МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР

«СОГЛАСОВАНО»
Заместитель начальника
Главного управления
научных учреждений
Н. Н. САМКО.

«8» августа 1990 г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель министра
Э. А. НОГОВИЦЫНА.

«8» августа 1990 г.

ВЫДЕЛЕНИЕ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ КОСТНЫХ РОСТРЕГУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ

Методические рекомендации
(с правом переиздания
местными органами здравоохранения)

Курган, 1990 г.

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР

«СОГЛАСОВАНО»
Заместитель начальника
Главного управления
научных учреждений
Н. Н. САМКО.
«8» августа 1990 г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель министра
Э. А. НОГОВИЦЫНА.
«8» августа 1990 г.

ВЫДЕЛЕНИЕ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ КОСТНЫХ РОСТРЕГУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ

Методические рекомендации
(с правом переиздания
местными органами здравоохранения)

Курган, 1990 г.

В методических рекомендациях приведены приемы выделения и очистки факторов, стимулирующих и тормозящих костеобразование и гемопоэз, из зрелой компактной костной ткани и способы тестирования их биологической активности. Рекомендации предназначены для биохимиков, патофизиологов, морфологов и других специалистов, работающих по проблеме регуляции остеогенеза и кроветворения.

Методические рекомендации составили: канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник **К. С. Десятниченко,** док. мед. наук, ведущий научный сотрудник **Ю. П. Балдин,** канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник **А. Н. Дьячков,** научный сотрудник **С. П. Изотова,** младшие научные сотрудники **С. Н. Лунева и Т. А. Силантьева,** ст. лаборант **О. Л. Карпенко** Курганского Всесоюзного научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» (генеральный директор член-корр. АН СССР, профессор Г. А. Илизаров).

*

I. ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших биологических аспектов влияния чрескостного остеосинтеза по Г. А. Илизарову является механизм регуляции пролиферации и дифференцировки остеогенных клеток. Выполнение в ВКНЦ «ВТО» исследований общей реакции организма на травму показало, что местные условия, создаваемые чрескостным остеосинтезом, оптимизируют течение адаптивного процесса после скелетной травмы и оперативного вмешательства на опорно-двигательном аппарате, контролируемое нейрогуморальным путем, пролонгируют продуктивную анаболическую фазу репаративного остеосинтеза (Г. А. Илизаров с соавт., 1985 г. а, 1986 г. а, б; К. С. Десятниченко с соавт., 1983, 1984 а, 1988; К. С. Десятниченко, 1988, Н. В. Офицерова, 1988).

Появление активности, стимулирующей остеогенез, в сыворотке крови человека и животных с репаративным остеогенезом (Lorin-Epsctein, 1927; Г. С. Соловьев, В. В. Колпаков, 1973; П. В. Дунаев, Г. С. Соловьев, 1975; В. И. Филимонов с соавт., 1977; Н. П. Лепехова, 1978), а также способность имплантатов декальцинированного костного матрикса индуцировать эктопический остеогенез (Urist, 1965; 1968; А. Я. Фриденштейн, К. С. Лалыкина, 1974) позволили предположить существование во внеклеточном матриксе кости веществ, возбуждающих пролиферативную активность и дифференцировку клеток-предшественников костной ткани.

В исследованиях, выполняемых в ВКНЦ «ВТО» с 1979 года также была показана роль фракций неколлагеновых белков костной ткани в поддержании тканевого гомеостаза кости и крови (Г. А. Илизаров с соавт., 1982, 1985 б, 1986 а; К. С. Десятниченко с соавт., 1984 б, 1987; С. П. Изотова, К. С. Десятниченко, 1982; С. И. Ширалиева, С. П. Изотова,

1986). В отличие от проводившихся в то же время исследований костных рострегулирующих факторов (КРРФ) в ряде лабораторий других стран (Farley, Baylink, 1982; Shimizu-etal, 1983; Canalis, 1984) нами установлено, что мишенями действия и 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 регуляции (Г. А. Илизаров с соавт., 1980, 1982, 1986).

Кроме того, установлено, что в крови больных с переломами трубчатых костей на высоте репаративного процесса появляется белковая фракция с физико-химическими свойствами (высаливаемость солями аммония, сродство к анионообменнику, относительная молекулярная масса), которая при введении подкожно мышам более чем в 1,5 раза увеличивает у них количество ретикулоцитов в периферической крови через 48 часов после введения (К. С. Десятниченко с соавт., 1987 б). В сопоставлении с вышеизложенным и ранее выполненными исследованиями остеопоэтической активности сыворотки животных с активным остеогенезом (В. И. Филимонов с соавт., 1977; Н. П. Лепехова, 1978) эти данные позволяют предполагать, что КРРФ способны поступать в кровеносное русло при определенных условиях, и при дистракционном остеосинтезе обеспечивают на молекулярном уровне стимулирующее влияние напряжения растяжения на остеогенез (Г. А. Илизаров с соавт., 1982, 1986).

В последующих исследованиях была поставлена цель добиться более глубокой очистки рострегулирующих факторов костного внеклеточного матрикса, углубить сведения о механизме их физиологического действия.

Перспективность клинического применения костных рострегулирующих факторов для лабораторной диагностики и фармакологического потенцирования влияния чрескостного остеосинтеза на репаративные процессы вызвала необходимость разработки и апробации методов выделения и очистки белковых фракций внеклеточного матрикса костной ткани и способов биотестирования на лабораторных животных их остеогенных и гемопоэтических потенций.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Выделение и очистка костных рострегулирующих факторов

2.1.1. Подготовка костной ткани к декальцинации и экстрагированию.

