

ЛИТЕРАТУРА

1. Илизаров Г.А., Шрейнер А.А. Новый метод закрытой флекссионной остеоклазии // Ортопед. травматол. -1979. - № 1. -С.9-14.
2. Межклеточная адгезия и внеклеточный матрикс. / Б.Алберте, Д.Брей, Дж.Льюис и др. // Молекулярная биология клетки: В 5-ти т. - Т. 3.- Пер. с англ. -М.: Мир, 1987. -С.201-243.

Рукопись поступила 15.11.92.

© Коллектив авторов, 1995

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕССА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ КОСТЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Ю.П.Балдин, К.С.Десятниченко, А.М.Аранович, Л.С.Кузнецова, С.П.Изотова, Н.М.Клюшин

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)

Предпринята попытка для оценки течения репаративного остеогенеза у больных остеомиелитом, излечиваемых посредством чрескостного остеосинтеза по Илизарову, использовать биотестирование фракции белков сыворотки этих больных на лабораторных животных, заключающееся в оценке изменения гематологических показателей животного - реципиента этой фракции. Результаты биотестирования сравниваются с традиционными биохимическими тестами, применяемыми в лабораторной диагностике нарушений опорно-двигательного аппарата.

Ключевые слова: кость, остеомиелит, лабораторная диагностика, неколлагеновые белки.

Гематология в настоящее время переживает период внедрения новых методов лабораторных и клинических исследований, пересмотра основных положений генеза кроветворных клеток. Наиболее характерной чертой современных исследований является изучение процессов, происходящих в организме на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

Тесная взаимосвязь гематологии и биохимии с рядом других наук предоставила возможности для разработки новых способов лабораторного контроля за течением репаративного остеогенеза и его прогноза.

В отличие от использующихся в настоящее время методов, где также определяют в крови количество белков костной ткани или их дериватов, предлагаемый способ более информативен и специфичен, так как включает в себя оценку биологической активности выделенных из сыворотки (плазмы) крови полипептидов, обладающих физико-химическими свойствами белков костной ткани [1].

Известно, что в крови больных и экспериментальных животных с активно текущим репаративным остеогенезом появляется фактор, стимулирующий костеобразование у реципиентов при парэнтеральном введении [2,3].

Однако, действующее начало этой сыворотки в чистом виде не было получено, а использование цельной сыворотки крови имеет целый ряд недостатков. Кроме стимулирующего фактора сыворотка может содержать противо-

положно действующие вещества, частично или полностью гасящие его эффект, введение цельной ксеногенной сыворотки вызывает значительную нагрузку на иммунную систему реципиента. Помимо тканеспецифических регуляторов в сыворотке могут быть и другие биологически активные вещества (гормоны, витамины, нейромедиаторы, циклические нуклеотиды и т.д.), оказывающие неспецифическое влияние на пролиферацию и дифференцировку клеток. Нами приведены доказательства возможности идентичности фактора сыворотки неколлагеновому белку костной ткани, обладающему теми же свойствами и поступающему в кровь при повреждении кости и дистракции костного регенерата [4].

В выполненных ВКНЦ «ВТО» в 1979 году исследованиях была показана роль неколлагеновых белков костной ткани в поддержании тканевого гомеостаза кости и крови [4,5,6,7], и установлено, что мишенями действия ингибитора и стимулятора пролиферации являются не только остеогенные клетки, но и кроветворные, что подтверждает положение Г.А.Илизарова о единстве морфогенеза кости и крови на основе общих клеточных источников и общей регуляции [4,5,8].

Учитывая приведенные данные, в 1984 году мы для оценки активности репаративного остеогенеза использовали влияние белковой фракции сыворотки крови, обладающей свойствами эритропоэтинподобного стимулято-

ра остеогенеза, от больных после операций на опорно-двигательном аппарате на красное кроветворение животных - реципиентов.

Кровь для биохимических исследований и биотестирования на животных получали венепункцией в гепаринизированные пробирки по 4-5 мл. Плазму отделяли центрифугированием. Для биотестирования выделяли фракцию, осаждающуюся при 50% насыщении сульфатом аммония и не проявляющую сродства к ДЭАЭ-целлюлозе. Раствор фракции по 0,4 мл вводили подкожно белым мышам (1 мг/мл в 0,15М NaCl), измеряя у них до введения и через 48 часов после него уровень ретикулоцитов в периферической крови. Второе измерение выражали в процентах от первого.

Контрольные животные получали тот же объем раствора хлорида натрия. В качестве реципиентов использовали 142 животных.

Мазки для подсчета ретикулоцитов окрашивали суправитально раствором бриллиантового крезидового синего в абсолютном этаноле 1 г / 100 мл. В качестве реципиентов брали по 2 мыши на одного больного во все сроки исследования; при этом учитывали средние данные.

