

Оригинальные статьи

© В.И. Шевцов, Ю.М. Ирьянов, 2000

Применение метода эритрограмм для изучения процесса кроветворения в условиях индукции костеобразования и миелогенеза

В.И. Шевцов, Ю.М. Ирьянов, Н.В. Петровская

Use of the erythrogram method to study hemopoiesis process in the conditions of osteogenesis and myelogenesis induction

V.I. Shevtsov, Y.M. Irianov, N.V. Petrovskaya

Государственное учреждение науки

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

У взрослых собак вызывали индукционное костеобразование путем введения в костно-мозговой канал большеберцовых костей костного минерала, лишённого органических компонентов. При помощи методов световой микроскопии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии и метода эритрограмм установлено, что индукционное костеобразование в костно-мозговой полости сопровождается миелогенезом, появлением дополнительных очагов кроветворения, активизацией процессов кроветворения и омоложением эритроцитарной клеточной популяции.

Ключевые слова: индукция костеобразования, миелогенез, стимуляция кроветворения, электронная микроскопия, эритрограммы.

Induction osteogenesis was produced in adult dogs by infusion of bone mineral free of organic components into tibial medullary canals. Using methods of light microscopy, transmission and scanning electron microscopy, it was established, that induction osteogenesis in medullary cavity was accompanied by myelogenesis, the occurrence of additional hemopoietic foci, activation of hemopoietic processes and rejuvenescence of erythrocytic cellular population.

Keywords: osteogenesis induction, myelogenesis, hemopoiesis stimulation, electron microscopy, erythrograms.

Существует тесная взаимосвязь между репаративным костеобразованием и процессами кроветворения [1]. Установлено, что остеогенные клетки относятся к категории клеток гемопоэтической стромы. Им принадлежит ведущая роль в обеспечении кроветворного микроокружения, стимулирующего пролиферацию и дифференцировку кроветворных плюрипотентных стволовых клеток в клетки миелоидных рядов [2].

Одним из показателей процесса кроветворения является последовательность морфологических изменений и содержание различных типов клеток крови, в том числе незрелых эритроцитов — ретикулоцитов, подсчет которых используется для оценки интенсивности эритропоэза [2].

Как известно, ретикулоциты весьма трудно идентифицировать в мазках, окрашенных обычными красителями. Для их надежного выявления необходимо предварительное суправитальное окрашивание. Численность ретикулоцитов, вышедших из костного мозга в кровь, микроскопически определить объективно и точно нелегко, а их визуальный подсчет является весьма трудоемким процессом.

Цель настоящей работы — при помощи комплекса электронно-микроскопических и цитофизиологических методик изучить качественные и количественные показатели процесса кроветворения в новообразованной миелоидной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время известен ряд агентов, обладающих свойствами индукторов остеогенеза. В частности, к ним относят переходный эпите-

лий мочевого пузыря, декальцинированный костный матрикс, измельченную в виде опилок костную ткань и др. [3, 4]. Из декальцинирован-

ного костного матрикса выделен фактор остеогенеза – морфогенетический белок кости, при имплантации которого в соединительную и мышечную ткани, а также в диффузионные камеры наблюдается образование хряща, а затем губчатой и пластинчатой костной ткани с участками костного мозга.

В наших экспериментах с целью индукции остеогенеза, новообразования кроветворной миелоидной ткани и активизации таким образом процесса кроветворения в костно-мозговой канал интактных большеберцовых костей шести взрослых собак вводили 5 мл. стерильного физиологического раствора, содержащего 250 мг. мелкодисперсной взвеси костного минерала. Последний получали из коркового слоя костей интактных собак путем мягкого удаления из него органического матрикса по оригинальной технологии. Через 19 суток после операции производили рентгенографию оперированных конечностей и эвтаназировали животных. Кровь для исследования брали путем смыва с поверхности оперированных и интактных большеберцовых костей. Затем кости распиливали вдоль и фиксировали в параформ-глутаральдегиде, заключали в эпон и исследовали при помощи световой микроскопии просветленных препаратов и полутонких срезов, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

Определение качественного состава и возраста эритроцитов, вышедших из костного мозга, нельзя осуществить только методами световой микроскопии. Для выявления молодых, только что образованных форм эритроцитов весьма удобен метод эритрограмм, предложенный И.И. Гительзоном и И.А. Терсковым [5], который позволяет с большой точностью учитывать закономерное распределение эритроцитов по группам гемолитической стойкости, которая зависит от возраста эритроцитов.

