общий азот	9,57±0,60
Аминный азот	3,84±1,43
Тяжелые металлы	не более 0,002

Как видно из нее, помимо минеральных веществ он содержит аминный азот в виде свободных аминокислот и олигопептидов, являясь источником не только костного минерала (на 2 порядка более усвояемого, растворимого, чем оссопан), но и незаменимых аминокислот, предшественников биосинтеза нуклеотидов, биогенных аминов и др. БАВ.

Фармакологические свойства стимбона-4 были испытаны на мышатах-отъемышах, в

опытной группе которых в рацион с низким содержанием минералов добавляли этот препарат в соотношении 5 : 10000. Результаты эксперимента, продолжавшегося 28 суток, приведены в таблице 5. Явно благотворное влияние стимбона-4 на рост животных и минерализацию костной ткани у них позволяет надеяться, что этот препарат со временем найдет применение в клинике для профилактики деминерализации скелета после ортопедических вмешательств и, возможно, лечения остеопороза различной этиологии.

Приведенные в настоящем сообщении примеры не исчерпывают всех возможностей использования костной ткани как источника новых фармакологических средств, в которых нуждается клиника травматологии и ортопедии, однако надеемся, что нам удалось показать перспективность выбранного направления и реальность завершения его появлением этих средств "на аптечной полке". Авторы приносят искреннюю благодарность сотрудникам нашего Центра и других учреждений, которые так или иначе помогали нам в этой работе, общий список которых едва ли не превысит объем этой статьи.

Таблица 4
Влияние препарата стимбон-4 на рост и состав костной ткани мышей

Показатель	Группа животных	
	Контроль	Опыт
Масса тела (г)	14,73±1,00	17,41±0,89*
Длина тела (мм)	76,6±1,4	84,9±1,4*
Длина большеберцовой кости (мм)	15,9±0,2	16,9±0,34*
Содержание Са в костной ткани (г / 100 г)	16,5±0,9	18,6±1,7*
Содержание Р в костной ткани (г / 100 г)	10,6±0,5	12,4±0,3
Содержание Mg в костной ткани (г / 100 г)	1,58±0,07	1,53±0,08

* показатели, отличающиеся от контрольных с уровнем > 95 %

ЛИТЕРАТУРА

1. Вагнер Е.А. и др. Инфузионно-трансфузионная терапия острой кровопотери / Е.А. Вагнер, Я.А. Заугольников, В.М. Ортенберг, В.М. Тавровский. - М., Медицина. - 1986. - 160с.
2. Реакция красной крови на скелетную травму, значение стабильной фиксации правильно сопоставленных отломков / Десятниченко, Ю.П. Балдин, С.И. Швед, В.Я. Шурша // Актуальные проблемы чрескостного остеосинтеза по Илизарову.: Сб. науч. трудов. Вып. 12. - Курган. - 1987. - С.41-47.
3. Аскалонов А.А., Гордиенко С.М., Полушкин Б.В. Изменения содержания Т- и В-лимфоцитов у больных с переломами // Ортопед.травматол. -1980. - № 11. - С.11-13.
4. Оценка иммунного статуса собак в ветеринарной и научно-исследовательской и ветеринарной практике: Метод. рекомендации /Уральский НИИТО; Сост.: А.В. Осипенко, В.В. Базарный, Э.Б. Макарова. - Екатеринбург. - 1993. - 12 с.
5. О роли неколлагеновых белков в минерализации дистракционного регенерата кости / К.С. Десятниченко, В.К. Камерин, Ю.С. Кочетков, Л.С. Кузнецова // Вопр. мед. химии. - 1985. - Т.31, № 6. - С.107-111.
6. Изучение репаративного костеобразования и кровообращения при переломах шейки бедренной кости по Илизарову / А.А. Свешников, С.И. Швед, В.М. Шигарев, Н.В. Офицерова // Актуальные проблемы чрескостного остеосинтеза по Илизарову: Сб. науч. трудов. Вып. 12. - Курган. - 1987. - С.19-31.
7. Грачева Л.И. Механохимия суставного хряща при коррекции патологии опорно-двигательного аппарата: Автореф. дис... канд. мед. наук. - Курган, - 1992. - 14 с.
8. Изменения гиалинового хряща коленного сустава у собак при чрескостного остеосинтеза / С.Н. Лунева, К.С. Десятниченко, А.А. Ларионов и др. // Тез.науч. конф. НИТЦ "ВТО", - Казань, 1996 (в печати).

9. Albright F. et al. Postmenopausal osteoporosis // J. Amer.Med.Ass. - 1941.- Vol.116. - P.2465-2474.
10. Rasmussen H. et al. Effect of combined therapy with phosphate and calcitonin on bone volume in osteoporosis // Metab.Bone.Dis.Relat.Res. - 1980. - Vol.2. - P.107-111.
11. Хилькин А.М. и др. Коллаген и его применение в медицине / А.М. Хилькин, А.Б. Шехтер, Л.П. Истранов, В.Л. Леменов - М.: Медицина.-1976. - 256 с.
12. Canalis E. Bone-related growth factors // Triangle. - 1988. - V.27, № 1-2. - P.11-19.
13. Щепеткин И.А. Полипептидные факторы остеогенеза // Успехи .соврем.биол. - 1994.- Т.114, вып.4. - С.454-466.
14. Павленко Т.Н. Применение нового органопрепарата "Румалона" при остеоартрозе//Тер.архив. - 1969. - № 12. - С.33-36.
15. Дедух Н.В. Остеоартрозы. Пути фармакологической коррекции./ Н.В. Дедух ,И.А. Зупанец, В.Ф. Черных, С.М. Дроговоз. - Харьков: Основа, 1992. - 140 с.
16. Теста Н. Регуляция клеточных линий в гемопоэзе // Гематол.трансфузиол. - 1991. - № 8.- С.27-28.
17. Выделение и биотестирование костных рострегулирующих факторов: Метод. Рекомендации / ВКНЦ «ВТО»; Сост.: К.С. Десятниченко, Ю.П. Балдин, А.Н. Дьячков и др. - Курган, - 1990. - 24 с.
18. Десятниченко К.С., Балдин Ю.П. Экспериментально-теоретические исследования, подтверждающие концепцию Г.А.Илизарова о единстве генеза костной и кроветворной тканей//Гений ортопедии. - 1995. - № 1.- С.32-38.
19. Препарат для стимуляции физиологической и репаративной регенерации//Патент РФ N 2050158, авт. К.С. Десятниченко. - Оpubл. Бюлл. № 35. - 20.12.95 г.
20. Препарат, стимулирующий иммуногенез - стимбон-2//Заявка на патент № 950108659, приоритет от 8.06.95 г., авт. К.С.Десятниченко.
21. Препарат стимбон-4 для коррекции обмена в организме фосфата кальция и способ его получения//Заявка на патент № 95117043, приоритет от 13.10.95 г., авт. К.С. Десятниченко, С.Н. Лунева.

Рукопись поступила 26.07.96 г.