

© Группа авторов, 1997

## **Костные рострегулирующие факторы – гуморальные регуляторы остеогенеза и кроветворения**

**О.Л. Гребнева, К.С. Десятниченко, А.А. Ларионов, С.П. Изотова, С.И. Алиева, М.А. Ковинька, Л.С. Кузнецова, О.Б. Устюжанина**

## ***Bone growth-regulating factors – humoral regulators of osteogenesis and hemopoiesis***

**O.L. Grebneva, K.S. Desiatnichenko, A.A. Larionov, S.P. Isotova, S.I. Aliyeva, M.A. Kovinika, L.S. Kuznetsova, O.B. Ustiuzhanina**

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

Сравниваются результаты экспериментов по влиянию костных и сывороточных фракций на репаративный остеогенез, биохимические показатели и гемопоэз. Результаты исследований показали, что сывороточные фракции, аналогичные костным по физико-химическим свойствам, обладают сходными с последними свойствами во влиянии на ряд исследованных параметров и, следовательно, могут содержать общие для кости и сыворотки эффекторы – низкомолекулярные неколлагеновые белки, - появляющиеся в кровеносном русле после их десорбции с костного матрикса.

**Ключевые слова:** кровь, кость, регуляторы роста, репаративный остеогенез.

Experimental results are compared on the basis of the made experiments, revealing the effect of bone and serum fractions on reparative osteogenesis, biochemical indices and hemopoiesis. The results demonstrated, that the serum fractions, analogous to the bone ones by their physicochemical qualities, had qualities, similar to those of the latters, concerning their effect on series of the studied parameters and, hence, they could contain effectors, common to both bone and serum, - low-molecular non-collagenous proteins, - which appeared in the circulatory bed after their desorption from bone matrix.

**Keywords:** blood, bone, growth regulators, reparative osteogenesis.

Известно, что сыворотка и плазма человека и животных, перенесших костную травму, обладает остеопозитической активностью [13] и оказывает стимулирующее влияние на процесс эктопического остеогенеза и дифференцировку остеогенных клеток костного мозга реципиентов [8, 11]. Результаты исследований последних трех десятилетий позволяют предположить, что активным началом в этих опытах явились депонированные в кости неколлагеновые белки (НКБ), впервые обнаруженные в лаборатории Urist [16]. На сегодняшний день известны несколько семейств полипептидных факторов, присутствующих в кости (семейств монокинов, трансформирующего фактора роста бета, инсулинподобных факторов роста и др.). Среди них есть как синтезированные остеогенными клетками, так и сорбированные из кровеносного русла. Было высказано предположение о возможности - в определенных условиях - десорбции НКБ, их высвобождения в кровь и, следова-

тельно, их способности действовать не только локально, но и дистантно [4, 6]. Работы по изучению костных НКБ, проводимые в РНЦ"ВТО", явились основанием для выделения и тестирования двух фракций из плазмы крови, по физико-химическим свойствам аналогичным композициям изученных и проявивших активность в отношении остеогенеза и кроветворения костных НКБ. С целью доказательства появления индукторов остеогенеза костного происхождения во фракциях плазмы крови животных с активно идущим костеобразованием нами было проведено сравнение действия на остеогенез, кроветворение и некоторые биохимические показатели фракций из кости и плазмы крови с аналогичными физико-химическими свойствами. Тестирование плазмы крови, взятой у животных именно во второй половине distraction, основывалось на ранее полученных результатах [9, 14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Чрескостный дистракционный остеосинтез (ЧКДО) у собак осуществляли с помощью аппарата Илизарова, который накладывали на голень, и производили остеотомию берцовых костей. Период дистракции костных фрагментов длился 28-35 дней; период фиксации продолжался до 3 месяцев.

Выделение костных фракций из костной крошки диафизов интактных собак проводили по методике, описанной ранее [3]. Водорастворимые белки диссоциативного экстракта, высаливающиеся сульфатом аммония в диапазоне насыщения >30-<50% и имеющие молекулярную массу 20-30 кД, подвергали ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-25. Для тестирования костных белков выделяли две фракции: обладающую сродством к анионообменнику (К1) и не обладающую таковым (К2).