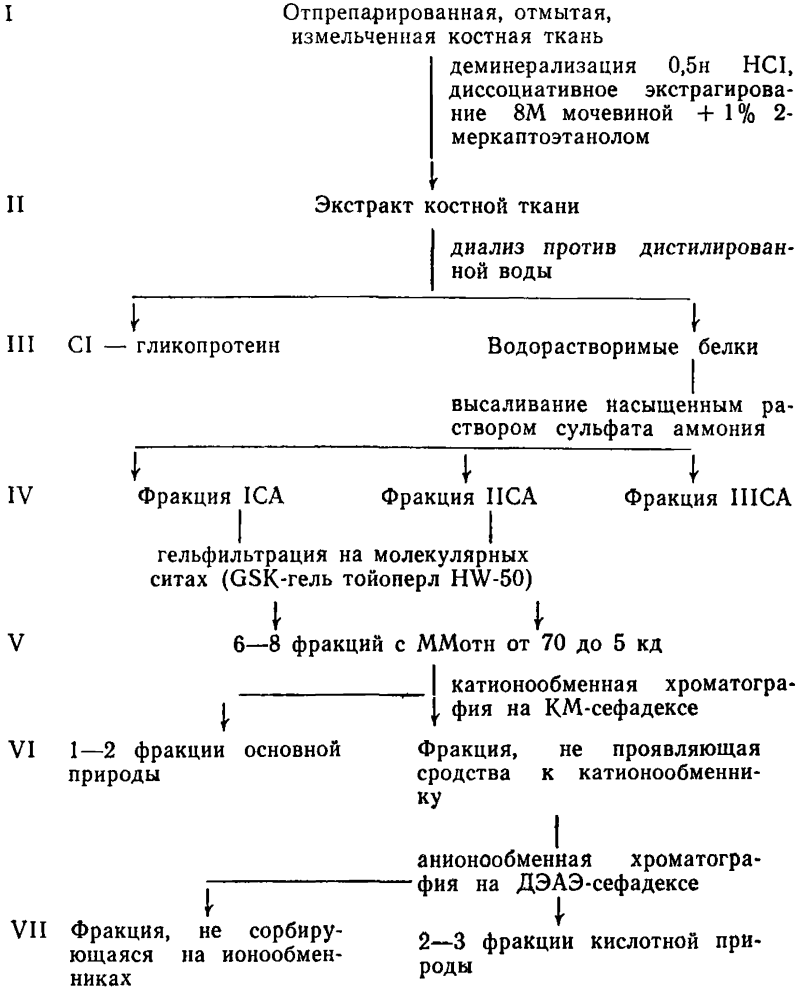
В качестве источника КРРФ использовали зрелую компактную кость диафизов длинных трубчатых костей. Заведомо зная, что их содержание здесь меньше, чем в эпифизарной губчатой кости или, тем более, в эмбриональной костной ткани, мы предпочли этот объект, поскольку его намного легче очистить от параоссальных тканей, он значительно меньше содержит клеточного материала, т. е. больше уверенность в том, что источником выделяемых белков является минерализованный внеклеточный матрикс. В зависимости от размеров костей (к настоящему времени КРРФ выделен из костной ткани человека, кролика, собаки и крысы) эпифизы отделяли с помощью пилы или кусачек. Диафизы расщепляли вдоль, тщательно соскабливали надкостницу и эндост, измельчали кусачками до частиц с наибольшим размером, не превышающим 4—5 мм, которые отмывали последовательно в 0,1%-ном растворе тритона X-100 дистиллированной воде (3—5 раз) и 0,15 М растворе NaCl (2—3 раза). При отмывании кусочки кости перемешивали на магнитной мешалке, при каждой смене отмывающей жидкости декантировали частицы неминерализованной ткани.

2.1.2. Экстрагирование костной ткани и фракционирование экстракта.

Последовательность операций при выделении КРРФ из зрелой компактной ткани приведена на схеме (табл. 1). На первом этапе — декальцинации кости (1) — измельченную и отмытую ткань помещали в диализные мешки из диацеля (ПО «Химволокно», Балаково) и декальцинировали путем диализа против 0,5 н. HCl. Противодиализат объемом 2 л/100 г ткани заменяли свежим через 24, 48 и 96 ч. диализа, который осуществляли при 4—6° С с перемешиванием противодиализата на магнитной мешалке общей продолжительностью 5—7 суток. После завершения декальцинации содержимое диализного мешка переносили в стеклянный или пластиковый сосуд, добавляли мочевину до концентрации

Таблица 1.

СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РОСТРЕГУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ КОСТНОЙ ТКАНИ



VIII Обессоливание, концентрирование, электрофоретический контроль гомогенности, лиофильное высушивание.

8 моль/л и 2-меркаптоэтанол до концентрации 1 мл/100 мл диализата. Проводили экстрагирование деминерализованного матрикса в присутствии этих веществ, вызывающих диссоциацию водородных и дисульфидных связей в супрамолекулярных комплексах внеклеточного матрикса, в течение 3—5 суток на холоде при постоянном перемешивании.

II. Экстракты отделяли от нерастворившихся частиц коллагенового матрикса декантированием и центрифугированием при 5000 g на центрифуге ЦЛР-1 в течение 1 часа. Супернатант помещали в диализный мешок и диализировали против дистиллированной воды на холоде в течение 24 ч. с трехкратной заменой противодиализата. При этой процедуре преципитирует так называемый GI-гликопротеин (Herring et al., 1974) — супрамолекулярный комплекс солюбилизированного при экстрагировании коллагена и некоторых неколлагеновых белков костной ткани. Его отделяли от белков, растворимых при низкой ионной силе, центрифугированием при 10000 об./мин.$^{-1}$ в роторе типа 19 или SW-27 на препаративной ультрацентрифуге L-5-65 (Beckman, США) в течение 1,5—2 часов.