После рождения у человека и большинства млекопитающих эритропоэз в селезенке прекращается, но у мелких грызунов (крыс, мышей) селезенка и во взрослом состоянии сохраняет свою способность участвовать в кроветворении [9]. Известно также, что для мышей существуют суточные ритмы изменений показателей системы крови, поэтому у всех животных гематологические исследования проводились в одно время суток в 14-15 часов. При забое животных через 48 часов готовили мазки - отпечатки селезенки, которые окрашивали по Паппенгейму, после чего подсчитывали спленоцитомиелограммы (не менее 500 клеток в каждом препарате).

Под наблюдением находилось 11 пациентов с дефектами костей голени и бедра, осложненными хроническим посттравматическим остеомиелитом свищевой формы. Возраст пациентов от 20 до 57 лет. Величины дефектов

на бедре и на голени составляли от 5 до 17 см и в процентном отношении к неповрежденному сегменту соответствовали друг другу. С клинических позиций местные условия для регенерации были равноценны. В обеих группах применялись аналогичные методики чрескостного остеосинтеза по Илизарову.

В таблице 1 приведены значения трех показателей, использованных для сравнения с клинико-рентгенологической оценкой активности остеогенеза.

Один из показателей - активность термоллабильной щелочной фосфатазы (ТЛЩФ) - считается маркером активности остеобластов [10]; величина другого - системного индекса электролитов (СИЭ) - равна отношению произведения эквивалентных концентраций кальция и хлоридов к содержанию неорганического фосфата и связана с функциональным состоянием гормональной системы, контролирующей как гомеостаз целостного организма, так и скелетный гомеостаз - динамическое равновесие между резорбцией и новообразованием костной ткани. Проведенные нами ранее исследования в эксперименте и в клинике при лечении переломов, удлинении голени при ахондроплазии показали, что этот индекс увеличивается по сравнению с физиологическим уровнем в начальной (катаболической) фазе репаративного процесса и уменьшается в анаболической [5].

В таблице приведена динамика и величины биотеста в обеих группах на этапах лечения. Для повышения репрезентативности анализируемых выборок выделено 5 таких этапов: а) преддистракционный период; б) 1-я половина дистракции; в) 2-я половина дистракции; г) 1-я половина фиксации; д) 2-я половина фиксации.

Следует отметить, что в группе с повреждением бедра исходная величина биотеста была ниже, чем при повреждениях большеберцовой кости. У двух из пяти больных этой группы фракции сыворотки крови даже снижали исходный уровень ретикулоцитов в крови мышей-реципиентов. Вероятно, это связано с наличием в ней ингибиторов эритропоэза.

Таблица 1.
Значение активности термоллабильной щелочной фосфатазы (ТЛЩФ), системного индекса электролитов (СИЭ) и биотеста при лечении остеомиелита

Биотест при лечении остеомиелита бедренной кости				Биотест при лечении остеомиелита большеберцовой кости			
Этап удлинения бедра n = 5	ТЛЩФ	СИЭ	БИОТЕСТ	Этап удлинения голень n = 6	ТЛЩФ	СИЭ	БИОТЕСТ
До операции	3,65 ± 0,77	156,0 ± 16,8	102,4 ± 9,0	До операции	1,41 ± 0,01	153,1 ± 12,6	127,0 ± 6,0
Преддистракци онный период	3,84 ± 0,53	<u>200,0 ± 16,0</u>	<u>122,6 ± 9,6</u>	Преддистракци онный период	<u>3,62 ± 0,91</u>	159,9 ± 27,5	116,1 ± 6,6
1-я половина дистракции	4,55 ± 0,35	173,7 ± 5,7	<u>233,5 ± 31,0</u>	1-я половина дистракции	<u>4,50 ± 0,42</u>	176,6 ± 30,4	<u>206,3 ± 23,4</u>
2-я половина дистракции	4,66 ± 0,99	191,2 ± 18,8	<u>232,2 ± 41,2</u>	2-я половина дистракции	<u>4,03 ± 0,3</u>	162,0 ± 11,6	<u>230,9 ± 21,7</u>
1-я половина фиксаци	5,30 ± 0,93	188,2 ± 18,9	<u>199,9 ± 21,9</u>	1-я половина фиксаци	<u>4,52 ± 1,3</u>	<u>213,1 ± 14,4</u>	<u>161,2 ± 11,3</u>
2-я половина фиксаци	5,35 ± 1,52	194,4 ± 31,0	119,2 ± 4,2	2-я половина фиксаци	3,46 ± 0,04	208,0 ± 6,9	120,0 ± 5,0

Примечание: Подчеркнуты результаты, отличающиеся от дооперационного с уровнем не менее $P \leq 0,05$.