Выделение фракций из плазмы крови 6 собак проводили на этапах дистракционного остеосинтеза аналогично получению костных фракций, начиная с осаждения белков сульфатом аммония. Были получены 2 фракции белков: С1 и С2, соответствующие идентичные по физико-химическим свойствам К1 и К2.

Влияние фракций из плазмы крови на репаративный остеогенез изучали на модели замещения дырчатых дефектов диаметром 1,9 мм, которые создавали в метафизе большеберцовой кости у 29 собак (5 серий опытов). Через 3 суток после операции животным внутривенно вводили следующие вещества: 13 мл раствора 0,15 М NaCl (1 серия опытов, контрольная, 6 собак); 13 мл плазмы крови интактного животного (2 серия опытов, 5 собак); 13 мл плазмы крови собаки с удлинением конечности со сроком дистракции 15-28 дней (3 серия опытов, 6 собак); растворы С1 (4 серия опытов, 6 собак) и С2 (5 серия опытов, 6 собак), выделенных из 13 мл плазмы крови от животных-доноров в указанный период дистракции. Наблюдение за животными длилось до 84 суток. Костеобразование в дефекте оценивали морфологическими и рентгенологическими методами исследования с денситометрией рентгенограмм. Рассчитывали процент оптической плотности центра дефекта в течение репарации

по отношению к его оптической плотности сразу после операции.

Влияние фракций из кости и плазмы крови на биохимические показатели сыворотки крови исследовали в опытах на 100 мышцах линии СВА (5 групп опытов по 20 животных в каждой). Первой, контрольной, группе животных подкожно производилась инъекция 0,2 мл 0,15 М раствора NaCl; экспериментальным группам - инъекции костных (1 мг/кг веса) и сывороточных факторов (10 мг/кг веса). До инъектирования и 24 ч спустя у животных определяли рН и содержание ионизированного кальция сыворотки крови из хвостовой вены животных. Остальные биохимические показатели определяли в сыворотке крови, собранной после декапитации животных, которую проводили через 24 ч после инъекции. Содержание общего кальция, магния, щелочной и кислой фосфатаз в сыворотке крови определяли с помощью наборов реактивов LaChema, Чехия. Определение термолabileй щелочной фосфатазы проводили после инактивации по методу [12]. Концентрацию ионизированного кальция и рН определяли с помощью микроанализатора ОР-270 фирмы Radelkis, Венгрия. Содержание фракций гидроксипролина определяли методом [2].

Влияние фракций на гемопоэз изучали в опытах на 30 мышцах линии СВА (5 групп опытов по 6 животных в каждой). Первой, контрольной, группе животных подкожно производилась инъекция 0,2 мл 0,15 М раствора NaCl; экспериментальным группам - инъекции костных фракций (1 мг/кг веса) и фракций из плазмы крови (10 мг/кг веса). До инъектирования и 48 ч спустя у животных исследовали периферическую кровь на количество эритроцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов в единице объема и формулу белой крови. После эвтаназии через 2 суток после введения готовили и окрашивали мазки-отпечатки селезенки и костного мозга метафизов бедренной кости животных.

Результаты подвергали статистической обработке с использованием непараметрического критерия U Вилкоксона - Манна - Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение фракций из плазмы крови животных-доноров на этапах ЧКДО показало, что максимальная концентрация фракции С1 в плазме крови наблюдалась во 2-й половине дистракции и первого месяца фиксации (Рис.1). Как было установлено ранее, цельная плазма животных, находящихся именно на этом перио-

де ЧКДО, способна вызывать истинный моноцитоз [14]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что как К1, так и С1 вызывали моноцитоз и уменьшение количества ретикулоцитов в периферической крови и стимуляцию моноцитопоэза в костном мозге (Табл.1). Денситометрия рентгеновских снимков в опытах по

влиянию фракций на репаративный остеогенез показала, что С1 стимулировала возмещение спицевых дефектов в сравнении как с инъекцией 0,15 М NaCl, так и с инъекцией плазмы интактного животного (Табл.2). Репарация после введения С1 отличалась выраженной стадией резорбции (Табл.3). Фаза резорбции была выраженной и после инъекции цельной плазмы, полученной от животных-доноров во второй половине distraction (124,1±6,2%).

