

БИОТЕСТИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ ТЕЧЕНИЯ РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕССА У ПАЦИЕНТОВ С АХОНДРОПАЗИЕЙ

Ковинька М.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр “Восстановительная травматология и ортопедия”» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, г. Курган, Россия (640014, Россия, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6); e-mail: office@ilizarov.ru

В работе предложен способ оценки течения репаративного процесса у пациентов с ахондроплазией, находящихся на этапах лечения методиками чрескостного дистракционного остеосинтеза. Принцип способа основывается на способности сыворотки крови, активированной остеогенезом, воздействовать на процессы кроветворения. В ходе исследования сыворотку крови пациентов с ахондроплазией отбирали на различных сроках лечения методом чрескостного остеосинтеза, модифицировали по оригинальной методике и вводили лабораторным мышам. В периферической крови мышей оценивали количество ретикулоцитов и моноцитов до введения модифицированной сыворотки крови и через 48 часов после введения. Установлено, что наибольшие изменения в периферической крови мышей наступают после введения модифицированной сыворотки, взятой на 3 и 4 неделе дистракции. Обсуждается возможность использования данного способа с целью оценки течения репаративного процесса у пациентов ортопедического профиля.

Ключевые слова: биотестирование, сыворотка крови, ахондроплазия, ретикулоциты, моноциты.

BIOTEST SERUM TO ASSESS THE COURSE OF REPARATIVE PROCESSES IN PATIENTS WITH ACHONDROPLASIA

Kovinka M.A.

Federal State Institution “Russian Ilizarov Scientific Center “Restorative Traumatology and Orthopaedics”” of Ministry of Healthcare, the Russian Federation (6, M. Ulyanova street, Kurgan, 640014, Russia); e-mail: office@ilizarov.ru

In this paper we propose the way of an assessment of a course of reparative process in patients with achondroplasia, are on stages of treatment methods transosseous distraction osteosynthesis. The principle of the method is based on the ability of blood serum, activated bone formation, affecting processes of hematopoiesis. In the study, blood serum of patients with achondroplasia were taken at different periods of treatment by transosseous osteosynthesis, modified the original method and injected laboratory mice. In the peripheral blood of the mice were evaluated and the number of reticulocytes to the introduction of the modified monocytes serum and 48 hours after administration. It was found that the greatest changes in the peripheral blood of mice come after the introduction of a modified serum taken on the 3rd and 4th week of distraction. The possibility of using this method to assess the reparative process in orthopedic patients.

Keywords: biological testing, blood serum, achondroplasia, reticulocytes, monocytes.

Ахондроплазия – системное поражение скелета, в основе которого лежат генетические изменения, приводящие к нарушениям энхондрального роста длинных и коротких трубчатых костей. Заболевание относится к группе физарных дисплазий.

Известно, что ахондроплазия – заболевание, требующее хирургической коррекции, является следствием генной мутации в одной из хромосом 4-й пары в локусе, соответствующем кодированию аминокислотной последовательности полипептидной цепи тирозинкиназы, являющейся трансмембранным рецептором фактора роста фибробластов 3. При этой патологии наблюдаются дефекты во взаимодействии на оси соматотропный гормон – соматомедины, а также низкая активность факторов эритропоэза. Отклонения физического развития детей с ахондроплазией обусловлены как генной мутацией, так и образом жизни и

социальным статусом. Непропорциональное развитие тела и низкий рост порождает целый ряд проблем, решить которые можно, прибегнув к устранению нарушения длины и формы конечностей методом чрескостного дистракционного остеосинтеза.

К началу 80-х гг. прошлого века задача увеличения роста оперативным путем у больных с врожденным системным недоразвитием осевого скелета была решена посредством применения полилокального полисегментарного чрескостного дистракционного остеосинтеза. К настоящему времени актуальной остается проблема выявления критериев продолжительности и интенсивности хирургической коррекции и разработки новых, надежных методов лабораторного мониторинга течения репаративного процесса, а также связанных с ним изменений, происходящих в организме на фоне хирургического вмешательства [4].

Существует множество способов оценки течения репаративного процесса, в основе которых лежит определение активности костных рострегулирующих факторов. Одним из них является биотестирование сыворотки крови, предложенное Ю.П. Балдиным и К.С. Десятниченко. Известно, что ряд фракций неколлагеновых белков костной ткани оказывают влияние на остеогенез и гемопоэз. Следовательно, оценивая характер влияния компонентов сыворотки на состав периферической крови, можно сделать заключение о состоянии регенераторного потенциала организма [5].