III. Полученный после центрифугирования супернатант фракционировали посредством высаливания сульфатом аммония, который в виде насыщенного раствора добавляли вначале до концентрации 1,2 моль/л (около 30% насыщения), выдерживали в холодильнике в течение ночи и собирали с помощью центрифугирования выпавший в осадок белок (ICA фракция). В супернатанте доводили содержание сульфата аммония до 2 моль/л (около 50% насыщения) и аналогичным путем собирали фракцию IICA. Обе фракции сохраняли для дальнейшего фракционирования в виде суспензии в насыщенном растворе сульфата аммония. Оставшийся в экстракте белок может быть осажден при 75%-ном насыщении сульфатом аммония, но высокая плотность такого раствора затрудняет отделение белка посредством центрифугирования и ведет к дополнительному расходу осадителя. Для получения фракции IIICA мы предпочли другой путь — диализировали против воды и обессоленный раствор в диализном мешке концентрировали с помощью полиэтиленгликоля (м. в. 20000—40000).

IV. Фракции, полученные высаливанием, подвергали разделению по молекулярной массе с помощью гельфильтрации

на колонках 100×2,5 см с ультрагелем АсА-54 (Франция) или ГSK-гелем тойоперл HW-50 (Япония), используя комплекс оборудования для хромотографии фирмы LKB (Швеция) (рис. 1, 2).

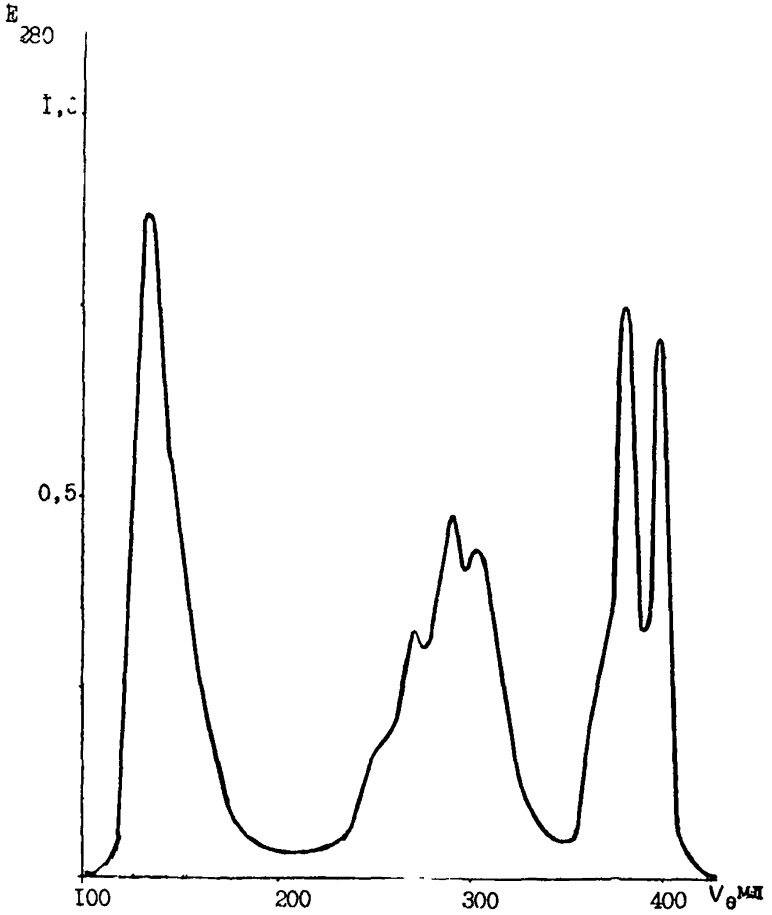


Рис. 1. Элюционный профиль фракции ICA экстракта костной ткани собаки на ГSK-геле «Тойоперл HW-50» (колонка 100x2,5 см).

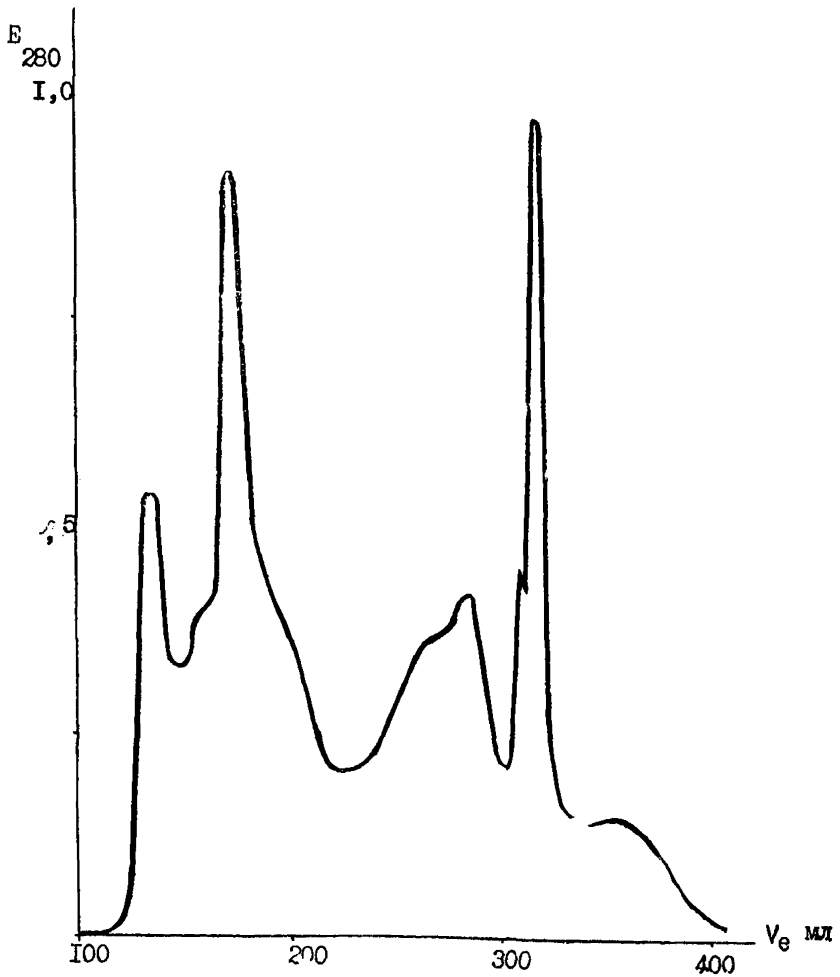


Рис. 2. Элюционный профиль фракции ПСА экстракта костной ткани собаки на TSK-геле «Тойоперл HW-50» (колонка 100х2,5 см).