Сущность метода заключается в осуществлении фотоэлектроколориметрических измерений динамики распада эритроцитов под действием гемолитического вещества. Критерием состояния и возраста эритроцитов является их способность к гемолизу. Время действия гемолитика служит мерой стойкости клеток. Кривая распределения эритроцитов по их стойкости - эритрограмма позволяет определять количество эритроцитов определенной стойкости в момент исследования, при этом стойкость эритроцитов определяется их возрастом. Молодые, выходящие из костного мозга эритроциты, обладают наибольшей стойкостью к гемолизу, а наиболее старые эритроциты являются малоустойчивыми.

Фотоэлектроколориметрическая регистрация позволяет исключить субъективные и трудоемкие методы микроскопического исследования эритроцитов, что исключает вероятность оши-

бок, связанных с ограниченным числом исследуемых объектов. При выполнении методики получения эритрограмм число анализируемых эритроцитов составляет величину около десятка миллионов, тогда как при микроскопических методах исследованию подвергается лишь несколько сотен клеток.

В результате фотоколориметрических измерений получают ряд убывающих показаний оптической плотности, каждая из которых соответствует степени гемолиза клеток к моменту отсчета. Снижение оптической плотности взвеси эритроцитов во времени характеризует их убыль под действием гемолитического вещества и происходит до тех пор, пока не распадутся последние эритроциты.

В литературе имеется сообщение об использовании метода эритрограмм для определения гемолитической ситуации, вызывающей снижение резистентности эритроцитов, при дистракции биопротеза в костном дефекте [6]. Однако, конкретные описания методики в работе не приводятся, не упоминается и о способах поддержания постоянства температуры при выполнении данных исследований. Вместе с тем, как показали проведенные нами ранее исследования, скорость реакции гемолиза весьма чувствительна к температуре, и анализы должны проводиться при постоянной температуре [7]. Это достигается использованием специально изготовленной нами термостабилизированной фотометрической кюветы с двойными стенками, соединенной резиновыми трубками с насосом водяного ультратермостата, отрегулированным на температуру $24 \pm 0,1$ градуса (рис. 1, 2). В термостат помещают также сосуды с гемолитиком, физиологическим раствором, исследуемой кровью и пипетками, используемыми по ходу анализа. Таким путем постоянство температуры создается не только в фотометрической кювете, но и для всех веществ и инструментов, участвующих в анализе.

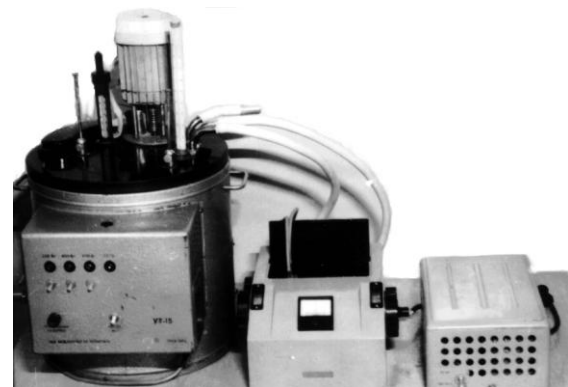


Рис. 1. Общий вид установки для получения эритрограмм

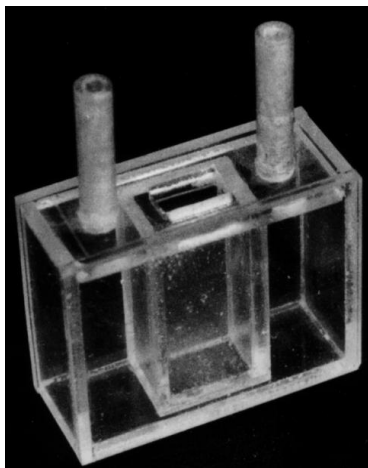


Рис. 2. Термостабилизированная фотометрическая кювета

Термостабилизированная фотометрическая кювета помещается в левое плечо фотоэлектрического колориметра, в правое плечо ставится компенсирующая кювета с дистиллированной водой для исключения возможности разогревания правого фотоэлемента теплом светового пучка. В рабочее положение вводится красный светофильтр, производится точное уравнивание световых потоков фотометрическим клином, левый отсчетный барабан устанавливается в нулевое положение, а в рабочую кювету наливается физиологический раствор. Затем поворотом фотометрических клиньев стрелка гальванометра выводится в нулевое положение. В этом состоянии установка готова к работе.