Из исследованных нами ранее рострегулирующих факторов внеклеточного матрикса кости две фракции действительно обладали таким свойством, но обе были полианионитами. Динамика биотеста в обеих группах больных имеет значительное сходство, хотя можно отметить, что при поражении бедра исследуемая реакция развивается более интенсивно, биотест раньше достигает максимума (230% от дооперационного периода), менее критически падает до минимального значения во 2-й половине периода фиксации. Известно, что ретикулярная строма селезенки состоит из ретикулума. Во взрослом организме ретикулум представляет собой остаток эмбриональной мезенхимы. Из недифференцированных элементов последней, а в современном представлении - из родоначальных (стволовых) клеток, в результате их рециркуляции, возможно, развиваются самые различные клеточные элементы как лимфатического, так и миелоидного и эритробластического ряда [11].

В связи с этим мы исследовали спленограммы мышцей, особо обращая внимание на спленограмму реципиентов с высоким уровнем количества ретикулоцитов в периферической крови.

У контрольной группы мышцей (10 животных), которым внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в той же дозе при анализе мазков - отпечатков селезенки, элементы эритроидного ряда всех степеней зрелости составляли не более 12,2%.

Среди элементов лимфоидного ряда преобладали средние лимфоциты, от 52 до 60%. Количество ретикулоцитов достоверно не изменялось.

В тот же срок определялись значительные изменения в мазках-отпечатках селезенки при введении белковой фракции: возрастало число малых лимфоцитов и лимфобластов - крупных клеток с круглым или овальным ядром и базофильной цитоплазмой, наблюдалось увеличение числа ретикулярных клеток.

Были обнаружены и ограниченные очаги эритропоэза. Элементы эритроидного ряда возрастали в среднем до 24% ($p \leq 0,05$).

Обращает внимание следующее различие: у больных с дефектом костей голени закрытие свищей, как правило, происходило на протяжении первых месяцев фиксации аппаратом, тогда как при замещении дефектов бедра прекращение остеомиелитического процесса происходило на месяц раньше и соответствовало периоду окончания distraction.

При осложненных остеомиелитом дефектах бедра представляют интерес данные по продолжительности периода фиксации, который был продолжительнее времени фиксации при неосложненных дефектах бедренной кости, но существенно короче периода фиксации при осложненных остеомиелитом дефектах костей голени.

Таким образом, наш клинический материал указывает на то, что средние сроки замещения дефектов бедренной кости в условиях хронической гнойной инфекции значительно короче сроков замещения аналогичных дефектов костей голени. Кажущееся на первый взгляд противоречие может быть объяснено более активным и поэтому более быстрым по времени течением репаративного процесса в бедренном сегменте за счет лучших условий функции его микроциркуляционного русла.

У всех больных с началом лечения отмечалась тенденция к стиханию остеомиелитического процесса. Закончили лечение все 11 больных. К снятию аппарата свищи у всех закрылись. Антибактериальная терапия применялась у одного больного. Биохимические и гематологические показатели подтверждали характер рентгенологического и клинического формирования регенерата, но по времени опережали последние в среднем на 1,5-2 недели. У всех больных при снятии аппарата клинически и рентгенологически определялось прочное костное сращение. Следовательно, перечисленные показатели у наших больных могут быть использованы в клинике как вспомогательные критерии оценки, контроля и прогнозирования репаративного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Десятниченко К.С., Балдин Ю.П. Реализация эффекта Илизарова на молекулярном уровне // Метод Илизарова: теория, эксперимент, клиника: Тез. докл. Всесоюзн. конф... - Курган, 1991. - С. 271-273.
2. Соловьев Г.С., Колпаков В.В. Гистохимическая характеристика дифференцировки остеобластических элементов под влиянием стимуляторов остеогенеза // Тез. 4 Тюменской обл. науч. конф. по химии и физ.-хим. проблемам в нефтегазовой пром., биологии и медицине. - Тюмень, 1973. - С. 44-45.
3. Филимонов В.И., Лепехова Н.П., Недоспасов О.В. О гуморальных механизмах регуляции репаративного остеогенеза // Бюл. эксперим. биол. - 1977. - № 12. - С. 725-727.
4. Молекулярные аспекты активирующего влияния на остеогенез distractionного остеосинтеза / Г.А.Илизаров, К.С.Десятниченко, Ю.П.Балдин, С.П.Изотова // Проблемы чрескостн. остеосинтеза в ортопедии и травматологии: Сб. науч. трудов КНИИЭКОТ. - Вып. 8. - Курган, 1982. - С. 105-112.
5. Илизаров Г.А., Ирьянов Ю.М., Балдин Ю.П. Особенности репаративного остеогенеза при стимуляции гемопоэза // Чрескостн.-компресс.-дистракц. остеосинтез в травматол. и ортопедии: Сб. науч. трудов КНИИЭКОТ. - Вып. 11. - Курган, 1986. - С. 3-8.