Фракция ICA плохо растворима при нейтральном pH и в кислой среде и ее солюбилизировали в fris-HCI буфере, pH 8,2—8,5, содержащем 0,1% 2-меркаптоэтанола и 8 моль/л мочевины. Этот буфер использовали и для элюирования колонки. Белки фракции IICA легко растворимы при физиологических значениях pH и ионной силы, но склонны образо-

вывать агрегаты, диссоциирующие в кислой среде (К. С. Десятниченко, Ю. П. Балдин, 1984), поэтому для их растворения и элюирования из колонки применяли буфер 0,02 fris-HCI, pH 4,0—4,5. Элюат собирали на коллекторе фракций порциями по 4 мл, оптическую плотность которых измеряли на спектрофотометре при 280 нм. Согласно этим измерениям и ориентируясь на кривую регистрирующего потенциометра, собирали фракции близкой молекулярной массы, величину которой устанавливали путем сравнения объемов выхода белков-маркеров: бычьего сывороточного альбумина, химотрипсиногена соевого ингибитора трипсина и РНК-азы. Для кодирования полученных фракций использовали округленные значения ММотн в кд, например: ICA, 50; IICA, 30 и т. п.

V—VI. Дальнейшую очстку выделенных на предыдущем этапе фракций осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на колонках 15,0x1,5 см с КМ-сефадексом, используя для элюирования линейный градиент концентрации хлорида натрия от 0 до 2,0 моль/л в 0,05 М fris-HCI буфере, pH6,8. Регистрацию и отбор фракций для дальнейшей работы осуществляли как при гельфильтрации. Фракции, не проявлявшие сродства к катионообменнику, дополнительно хроматографировали на ДЭАЭ-сефадексе, используя для элюирования линейный градиент концентрации NaCI в тех же пределах в fris-HCI буфере pH 7,2. Для маркировки полученных белковых препаратов к обозначениям, присвоенным на предыдущем этапе фракционирования, добавляли значение концентрации NaCI, при котором они покидали ионообменник, и обозначение типа последнего. Например: ICA, 20, 1,5к; IICA, 30, 2а; IIICA, 40 0а0к. Хроматографические профили фракции II, 30 при очистке на КМ- и ДЭАЭ-сефадексе приведены на рис. 3.

V. По завершении фракционирования растворы белков обессоливали посредством диализа против дистиллированной воды, в диализных мешках концентрировали с помощью полиэтиленгликоля до объема 15—20 мл и лиофильно высушивали на установке СД2-1 (Hefo, Дания), предварительно намораживая раствор на внутренней поверхности флакона емкостью 25—50 мл во фризере СВ-10 той же фирмы.

В последнее время появилась возможность использовать для фракционирования смесей белков отечественные носители для гельпроникающей и ионообменной хроматографии.

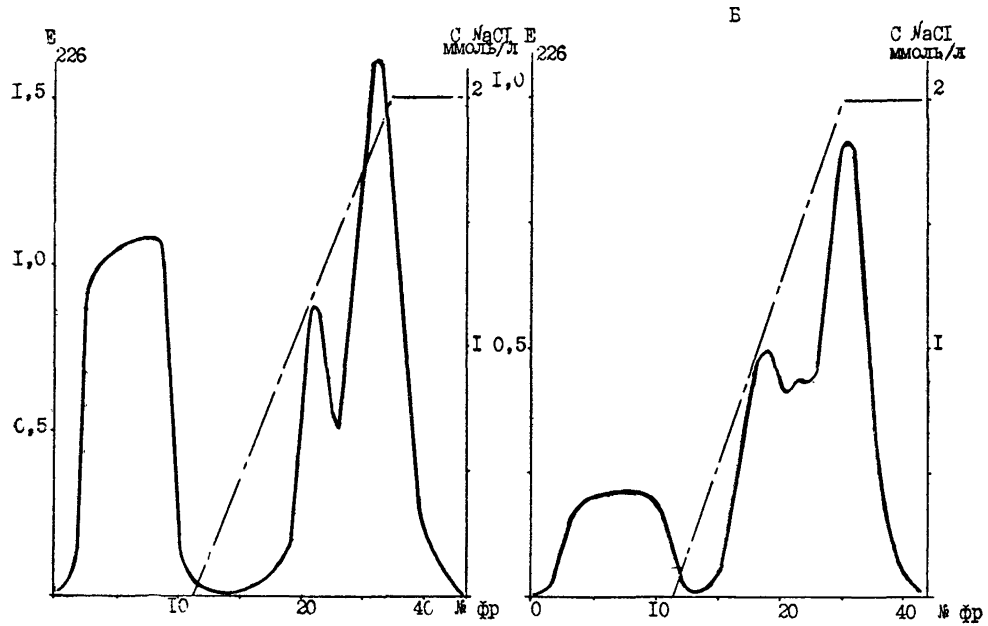


Рис. 3. Фракционирование экстракта костной ткани собаки посредством ионообменной хроматографии.
а — фракция II, 30 на КМ-сефадексе (колонка 20х2,5 см);
б— фракция II, 30, 0к на ДЭАЭ-сефадексе А-25 (колонка 20х2,5 см).