Аналогичный эффект - наличие резорбтивной фазы - был получен у одной из костных фракций, входящих в К1, в опытах по замещению дефекта малоберцовой кости кролика [3]. Как К1, так и С1 повышали содержание общего, белкового и свободного гидроксипролина в сыворотке крови мышей через 24 ч после инъекции (Табл.4). Известно, что эти результаты являются следствием повышения скорости распада коллагена в соединительной ткани [7]. Как мы полагаем, именно костная ткань при резорбтивных процессах, происходящих после введения фракций К1 и С1, является источником продуктов деградации коллагена. Нами было обнаружено увеличение активности щелочной фосфатазы за счет ее термолabileй фракции (Рис.2). Известно, что этот изофермент является маркером остеобластов. Однако мы полагаем, что полученный эффект обуславливается не повышением синтеза или секреции этого энзима, а результатом деградации костного матрикса вследствие деструкции скелетной ткани.

Известно, что стимуляция моноцитопоза и активация клеток системы моноцит-макрофаг является необходимым звеном репаративного остеогенеза [14]; во-первых, остеокластическая резорбция ведет к дополнительному поступлению в кровеносное русло депонированных в костной ткани рострегулирующих факторов, во-вторых, есть основания полагать, что именно монокин(ы) играет роль фактора сопряжения костеобразования и резорбции [10]. Полученные результаты дают нам основание полагать, что стимулятор(ы) моноцитопоза, присутствующий как в К1, так и в С1, обуславливает репаративные свойства как этих фракций, так и плазмы, полученной от животных во второй половине distraction [9].

В отличие от С1 и К1, вызывавших ретикулоцитопению, С2 и К2 увеличивали количество ретикулоцитов в периферической крови и эритроидных клеток в селезенке (Табл.1). Способность фракции С2 вызывать ретикулоцитоз в периферической крови животных-реципиентов была отмечена ранее и рекомендована вследствие высокой информативности в качестве биотеста для оценки активности репаративного остеогенеза [1]; причем максимальный ответ

вызывала фракция из плазмы крови животных в первой половине distraction. Именно в этом периоде нами была зарегистрирована максимальная концентрация С2 в плазме крови (Рис.1).

Один из белков, входящих в К2, в ранее проведенных экспериментах стимулировал репарацию малоберцовой кости кролика без выраженной фазы резорбции [3]. В опытах по репарации спицевых дефектов С2 стимулировала их заживление также без стадии резорбции, присущей С1 и цельной плазме, взятой у животных во второй половине distraction (Табл.2, 3). Это обусловлено, как мы полагаем, соотношением концентраций С1 и С2 в плазме крови животных на данном периоде ЧКДО (Рис.1). Как К2, так и С2 вызывали понижение концентрации свободного гидроксипролина при повышении отношения "пептидосвязанный гидроксипролин / свободный гидроксипролин" в сыворотке крови мышей (Табл.4), что свидетельствует об угнетении распада коллагена и активации фибриллогенеза в соединительной ткани [7]. Возможно, что механизмы этих процессов включают супрессию остеокластов, поскольку для фракции С2 нами было обнаружено понижение активности тарtrat-резистентной кислой фосфатазы в сыворотке крови, являющейся маркером этих клеток (Рис.2). Стимуляция моноцитопоза фракциями К2 и С2 (Табл.1) не препятствовала оказанию ими монофазного стимулирующего эффекта на костную репарацию.