Феномен изменения клеточного пейзажа периферической крови вследствие костной травмы, а также факт наличия общих предшественников у форменных элементов крови и остеогенных клеток позволяет констатировать существующую взаимосвязь гемопоэза и остеогенеза [2,7]. Регуляция остеогенеза и гемопоэза в организме осуществляется как на системном, так и на местном уровне, в котором принимают участие цитокины и факторы роста различной природы. Исследования ряда последних лет показали, что их присутствие в циркуляторном русле обуславливает остеогенный эффект сыворотки крови пациентов с активным остеогенезом [1]. Причем, повреждение опорно-двигательного аппарата при оперативных вмешательствах и костных травмах является основным условием их интенсивного поступления в циркуляторное русло. Таким образом, активность факторов остеогенеза отражает состояние репаративного процесса в организме.

Различные методики биотестирования сыворотки крови применяются в практическом здравоохранении [3], однако работы, посвященные данному вопросу в области ортопедии, практически отсутствуют в научной литературе.

Цель исследования – изучить возможность использования результатов биотестирования сыворотки крови пациентов с ахондроплазией на различных этапах остеосинтеза для определения их регенераторного статуса.

Материалы и методы

Материалами биохимических исследований были сыворотка крови 52 больных ахондроплазией обоего пола в возрасте от 6 до 14 лет. Сыворотку крови получали за несколько дней до операции, в первые 3–5 дней послеоперационного периода, далее 1 раз в неделю с начала distraction и 2 раза в неделю на этапе фиксации. Кроме этого, материал для исследований получали в отдаленные сроки после снятия аппарата Илизарова. Кровь для анализа получали венепункцией и собирали в гепаринизированные пробирки, сыворотку отделяли центрифугированием (ЦЛР-1, 3000 об/мин).

Выделение материала для биотестирования проводили следующим образом. Из 0,1 мл сыворотки крови больного выделяли компоненты, преципитирующие в диапазоне насыщения сульфата аммония >30 - <50 %. Из преципитата выделяли фракции, сорбирующиеся на ДЭАЭ-целлюлозе. Полученные пробы подвергали диализу против дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Полученный лиофилизат растворяли 0,04 мл физиологического раствора, которые подкожно вводили белым лабораторным мышам массой 24–26 грамм. Исследование количества форменных элементов крови мышей производили в камере Горяева. Подсчет лейкоцитарной формулы – из расчета на 100 клеток при окрашивании по Романовскому – Гимза. Подсчет количества ретикулоцитов на 1000 эритроцитов – на предметном стекле, окраска бриллиантовым крезильным синим. Кровь у мышей отбирали из хвостовой вены. Исследования проводили до введения исследуемых фракций и через 48 часов после введения. Изменение содержания в периферической крови исследуемых клеток выражали в процентах от исходного уровня. Гематологические исследования проведены С.П. Изотовой.

Все манипуляции с экспериментальными животными были проведены в соответствии с отечественными и европейскими требованиями по обращению с экспериментальными животными. Математическая обработка результатов включала в себя вычисление медианы, 25 % и 75 % процентиля. Достоверность отличий в группах определяли, используя критерии Вилкоксона для связанных и несвязанных выборок.

Результаты исследований и их обсуждение

Для поддержания нормального процесса ремоделирования костной ткани необходимо наличие соответствующего костномозгового микроокружения. Синтезируемые стромальными клетками и поступающие гуморальным путем цитокины играют существенную роль в процессах костного ремоделирования. Они включают в себя интерлейкины, факторы некроза опухоли, колониестимулирующие факторы и др. Трансформирующий фактор роста β (ТФР β) играет важную роль при образовании, ремоделировании и репарации кости. Было обнаружено, что ТФР β способен ингибировать

костную резорбцию, индуцируемую другими факторами, повышать активность щелочной фосфатазы. Однако в зависимости от условий культивирования и наличия других регуляторов роста ТФР β может играть роль ингибитора пролиферативных и биосинтетических процессов в тех же клетках, на которые он оказывал стимулирующий эффект.