Нами опробированы и с успехом используются разработанные в лаборатории химии и технологии полимеров ВНИИ ОЧБ Минмедпрома (Ленинград) для фракционирования по молекулярной массе гамма-гель 115-НГ с диаметром частиц 40—80 мкм, пределом эксклюзии $50x10^3$ дальтон (рис. 4).

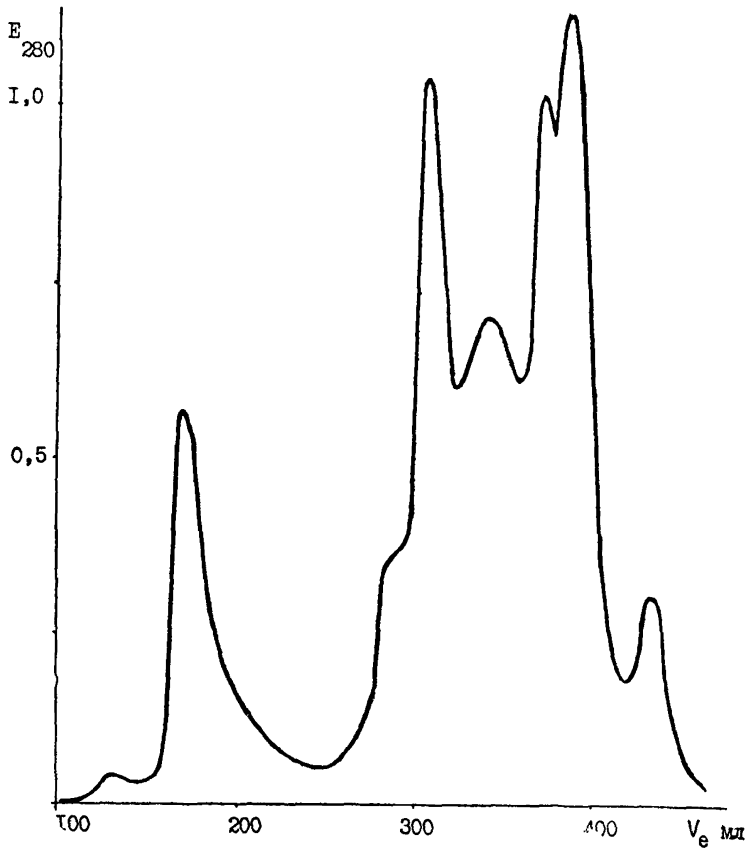


Рис. 4. Элюционный профиль фракции ПСА экстракта костной ткани кролика на Гамма НГ-115 (колонка 100х2,5 см).

Хорошие результаты показали также карбоксильный катионит СООН-ольвагель (обменная емкость по карбоксильным группам 0,3 мг-экв/мл, диаметр частиц 60—100 мкм) и ДЭАЭ-сферанит-ОН (обменная емкость по аминогруппам 0,2 мг-экв/мл, диаметр частиц 50—100 мкм).

На этапах выделения и очистки биологически активных факторов белковой природы из костной ткани необходим контроль за выходом белка на разных этапах процедуры выделения. Ввиду низкой концентрации и особенностей состава костных белков не могут быть применены наиболее часто применяемые высокочувствительные способы количественного определения белка: спектрофотометрия в дальней УФ-области, окрашивание специфическими красителями кумасси G-250 и R-250, реакция с реактивом Фолина-Чиокалтеу (метод Лоури). Известен способ определения микроколичеств белка с 4-фенилспирофуран-2 (3Н), 1'-фталан-3,3'-дионом (флуорескамином), образующим с белком интенсивно флуоресцирующее соединение (R. Chen, 1974). Однако конъюгированию белка с флуорескамином мешают кислая среда (на этапе декальцинации костной ткани), высокая концентрация мочевины на этапе диссоциативного экстрагирования, и сульфата аммония на этапах высаливания отдельных фракций. Нами был предложен способ определения микроколичеств белка в экстрактах костной ткани на всех этапах выделения рострегулирующих факторов путем конъюгирования с флуорескамином и последующим измерением флуоресценции, отличающийся тем, что аликвоту экстракта диализируют против щелочного раствора $aHCO_3$, после чего измеряют количество белка по описанной ниже методике.

Принцип метода

Растворитель пробы белка посредством диализа замещается буферным раствором с pH, оптимальным для реакции с флуорескамином и не содержащим реагирующих с ним соединений, после чего проводят конъюгирование с флуорескамином и измерение флуоресценции, возбуждаемой УФ-лучами.

Оборудование

1. Флуориметр «Биан-130» (ЛОМО, Ленинград), включенный в измерительную схему иономера И-130 (ЗИП, Гомель).

2. Диализный целлофан, например, «Диацель» (Химволокно, Абалаково).

3. Диализный сосуд емкостью 2—3 л.

Реактивы

1. Раствор бикарбоната натрия, 0,05М, pH 8,3.

2. Раствор флуорескамина в ацетоне, 100 мг/100 мл. Готовится непосредственно перед анализом.

Подготовка пробы

Аликвоту экстракта костной ткани 0,2—0,5 мл разбавляют раствором бикарбоната натрия до 2 мл, заключают в диализный мешок и диализируют против 2—3 смен раствора бикарбоната, после чего содержимое диализного мешка переносят в мерный цилиндр 10 мл для определения коэффициента разведения.

Выполнение анализа

0.5 мл диализата смешивают с 0,1 мл свежеприготовленного раствора флуорескамина в ацетоне и через 10 мин. измеряют флуоресценцию при 490 нм, возбуждаемую УФ 365 нм. При необходимости пробу разбавляют раствором бикарбоната в 10 и более раз до концентрации белка в пределах 10—500 мкг/мл. Параллельно измеряют флуоресценцию конъюгата с каким-либо хорошо растворимым в слабощелочной среде белком известной концентрации.