Кровь, взятая для анализа, разводится физиологическим раствором в фотометрической

кювете до стандартной концентрации эритроцитов 1:1000, которая устанавливается при помощи фотоэлектроколориметра. В качестве стандартного гемолизика используют 0,004 н. раствор соляной кислоты в физиологическом растворе.

Мерой стойкости эритроцитов является время, прошедшее от введения кислоты до распада характеризующей группы эритроцитов. Поэтому отсчет показания приборов производится через определенные интервалы времени. Удобным является 30 секундный интервал между отсчетами. Результатом анализа служит ряд значений оптической плотности, убывающий во времени в соответствии с ходом гемолиза, при этом падение оптической плотности линейно связано с числом распадающихся эритроцитов.

Распределение эритроцитов по стойкости удобно выражать в процентах. При этом за 100% принимается совокупность эритроцитов, подвергнутых анализу, что определяется разностью между первым и последним отсчетами оптической плотности. Каждая из разностей между соседними отсчетами вычисляется в процентах по отношению к этому числу, и каждая полученная величина соответствует проценту эритроцитов данной стойкости.

В графиках, изображающих распределение эритроцитов по стойкости (эритрограммах), по оси абсцисс откладывается время гемолиза, по оси ординат – процент разрушенных эритроцитов.

Полученные количественные данные обрабатывали способом вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что введение взвеси костного минерала вызывает развертывание костеобразовательных процессов во всей толще костно-мозгового канала оперированной конечности (рис. 3). Новообразованные трабекулы губчатой кости формируются эндостально и в центральных участках костного мозга. В последних они располагаются главным образом по периферии сосудистого пучка, содержащего латеральные продольные ветви питающей артерии и две продольные вены. На отдельных участках губчатая кость в виде густой мелкопетливой сети заполняет всю костномозговую полость.

В корковом слое костей в участках, примыкающих к области костеобразования, отмечается появление дополнительных сосудистых каналов, ориентированных в косо-поперечном направлении, и расширение ранее существующих гаверсовых каналов, что свидетельствует об активизации кровоснабжения в этих созданных нами дополнительных участках костеобразования.

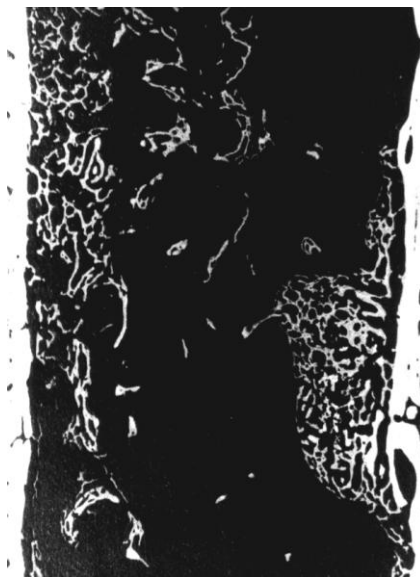


Рис. 3. Индукционное костеобразование в костномозговом канале диафиза большеберцовой кости через 19 суток после введения взвеси костного минерала. Электронная сканограмма. Увеличение 25

Образование губчатой костной ткани в костно-мозговом канале сопровождается появлением в межтрабекулярных пространствах новообразованной кроветворной миелоидной ткани с очагами кроветворения в виде эритробластических островков (рис.4). Они содержат центрально расположенные макрофаги и локализованные слоями вокруг них созревающие эритробласты, проэритроциты, ретикулоциты и зрелые эритроциты. Ретикулярные клетки в эритробластических островках при помощи своих длинных цитоплазматических отростков взаимодействуют с кроветворными клетками различной степени зрелости.