Таблица 1.  
Некоторые показатели кроветворения у мышей, % от исходных значений

Тестируемая фракция	Периферическая кровь		Эритроидные клетки селезенки	Моноциты костного мозга
	Ретикулоциты	Моноциты		
К1	76,9±9,9*	370±81*	128±22	391±21*
К2	176±17*	225±23*	145±22*	297±35*
С1	64,9±9,2*	199±30*	128±27	191±7*
С2	370±93*	186±50*	325±129*	209±13*

\*Результаты отличаются от дооперационных с  $P_u < 0,05$ .

Таблица 2.  
Процент оптической плотности центральной части спицевого дефекта

Срок после операции, сут.	Группа опытов				
	1	2	3	4	5
0	100	100	100	100	100
14	98,2±5,4	97,3±5,2	96,1±6,1	95,3±5,7	96,0±5,3
28	93,3±6,2	95,1±5,9	88,3±5,9	85,3±5,3	90,2±7,0
42	90,5±7,0	92,3±6,7	71,4±7,2*	69,3±6,3*	76,3±6,4
56	83,3±6,2	82,3±6,5	64,2±5,8*	60,2±7,4*	71,2±7,0
70	83,4±7,3	81,4±6,7	44,4±6,2*	42,2±6,1*	62,1±6,7*
84	79,3±6,5	78,1±6,2	40,1±7,3*	35,3±5,2*	49,4±5,4*

\*Результаты отличаются от дооперационных с  $P_u < 0,05$ .

Таблица 3.

Диаметр спицевого дефекта у собак, мм

Группа опытов	Количество суток после операции						
	0	14	28	42	56	70	84
1	2,04±0,09	2,06±0,07	1,97±0,04	1,92±0,08	1,91±0,08	2,02±0,10	1,92±0,09
2	1,92±0,08	2,00±0,09	1,94±0,10	2,01±0,07	1,97±0,09	1,95±0,11	1,98±0,12
3	1,94±0,06	2,03±0,08	2,01±0,07	2,42±0,12*	2,21±0,10*	2,25±0,17	2,32±0,18*
4	1,99±0,06	2,10±0,08	2,05±0,10	2,60±0,15*	2,25±0,13*	2,32±0,12*	2,40±0,23*
5	2,00±0,07	1,78±0,12	1,93±0,07	2,02±0,12	2,02±0,07	1,96±0,10	1,88±0,12

\*Результаты отличаются от контрольных с  $P_u < 0,05$ .

Все четыре тестированные фракции увеличивали уровень ионизированного кальция сыворотки крови у интактных животных (Табл.5), не влияя на концентрацию общего кальция, за исключением фракции С2, которая даже уменьшала последний. Известно, что увеличение уровня ионизированного кальция является результатом гипоальбуминемии [5]; однако нами не было обнаружено достоверных изменений в белковом спектре сыворотки крови интактных мышей через 24 ч после инъекции любой из фракций. Кроме того, все четыре фракции вызвали достоверное увеличение рН к этому сроку (Табл.5). Возможно, что в механизмах этих процессов участвует паратирин-зависимый каскад изменений кислотно-щелочного баланса, приводящего к перераспределению пулов органических кислот, являющихся как буферными системами, так и хелаторами двухвалентных ионов.

Таблица 4.

Содержание фракций гидроксипролина в сыворотке крови мышей, мкмоль/л

	Общий	Белково-связанный	Пептидно-связанный (ПСО)	Свободный (СО)	ПСО/СО
Интактные	61,7±3,3	35,3±4,4	10,8±2,7	15,7±2,4	0,688
Контроль	64,6±4,8	36,8±3,9	11,0±3,3	16,8±2,9	0,655
К1	95,3±4,7*	48,6±4,2*	23,6±3,3*	23,1±2,1*	1,022
К2	71,1±3,9	41,7±5,3	18,7±2,7*	10,7±2,2*	1,748
С1	106,4±5,2*	67,5±5,8*	13,6±2,9	25,3±2,4*	0,538
С2	69,4±4,9	45,3±5,1	15,4±2,7*	8,4±1,7*	1,833

\*Результаты отличаются от контрольных с  $P_u < 0,05$ .