При вычислении концентрации белка в исследуемой пробе учитывают степень разведения. Метод чувствителен не менее, чем к 5 мкг белка в пробе.

2.2. Биотестирование белковых фракций на способность воздействовать на кроветворение

Для отбора фракций на промежуточных этапах очистки и оценки гемопоэтической активности полученных препаратов РРФ готовили растворы белков 1 мг/мл в 0,15 М NaCl, которые вводили подкожно белым беспородным мышам по 0,4—0,5 мл. Контрольные животные получали тот же объем раствора хлорида натрия. Животных помещали в клетки-отсадники не менее чем за 24 часа до эксперимента. Перед введением белкового препарата или физраствора из хвостовой вены мышей брали кровь и готовили мазки, которые суправитально окрашивали раствором бриллиантового крези-

лового синего в абсолютном этаноле 1 г/100 мл. Забор крови и приготовление мазков на ретикулоциты повторяли через 48 ч. после инъекции. При испытании фракций на промежуточных этапах очистки биотестирование этим ограничивалось. После введения окончательно очищенных препаратов через 48 ч. мышей забивали декапитацией, взвешиванием определяли массу тела животного и селезенки для подсчета селезеночного индекса (СИ):

$$СИ = \frac{\text{масса селезенки, мг}}{\text{масса тела, г}}.$$

Готовили и окрашивали по Мей-Грюнвальду—Романовскому—Гимза мазки—отпечатки селезенки и костного мозга, определяли клеточность селезенки, для чего ее полностью гомогенизировали в 5 мл 0,5 М раствора уксусной кислоты, лизирующего эритроциты, но сохраняющего ядерные клетки, количество которых в селезенке рассчитывали после подсчета клеток гомогената в камере Горяева. В табл. 2 приведены некоторые гематологические показатели, характеризующие ряд выделенных нами КРРФ.

Для оценки функционального состояния ретикулоэндотелиальной системы используют так называемый конгорот-индекс. Для его измерения общепринятым методом дважды берут кровь у кролика посредством пункции желудочка сердца (В. С. Зудин, 1960). В целях упрощения и удешевления методики нами предложена следующая модификация измерения конгорот-индекс (КРИ).

Белым мышам линии СВІ (не менее 5 животных в группе) внутрибрюшинно вводили по 0,3 мл 10%-ного раствора конгорот в 0,15 М NaCl. 1-ю группу животных забивали декапитацией через 15 минут после инъекции, 2-ю — через 60 минут. Кровь собирали в гепаринизированные пробирки, отделяли плазму центрифугированием, разбавляли ее в 2,5 раза 0,15М раствором NaCl и фотоколориметрировали при 500 нм. КРИ рассчитывали по формуле: $КРИ = 100 - \frac{E_{60} \cdot 100}{E_{15}}$

где E_{15} и E_{60} — средние значения оптических плотностей разведенной плазмы через 15 и 60 минут после инъекции конгорот соответственно.

2.3. Биотестирование КРРФ на остеогенную активность.

Многие аспекты физиологического действия КРРФ — дозозависимость эффекта, влияние на репликацию (синтез

Таблица 2

Влияние костных рострегулирующих факторов на показатели кроветворения

Введенный препарат Показатель	0,15 NaCl	I, 20, I, 5к	II, 10, 2а	II, 20, 0а ,0к	II, 20, 2к	II, 30, 2а	II, 30, 3к
1. Ретикулоциты периферической крови (% от исходн.)	146,3±18,0	105,8±20,6	119,3±10,7	258,6+	240,8±73,9	67,6±8,1	262,2±7,4
2. Индекс массы селезенки	7,1±0,3	7,0± 0,8	4,9± 0,8	8,0± 1,1	9,3± 0,9	7,3±0,6	6,6±0,6
3. Клеточность селезенки (ядерных клеток в органе X10)	384,7±28,7	381,3±25,4	307,5±26,8		474,5±64,4	303,6±31,4	395,5±24,7
4. Общее число эритроидных клеток селезенки (в 100 кл.)	9,5± 0,7	10,0± 0,9	5,8± 0,5	6,7± 1,3	13,9± 1,6	9,0±0,9	14,5±0,8
5. Общее число лимфоцитов селезенки (в 100 кл.)	80,6± 1,3	79,1± 1,1	77,9± 1,1	73,5± 1,5	75,0± 1,3	80,2±1,7	74,8±1,2
6. Малые лимфоциты селезенки (0 от общего числа)	12,8± 0,8	12,3± 0,7	6,5± 0,7	12,1± 1,9	18,3± 1,2	9,3±0,6	19,4±0,7
7. Гранулоциты селезенки (в 100 клетках)	8,7± 1,2	11,0± 0,6	10,8± 1,5	10,3± 1,1	10,4± 1,3	8,4±1,2	9,6±1,3
8. Миоциты селезенки (в 1000 клеток)	8,9± 1,7	3,2± 1,3	4,0± 1,0	8,7± 1,8	4,4± 0,9	23,2±2,8	7,3±0,8
9. Ретикулярные клетки стромы и свободнолежащие (в 100 клетках селезенки)	5,6± 0,5	3,2± 0,4	5,0± 1,1	7,3± 0,4	5,3± 0,7	6,1±0,6	5,3±0,7
10. Общее число эритроидных клеток костного мозга (в 100 клетках)	14,1± 0,6	12,0± 0,6	12,0± 0,9	11,5± 1,1	14,9± 0,5	12,5±1,2	16,4±0,6
11. Лейкоцитарно-эритробластическое соотношение костного мозга	5,81± 0,42	6,86± 0,47	7,28±0,48	7,16±0,48	5,36± 0,19	6,22±0,57	4,73±0,18
12. Ретикулярные клетки стромы костного мозга (в 1000 клеток)	44,3± 0,88	37,2± 0,4	32,4± 4,1	37,0± 5,8	48,8± 4,6	46,4±3,8	53,7±2,8
13. Недифференцированные бластные клетки кост. мозга (в 100 кл.)	9,7± 1,8	17,6± 4,1	35,5± 4,3	30,0± 5,2	7,6± 1,3	36,0±2,3	9,7±1,4