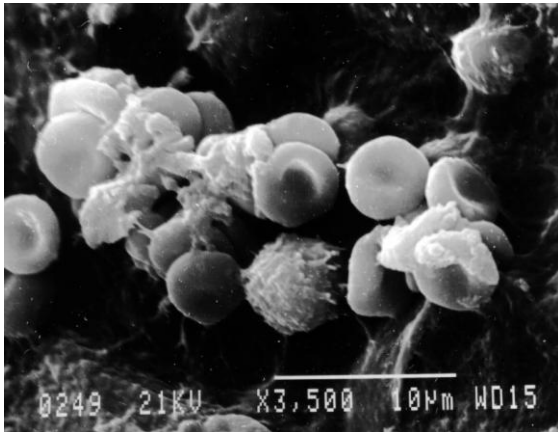


Рис. 4. Эритробластический островок в очаге кроветворения новообразованной миелоидной ткани через 19 суток после введения остеоиндуктора - взвеси костного минерала. Электронная сканограмма. Увеличение 35000

Появление дополнительных очагов кроветворения в диафизах оперированных костей вызывает заметную активизацию кроветворных процессов. Об этом свидетельствуют закономерные изменения формы полученных нами эритрограмм (рис. 5).

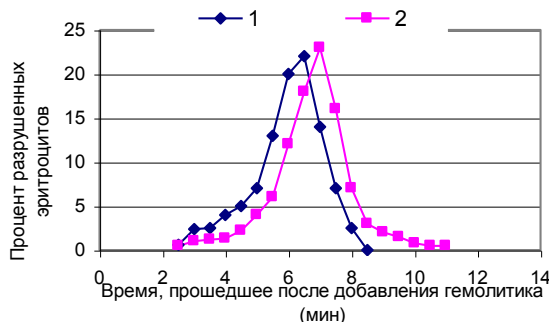


Рис. 5. Распределение эритроцитов по их резистентности и кислотному гемолизу (эритрограммы с 0,95% доверительным интервалом). 1 – гемолиз эритроцитов, взятых с поверхности интактной кости. 2 – гемолиз эритроцитов, взятых с поверхности оперированной кости через 19 суток после введения в костно-мозговой канал индуктора остеогенеза (костного минерала)

Известно, что при нормальном состоянии

взрослого организма эритрограмма строго стабильна и отражает динамическое равновесие в системе крови, обеспечивающееся в результате соответствия между деятельностью кроветворной и кроверазрушающих систем [8].

Вид эритрограммы представляет собой результирующую состояния кроветворной системы и физико-химических условий сосудистого русла. Главное отличие в действии последнего фактора, позволяющее отдифференцировать его, заключается в том, что он равномерно действует на все эритроциты и поэтому не вызывает перераспределения эритроцитов по стойкости, а дает однонаправленный сдвиг стойкости всей массы эритроцитов. Поэтому действие физико-химических факторов проявляется общим смещением эритрограммы, в отличие от изменений уровня и качества продукции эритроцитов, которые влияют на эритрограмму путем изменения соотношений между клетками различной стойкости [8].

При изменениях процесса кроветворения происходят закономерные сдвиги эритрограммы. Смещение эритрограммы влево или подъем левой ветви кривой свидетельствует об уменьшении стойкости эритроцитов в кровяном русле. Наблюдаемый нами сдвиг максимума эритрограммы вправо, подъем и растяжение правой ветви кривой свидетельствует об увеличении более чем в три раза (табл. 1) количества высокостойких молодых эритроцитов за счет усиления кроветворного процесса, протекающего в костном мозге в дополнительных очагах кроветворения.

Таблица 1.

Распределение эритроцитов по группам кислотной резистентности. А – эритроциты с поверхности интактной кости. Б – эритроциты с поверхности оперированной кости через 19 суток после введения в костно-мозговой канал индуктора остеогенеза (%)

Группы стойкости эритроцитов к кислотному гемолизу	Время гемолиза мин.	Процент разрушенных эритроцитов	
		А	Б
Эритроциты низкой стойкости	5,5 мин и менее	21,5±0,69	10,2±0,36*
Эритроциты средней стойкости	от 6,0 до 7,5 мин	69,0±2,14	59,0±1,83*
Эритроциты высокой стойкости	8,0 мин и более	9,5±0,32	30,8±0,99*

* Статистически значимые различия ($P < 0,05$).