Изменения гемопозитической активности сыворотки крови имеет место сразу после оперативного вмешательства. Однако в первые дни после операции активация гемопоза (по уровню ретикулоцитов) не столь значительна, как в период третьей и четвертой недели после начала distraction, когда по сравнению с дооперационным уровнем увеличение содержания ретикулоцитов в периферической крови экспериментальных животных достигает 300 % и более (Рис. 1). В последующие периоды происходит плавное снижение способности модифицированных компонентов крови пациентов с ахондроплазией стимулировать изменения количества ретикулоцитов в периферической крови мышей. К концу периода фиксации значения приближаются к дооперационным.

Изменения содержания моноцитов в периферической крови мышей имели схожий характер (Рис. 2). Наибольшие изменения фиксировались на 3 и четвертой неделе distraction. На более поздних сроках фиксации появляется тенденция к росту активности фракций, оказывающих влияние на активность пролиферации моноцитов.

Характерно подавление эритропоза у мышей в ответ на введение модифицированных компонентов сыворотки крови больных ахондроплазией. Сразу после операции происходит достоверное изменение исследованных показателей гемопоза. С началом distraction в сыворотке крови начинают преобладать компоненты, активизирующие процессы эритропоза. В сроки, следующие после 1 месяца distraction, происходит снижение этих показателей. Способность компонентов крови, активированной остеогенезом оказывать влияние на гемопоз, по всей видимости обусловлена наличием в ее составе повышенного уровня различных цитокинов и факторов роста.

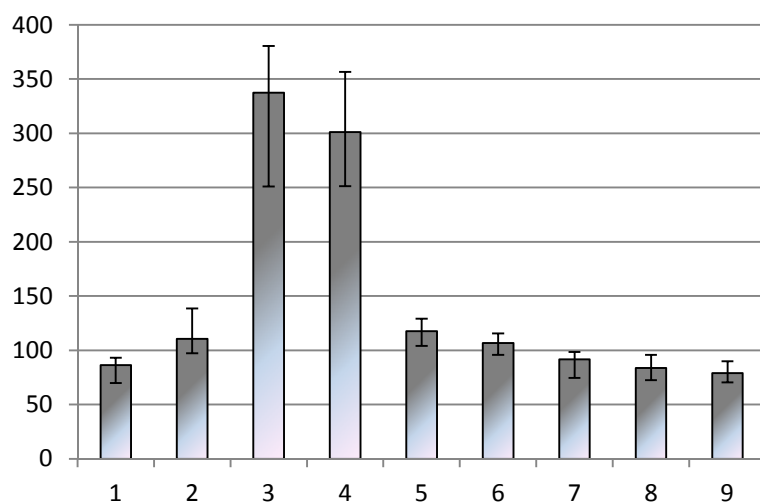


Рис.1. Изменение активации гемопоэза на этапах удлинения конечностей методом чрескостного дистракционного остеосинтеза по уровню ретикулоцитов на оси абсцисс – отмечены сроки лечения: (1 – до операции (n=18), 2 – 5 дней после операции (n=15), 3 – неделя дистракции (n=15), 4 – 1 месяц дистракции (n=17), 5 – 2 месяца дистракции (n=19), 6 – более 3 месяцев дистракции (n=14), 7 – 1 месяц фиксации (n=16), 8 – 3 месяца фиксации (n=12), 9 – после снятия аппарата (n=10))