ДНК) или биосинтез тканеспецифических белков — удобно исследовать в культуре остеогенных клеток с использованием меченых предшественников нуклеиновых кислот и белка и последующей радиоавтографией или счетом радиоактивности на автоматических β- или γ-счетчиках. Широкое распространение имеет методика оценки остеоиндуктивной активности трансплантатов внеклеточного матрикса кости, воссоединенного (реконструированного) с одной из белковых фракций экстракта костной ткани (Д. Д. Сумароков, M. R. Urist; A. H. Reddi; J. Sampath и др., M. R. Urist с соавт. (1986 г.), с этой целью использовали также замещение циркулярного дефекта лучевой кости собаки реконструированным гомотрансплантатом декальцинированной костной ткани.

У кроликов циркулярный дефект малоберцовой кости высотой 4—6 мм замещается новообразованной костью в течение 5—6 недель (Г. А. Илизаров с соавт., 1984, 1985), что можно ускорить введением биологически активных веществ, например, эритропоэтической сыворотки (Г. А. Илизаров с соавт., 1985). Эта модель была использована нами и для биотестирования остеогенной активности КРРФ. Кроликам в условиях обезболивания в условиях асептики производили разрез кожи в верхней трети голени по наружной поверхности, расслаивали мышцы и резецировали кусачками участок диафиза малоберцовой кости протяженностью 4 мм. Рану послойно зашивали, швы обрабатывали этанолом. Через 3 суток после операции животным в вену уха вводили раствор одной из белковых фракций из расчета 1 мг/1 кг массы тела или равный объем 0,15 М хлорида натрия. Рентгеновские снимки оперированной конечности получали тотчас после операции и один раз в неделю до конца наблюдения. Для оценки активности новообразования и резорбции костной ткани измеряли и записывали оптическую плотность рентгеновской тени малоберцовой кости на регистрирующем микрофотометре ИФО-451 в масштабе 1 : 5.

На рис. 5 приведены фотографии рентгеновских снимков в динамике замещения дефектов малоберцовой кости в контрольной группе и при испытании двух из выделенных нами КРРФ. В качестве меры активности репаративного остеогенеза мы рассматривали скорость изменения площади под денситографической кривой (рис. 6), принимая скорость заполнения дефекта (V) равной $\frac{dSt/So}{dt}$, где So и St—площади

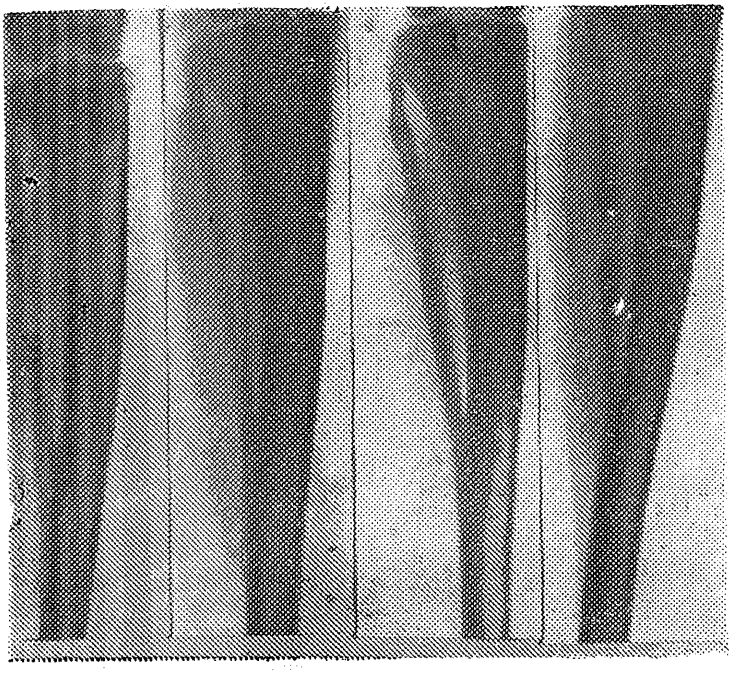


Рис. 5. Замещение стандартного дефекта малоберцовой кости кролика: а — сразу после операции, через 4 недели после операции; б — контроль; в — под влиянием фракции II, 30, 2к; г — под влиянием фракции II, 10, 2а.

под денситографической кривой соответственно сразу после операции и через время t после нее. Принято, что дифференциальное уравнение, описывающее процесс замещения дефекта, имеет вид:

$$V = \frac{dSt/So}{dt} = \frac{1}{2So}\left[\left(\frac{da}{dt} + \frac{db}{dt}\right)H(t) + \frac{dH}{dt}\left(a(t) + b(t)\right)\right],$$

где a и b — основания трапеции, образованные денситограммой, при этом величина **a** может увеличиваться в динамике замещения дефекта в связи с частичной декальцинацией концов отломков, тогда как уменьшение **b** соответствует сокращению протяженности дефекта вследствие заполнения его новообразованной костной тканью; H — высота трапеции-денситограммы — обусловлена рентгеновской плотностью, увеличивающейся по мере минерализации новообразованной костной ткани.

Перед операцией, на 7-е, 14-е, 21-е, 28-е сутки после нее у кроликов исследовали периферическую кровь на содержание гемоглобина, гематокрит, количество эритроцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов в единице объема и формулу белой крови. После эвтаназии на 21-е или 28-е сутки эксперимента готовили и окрашивали мазки-отпечатки селезенки и костного мозга метафизов большеберцовых костей оперированной и контрлатеральной конечностей. Для выполнения гистологических исследований кости голени пересекали в 1,5 см проксимальнее и дистальнее регенерата малоберцовой кости, фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезвоживали и заливали в парафин, после чего готовили серийные срезы малоберцовой кости, которые окрашивали гематоксилин-эозином. На гистологических препаратах измеряли протяженность проксимального и дистального отделов костного регенерата, высоту соединяющей их фиброзно-клеточной прослойки, наличие островков хондроидной ткани и периостальных наложений.