Таблица 5.

рН и концентрация ионизированного кальция в сыворотке крови мышей

	Концентрация ионизированного кальция в плазме крови, ммоль/л		рН сыворотки крови	
	исходная величина	после инъекции	исходная величина	после инъекции
Конт-роль	0,442±0,025	0,464±0,052	7,363±0,006	7,362±0,019
К1	0,438±0,027	0,515±0,036*	7,373±0,005	7,484±0,019*
К2	0,451±0,033	0,534±0,034*	7,376±0,007*	7,483±0,034*
С1	0,445±0,031	0,525±0,027*	7,368±0,005	7,440±0,020*
С2	0,440±0,045	0,519±0,024*	7,357±0,007	7,454±0,003*

\*Результаты отличаются от контрольных с  $P_u < 0,05$ .

Таблица 6.

Концентрация электролитов в сыворотке крови мышей

	хлориды, ммоль/л	магний, ммоль/л	фосфаты, ммоль/л	кальций, ммоль/л
Контроль	90,3±4,2	0,581±0,051	2,181±0,137	2,388±0,029
К1	105,3±4,7	0,582±0,015	2,313±0,208	2,336±0,293
К2	89,1±4,7	0,678±0,051	1,583±0,182*	2,133±0,328
С1	96,4±3,2*	0,581±0,028	2,165±0,223	2,166±0,197
С2	91,6±3,4	0,554±0,034	1,958±0,171	1,849±0,169*

\*Результаты отличаются от контрольных с  $P_u < 0,05$ .

Общие черты в действии рассмотренных фракций из костной ткани и плазмы крови с одинаковыми физико-химическими свойствами свидетельствуют о присутствии общих эфферторов, действующих на кроветворение и остеогенез. Возможно, что в их число входят монокины, полипептидные факторы роста семейства трансформирующего фактора роста-бета, способные синтезироваться и сорбироваться [15] в костной ткани и активно участвовать в процессах ремоделирования кости. Дальнейшее выяснение природы и создание экспресс-методов регистрации костных факторов в сыворотке крови, как мы полагаем, существенно будут способствовать определению регенеративного статуса ортопедо-травматологических больных, а также созданию фармпрепаратов для его своевременной коррекции.

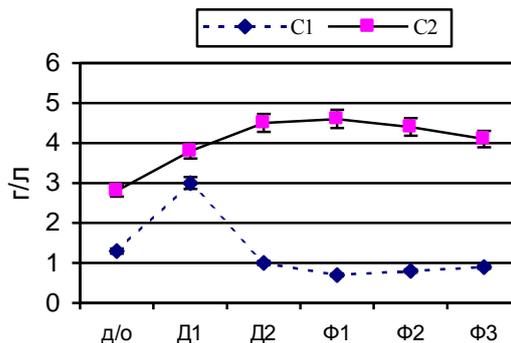


Рис.1. Содержание фракций в сыворотке крови собак. Обозначения: д/о – до операции; Д1 – 1-я половина distraction; Д2 – 2-я половина distraction; Ф1 – 1-й месяц фиксации; Ф2 – 2-й месяц фиксации; Ф3 – 3-й месяц фиксации.

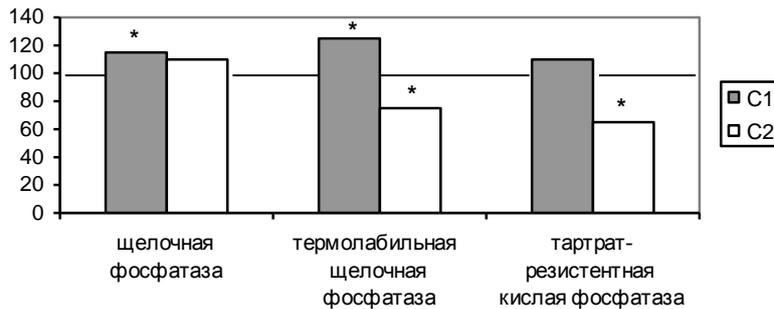


Рис. 2. Активность ферментов в сыворотке крови мышей, % от контрольных значений.