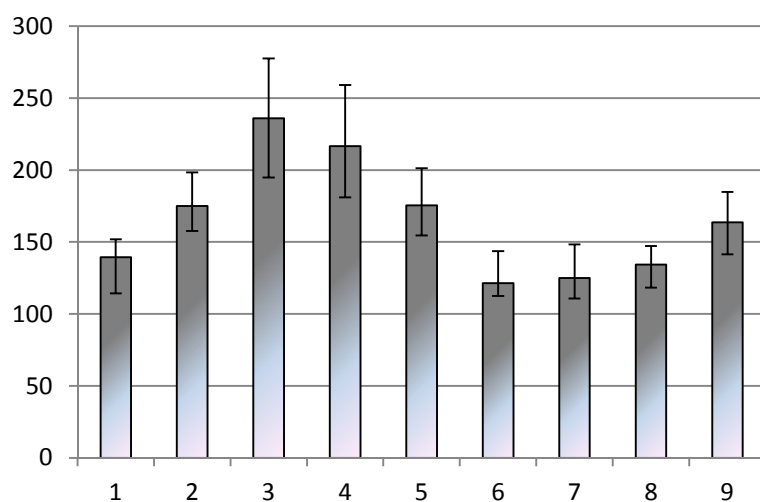


Рис.2. Изменение содержания моноцитов в периферической крови мышей, в ответ на введение компонентов сыворотки больных с ахондроплазией, на этапах удлинения конечностей методом чрескостного остеосинтеза на оси абсцисс – отмечены сроки лечения: (1 – до операции (n=18), 2 – 5 дней после операции (n=15), 3 – неделя дистракции (n=15), 4 – 1 месяц дистракции (n=17), 5 – 2 месяца дистракции (n=19), 6 – более 3 месяцев дистракции (n=14), 7 – 1 месяц фиксации (n=16), 8 – 3 месяца фиксации (n=12), 9 – после снятия аппарата (n=10))

Компоненты сыворотки крови больных ахондроплазией, выделенные по предлагаемой методике, подавляют эритропоэз у мышей. Сразу после операции происходит достоверное увеличение показателей гемопоэза, что говорит об активизации процессов ремоделирования в системе костной ткани.

С началом дистракции в сыворотке крови начинают преобладать компоненты, активизирующие процессы эритропоэза. В сроки, следующие после 1 месяца дистракции,

происходит снижение этих показателей. На более поздних сроках фиксации появляется тенденция к росту активности фракций, оказывающих влияние на активность пролиферации моноцитов, что может быть связано с активацией процессов ремоделирования новообразованной костной ткани. Полученные результаты иллюстрируют течение репаративного остеогенеза при ЧДО и согласуются с клиническими данными [6].

Продолжение исследований в этом направлении позволило бы сформировать группы ортопедических больных с различным характером течения репаративного процесса и на основе этого разработать критерии оценки регенераторного статуса пациентов.

Выводы

1. Внутривентриальное введение модифицированных компонентов сыворотки крови пациентов с ахондроплазией приводит к угнетению эритропоэза у мышей.
2. Модифицированные компоненты сыворотки крови пациентов с ахондроплазией, взятые в период 3 и 4 недели distraction, вызывают значительную активацию гемопоэза при внутривентриальном введении лабораторным мышам.
3. Предложенный способ биотестирования сыворотки крови пациентов ортопедического профиля, находящихся на этапах лечения методами чрескостного остеосинтеза, может быть использован в составе комплексной оценки протекания процесса костной регенерации.

Список литературы

1. Гребнева О.Л. Ускорение минерализации distractionного регенерата с помощью компонентов плазмы крови / О.Л. Гребнева, М.А. Ковинька, А.М. Аранович, Е.В. Осипова // Гений ортопедии. – 2010. – № 2. – С. 11–14.
2. Десятниченко К.С. Влияние белковых рострегулирующих факторов внеклеточного матрикса костной ткани на репаративный остеогенез и кроветворение / К.С. Десятниченко, Ю.П. Балдин, А.Н. Дьячков // Цитология. – 1989. – Т.31. – № 9. – С.92.
3. Дудин М.Г. Биотестирование сыворотки крови как метод диагностики типа идиопатического сколиоза у детей / М.Г. Дудин, Т.В. Авалиани, Д.Ю. Пинчук // Клиническая патофизиология. – 2006. – №1. – С. 12-19.
4. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002. – 544 с.
5. Оценка течения репаративного остеогенеза: Метод. рекомендации / РНЦ «ВТО» им. Г.А.Илизарова; Сост.: Ю.П. Балдин, К.С. Десятниченко. – Курган, 1991. – 23с.
6. Щукин А.А. Оценка результатов удлинения нижних конечностей у больных с системными заболеваниями скелета, сопровождающимися патологически низким ростом /

А.А. Щукин, А.М. Аранович, А.В. Попков, Д.А. Попков // Гений Ортопедии. – 2014. – № 2.
– С. 44–50.

7. Ястребов А.П., Осипенко А.В. Система крови и регенерация костной ткани. –
Свердловск: Изд-во Уральского ун-та, 1990. – 124 с.

Рецензенты:

Матвеева Е.Л., д.б.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «РНЦ «ВТО» имени академика Г. А.
Илизарова» Минздрава России, г. Курган;

Стогов М.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «РНЦ «ВТО» имени академика Г. А.
Илизарова» Минздрава России, г. Курган.