6. Десятниченко К.С., Балдин Ю.П. Физико-химические свойства неколлагеновых белков органического матрикса костной ткани // Съезд травматологов-ортопедов республик Закавказья, 5-й: Тез. докл. - Ереван, 1984. - С. 153-154.
7. Выделение и биотестирование костных рострегулирующих факторов: Метод. рекомендации / Сост.: К.С. Десятниченко, Ю.П. Балдин, А.Н. Дьячков. - Курган, 1990. - 23с.
8. К вопросу об участии стромальных клеток предшественников костного мозга в регенерации кости при чрескостном остеосинтезе / Г.А.Илизаров, Л.А.Палиенко, П.Ф.Переслыцких и др. // Бюл. эксперим. биол. - 1980. - № 4. - С. 489-490.
9. Селезенка и эритропоэз / Р.А.Дымшиц, Ю.П.Балдин, С.А.Гланц и др. // Успехи физиол. наук. - 1973. - Т. 4, № 3. - С. 113-133.
10. Moss D.W. Multiple forms of alkaline phosphatase: Some topics of current interest // Histochem. J. - 1974. - Vol. 6, N 4. - P. 159-164.
11. Абрамов М.Г. Гематологический атлас. - М.: Медицина, 1979. - 280 с.

Рукопись поступила 12.07.93.

© К.С.Десятниченко, Ю.П.Балдин, 1995

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ КОНЦЕПЦИЮ Г.А.ИЛИЗАРОВА О ЕДИНСТВЕ ГЕНЕЗА КОСТНОЙ И КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНЕЙ

К.С.Десятниченко, Ю.П.Балдин

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 настоящей работе сообщается о результатах проводимых авторами многолетних исследований физико-химических и биологических свойств неколлагеновых белков костной ткани, активно воздействующих на физиологическую и репаративную регенерацию костной, кроветворной и лимфоидной тканей. Способность кости депонировать эти соединения и освобождать их в определенных условиях в систему циркуляции определяет роль скелета как ауто- и паракринного органа. Наличие для одних и тех же рострегулирующих факторов клеток-мишеней среди предшественников остеогенеза и кроветворения подтверждает концепцию Г.А.Илизарова о единстве генеза кости и крови.

Ключевые слова: остеогенез, кроветворение, местные факторы роста.

Г.А.Илизаров, осмысливая первые результаты применения созданного им способа чрескостного остеосинтеза, пришел к выводу, что они обеспечиваются в первую очередь оптимальным сочетанием факторов механической и биологической природы. Именно развивая этот вывод, он пришел к открытию таких общебиологических закономерностей, как стимуляция напряжением растяжения регенерации и роста тканей и зависимость формообразовательных процессов от адекватности кровоснабжения и нагрузки [1,2,3].

Одним из важнейших биологических аспектов влияния чрескостного остеосинтеза по Г.А.Илизарову является его воздействие на механизм регуляции пролиферации и дифференцировки остеогенных и кроветворных клеток, исходя из предпосылки об общности остеогенеза и кроветворения на основе общих клеточных источников и регуляции развития [4, 5]. В этом отношении Гавриил Абрамович стоял на позициях выдающегося русского гистолога А.А.Максимова, создавшего учение о едином камбии для всех клеток внутренней среды в постнатальном онтогенезе - лимфоцитоподоб-

ной стволовой клетке, родоначальнице не только кроветворных клеток, но и фибробластов [6].

В настоящее время нет единства во взглядах на существование в постнатальном периоде общей клетки-родоначальницы для костной и кроветворной тканей. Унитарная теория кроветворения [7], созданная, кстати сказать, на основе гипотезы А.А.Максимова, предполагает наличие полипотентной стволовой кроветворной клетки. На наш взгляд, терминологически это является нонсенсом: если это кроветворная клетка, то уже не стволовая. Стволовой клеткой, без сомнения, следует считать недифференцированную мезенхимальную клетку, дающую начало всем росткам соединительной ткани в эмбриональном периоде онтогенеза. Утверждения о постнатальной независимости гистогенезов кости и крови [8,9], основанные главным образом на экспериментах по восстановлению кроветворения облученных животных (радиохимер) и *in vitro* не могут считаться абсолютно доказательными. С другой стороны, не создают впечатления завершенности и морфологические исследования, доказывающие, что эндостальные клетки костного мозга представляют собой фиксированные тотипотентные стволовые клетки,