\* Результаты отличаются от контрольных с  $P_u < 0,05$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Оценка течения репаративного остеогенеза: Метод. рекомендации; / ВКНЦ «ВТО»; Сост.: Ю.П. Балдин, К.С. Десятниченко-Курган, 1991. - 24с.
2. Биохимические методы оценки тяжести эндогенной интоксикации у больных с термическими ожогами: Инструктивно-методическое письмо. /Сост.: Р.И.Лифшиц, И.А. Волчегорский, В.Е. Рябинин и др. - Челябинск, 1988. - 17 с.
3. Влияние белковых рострегулирующих факторов внеклеточного матрикса костной ткани на репаративный остеогенез и кроветворение / К.С. Десятниченко, Ю.П. Балдин, А.Н. Дьячков и др. // Цитология. - 1989. - Т.31, N 9. - С.92.
4. Влияние высокомолекулярной фракции неколлагенового белка костной ткани на остеогенез и кроветворение при удлинении конечности в эксперименте/ К.С. Десятниченко, Ю.П. Балдин, А.А. Шрейнер и др. // Вопр.мед.химии. - 1987. -Т.33, Вып.1. - С.79-84.
5. Герасимов А.М., Фурцева Л.Н. Биохимическая диагностика в травматологии и ортопедии. - М.: Медицина, 1986. - 240 с.
6. Десятниченко К.С., Балдин Ю.П. Физико-химические свойства неколлагеновых белков органического матрикса костной ткани // Тез.докл. V съезда травматологов-ортопедов респ.Закавказья. - Ереван, 1984. - С.153-155.
7. Диагностическое значение анализа показателей обмена коллагена / П.Н. Шараев, Н.С. Стрелков, Ж.С. Афсари и др. // Клини. лаб. диагностика. - 1997. - N.6. - С.48.
8. Дунаев П.В., Соловьев Г.С. Влияние сыворотки крови животных с травмой органов скелета на процессы остеогенеза в имплантатах эмбрионального хряща // Дифференцировка клеток в гисто- и органогенезах: // Материалы III Всесоюзного симпозиума. - Киев, 1975. - С.112-116.
9. Лепехова Н.П. Биохимические показатели в оценке гуморальных влияний на репаративную реакцию кости : Автореф.дис...канд.биол.наук / АН Узбекской ССР, Ин-т биохимии. - Ташкент, 1979. - 18 с.
10. О механизме сопряжения резорбции и новообразования костной ткани на уровне действия местных рострегулирующих факторов / К.С. Десятниченко, Ю.П. Балдин, А.Н. Дьячков и др. // Современные аспекты чрескостного остеосинтеза по Илизарову: Материалы науч.конф. - Казань, 1991. - С.158-159.
11. Соловьев Г.С., Колпаков В.В. Дифференцировка костномозговых клеток под влиянием остеопозитической сыворотки // Материалы VII науч.-техн.конф.молодых ученых специалистов Тюмени. - Тюмень, 1973. - С.174-176.
12. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. - София: Медицина и физкультура. - 1968. - 1064 с.
13. Эпштейн М.Э. Регенерационные вещества в крови и сыворотке, способствующие заживлению повреждений и ран, их теоретическое и практическое значение // Новый хирургический архив. - 1925. - Т.6, кн.4. - С.449-456.
14. Ястребов А.П., Осипенко А.В. Система крови и регенерация костной ткани. - Свердловск: изд-во Урал.ун-та, 1990. -124с.
15. Accumulation, localization and compartmentation of transforming growth factor during endochondral bone development / J.L. Carrington, A.V. Roberts, K.C. Flanders et al. // J.Cell. Biol. - 1988. - Vol.107. - P.1969-1975.
16. Urist M.R., Strates B.S. Bone morphogenetic protein // J.Dental Res. - 1971. - Vol.50, N.6. - Part.1. - P.1392-1406.

Рукопись поступила 17.12.97.