Гистологические исследования были выполнены на 26 кроликах контрольной и 4 опытных групп. В контроле через 21 день после операции дефект малоберцовой кости заполнен костно-соединительно-тканным регенератом. С концами спаяны балки новообразованной губчатой кости. Противолежащие костные отделы регенерата соединяет до 1 мм прослойка соединительной ткани, со стороны которой продолжается активное костеобразование. В составе регенерата выявляются островки хондроидной ткани. В одном случае в окружающих мягких тканях имеется выраженная воспалительная реакция. Она распространяется и на костную ткань регенерата. В другом наблюдении в концах отломков отмечается гибель остеоцитов на значительном протяжении и выраженная остеокластическая резорбция компактной кости.

В группе животных, получавших инъекции П, 30,2к в тот же срок диастаз между отломками заполнен молодой губчатой костью, спаянной с концами последних. В части препаратов между костными отделами регенерата прослеживается фиброзно-клеточная прослойка 1—1,3 мм высотой. В расширенных сосудистых канальцах видно напластование молодой кости. Прогрессирующая периостальная реакция более выражена на поверхности дистального отломка. В другом наблюдении отмечены микроскопические островки хрящевой ткани в составе соединительно-тканной прослойки.

У кроликов, которым вводили раствор фракции П, 10, 2а, через 3 недели после операции прилегающие к отломкам отделы регенерата представляют собой сеть балок губчатой кости эндостального и периостального происхождения. Апикальные отделы этих образований соединяются между собой прослойкой, напоминающей дистракционный регенерат, но умеренно выраженной активности костеобразования. В составе новообразованных костных перекладин часто сохраняются остатки межклеточного вещества хряща и грубоволокнистой костной ткани. На поверхности костных отломков можно было отметить массивные периостальные напластования, в составе которых имеются островки хондроидной ткани. В одном наблюдении была отмечена бурная остеокластическая резорбция.

На препаратах той же группы через 28 дней после операции определяются конусообразные костные отделы регенерата. Их вершины сливаются с фиброзной прослойкой, соединяющей грубые пучки коллагеновых волокон. На вершинах костных балочек сохраняется вялотекущее, аппозиционное костеобразование. В этот же срок у животных, получавших фракции П, 20, 1, 5к и П, 30, 2к, дефект заполнен регенератом, состоящим в основном из молодой губчатой кости, в составе которой в ряде случаев сохраняется межклеточное вещество хряща. Репаративная реакция затухает, но на отдельных участках сохраняется прогрессирующая периостальная реакция, в костно-мозговых полостях обнаружен кроветворно-жировой костный мозг.

Для описания динамики состава красной крови на протяжении замещения дефектов малоберцовой кости использовали системный индекс красной крови (СИКК), вычисляемый по формуле: $СИКК = \frac{Нв \cdot эр}{рет}$,

где Нв, эр, рет — концентрация гемоглобина (Г/Л), эритроцитов (10^{12} клеток/л), ретикулоцитов (клеток/1000 эритр.) соответственно.

У кроликов до операции СИКК составлял 34,3±2,3. Падение СИКК примерно одинаково в контроле и во всех опытных группах и достигает максимума на 14-е сутки. К 21 дню эксперимента во всех группах намечается тенденция к повышению СИКК, однако только на конец эксперимента только

в группе П, 30, 2к достигнут уровень, превышающий дооперационный и достоверно отличающийся от контроля того же срока наблюдения.

Заключение

Зрелая компактная костная ткань содержит семейство рострегулирующих факторов, являющихся белками неколлагеновой природы, различающимися между собой по молекулярной массе, растворимости и заряду молекул.

Костные рострегулирующие факторы могут быть выделены в виде высокоочищенных препаратов посредством последовательного применения декальцинации, диссоциативного экстрагирования, высаливания, гельпроникающей и ионообменной хроматографии.

Каждый из 6 испытывавшихся костных белков имеет индивидуальные физико-химические свойства, характер влияния на остеогенез и кроветворение и точку приложения действия в ряду клеток от полипотентной стволовой до дифференцированных клеток кости и крови.

Местное действие на репаративный остеогенез костные рострегулирующие факторы оказывают при их парэнтеральном введении в общий кровоток, что может быть использовано для управления костеобразования в клинике.

Новообразование костной ткани сопровождается усиленным поступлением костных рострегулирующих факторов в систему циркуляции, что может быть использовано в прогностических и диагностических целях в ортопедотравматологической практике посредством микропрепаративного выделения их из сыворотки крови больных и биотестирования на лабораторных животных.

ОТРЫВНОЙ ЛИСТ

учета эффективности использования методов профилактики, диагностики, лечения

Направлять по адресу: г. Москва, Москворецкая набережная, 2-а, Информационно-вычислительный центр.

1. «Выделение и биотестирование костных рострегулирующих факторов». Методические рекомендации № 71.

2. Утверждены заместителем начальника Главного Управления МЗ РСФСР Н. Н. Самко 10.08.90 г.

3. Результаты применения метода:

положительные _____
количество наблюдений

неопределенные _____
количество наблюдений

отрицательные _____
количество наблюдений

Наблюдение проводилось с ____ по ____ 19 г.

4. Замечания и пожелания (текст) _____

_____

_____

_____

Подпись _____

Заполняется учреждением, применяющим метод.

Тираж 500 Заказ 492

gost.e-ecolog.ru

Типография издательства «Советское Зауралье»