Таким образом, в результате проведенных исследований, выполненных при помощи комплексного использования электронно-микроскопических методов и метода эритрограмм, удалось показать, что полученная нами мелкодисперсная взвесь костного минерала, лишенная каких-либо органических компонентов, не обладающая, следовательно, антигенными свойствами и не вызывающая вследствие этого реакции отторжения, является активным

индуктором остеогенеза и миелогенеза, что может найти применение в клинике в случае замедленного заживления переломов, при псевдоартрозах, а также при оптимизации процессов формирования дистракционных регенератов в целях сокращения сроков лечения больных. Индукционное костеобразование в костно-мозговой полости сопровождается миелогенезом, появлением очагов кроветворения в жировом

костном мозге в диафизах костей взрослых животных и, как следствие этого, активизацией процессов кроветворения и омоложением клеточного состава эритроидного ростка кроветворения. Этот факт заслуживает особого внимания в плане разработки новых перспективных методов лечения заболеваний, сопровождающихся нарушением процессов кроветворения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе. - Киев, Наукова думка, 1989. - 192 с.
2. Хэм А., Кормак Д. Гистология. В 5-ти томах: Т. 2. - Москва: Мир, 1983. - 254 с.
3. Канторова В.И. Эктопическая индукция костной и хрящевой тканей в диффузионных камерах у взрослых кроликов под воздействием измельченной костной ткани // Онтогенез. - 1976. - Т. 7, N 3. - С. 262-270.
4. Канторова В.И. Гетерогенность клеточных источников восстановительных процессов у позвоночных // Онтогенез. - 1985. - Т. 16, N 5. - С. 450-473.
5. Гительзон И.И., Терсков И.А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. - Красноярск, 1959. - 181 с.
6. Чепеленко Т.А., Ларионов А.А. Изменение соотношения аутобляшкообразующих клеток и эритроцитов при дистракции биопротеза в костном дефекте // Проблемы чрескостного остеосинтеза в ортопедии и травматологии: Закономерности регенерации и роста тканей под влиянием напряжения растяжения: Сб. науч. трудов КНИИЭКОТ. - Курган, 1982. - С. 99-104.
7. Лидеман Р.К., Ирьянов Ю.М. Гемолитическая стойкость эритроцитов больных шизофренией // Журнал невропатологии и психиатрии. - 1965. - Т. 65, вып. 8. - С. 1201-1205.
8. Кудряшов Ю.В. Радиобиология. - Москва, 1992. - 274 с.

Рукопись поступила 06.08.99.

Вышли из печати



**Шевцов В.И., Макушин В.Д., Аранович А.М.,
Чегуров О.К.**

Хирургическое лечение врожденных аномалий развития берцовых костей

Курган, 1998 г. — 323 с., табл. 15, ил. 209, библиогр. назв. 201

Монография посвящена проблеме лечения детей с врожденной эктромелией берцовых костей. В книге обобщен опыт лечения больных с применением методик чрескостного остеосинтеза аппаратом Илизарова в различных его рациональных компоновках. Приведены основы биомеханического моделирования остеосинтеза при некоторых клинических ситуациях. Описываются уникальные, не имеющие аналогов в мировой медицине, тактико-технологические принципы реконструкции берцовых костей, повышающие опороспособность и функциональные возможности нижней конечности. Приведенные технические сведения помогут хирургу принимать оптимальные решения в реабилитации пациентов и подготовке конечности к рациональному протезированию. Анализ возможных технологических ошибок и связанных с ними лечебных осложнений имеет важное значение для практикующего врача.

Представленные в книге исследования дают возможность клиницисту представить тяжесть развивающихся при пороке вторичных функциональных и анатомических расстройств.

Приведенные результаты лечения по методикам Российского научного центра «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова дают возможность оценить их эффективность в сравнении с традиционными хирургическими подходами в решении данной проблемы.

Книга иллюстрирована схемами остеосинтеза, клиническими примерами, способствующими усвоению представленного материала.

Монография рассчитана на широкий круг хирургов, ортопедов и педиатров.