

Компоненты фракционированной плазмы крови и их роль в механизме оптимизации репаративного остеогенеза

О.Л. Гребнева, Д.В. Самусенко, М.А. Ковинька, С.Н. Лунёва

Components of fractionated blood plasma and their role in the mechanism of reparative osteogenesis optimization

O.L. Grebneva, D.V. Samusenko, M.A. Kavin'ka, S.N. Luneva

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр
"Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган
(директор — д. м. н. А. В. Губин)

Цель. Исследование фракционированной плазмы крови у пациентов с переломами костей конечностей на содержание ряда биологически активных веществ. **Материалы и методы.** Проведено исследование фракционированной по оригинальной методике плазмы крови на содержание ряда биологически активных веществ у 10 пациентов с переломами костей конечностей в послеоперационный период с помощью иммуноферментного анализа. **Результаты.** Обнаружено, что TGF- β 1, IGF-2, Ang-1 и -2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, FGF-acidic, SCF, VEGF-A, sVEGFR1/Flt-1, TGF- α , EGF и MSP содержатся в диапазонах концентраций 10-6 – 10-12 г/мл, биологически значимых для этих соединений. Ниже порога чувствительности методов определения оказались значения концентраций TGF- β 2, FGFb и SCF-sR. Предложен механизм участия биологически активных молекул в программе репаративного остеогенеза. **Заключение.** Более удачный вариант регенерации может быть обусловлен не только более грамотно проведенными хирургическими манипуляциями, но и воздействием биологически активных компонентов фракционированной плазмы крови (факторов роста, цитокинов и их рецепторов) в качестве участников афферентации системы регенерации костной ткани.

Ключевые слова: кость, перелом, регенерация, факторы роста, стимуляция остеогенеза.

Purpose. To study the fractionated blood plasma in patients with limb bone fractures for some biologically active substances. **Materials and Methods.** Blood plasma fractionated according to an original technique studied for containing some biologically active substances in 10 patients with limb bone fractures in the postoperative period using immunoferment analysis. **Results.** TGF- β 1, IGF-2, Ang-1 and -2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, FGF-acidic, SCF, VEGF-A, sVEGFR1/Flt-1, TGF- α , EGF and MSP revealed to be contained in the concentration ranges of 10-6 -10-12 g/ml biologically significant for these compounds. The values of TGF- β 2, FGFb and SCF-sR concentrations turned up to be below the sensitivity threshold of determination methods. The mechanism of participating biologically active molecules in reparative osteogenesis program proposed. **Conclusion.** More successful variant of regeneration may be determined not only by more competently made surgical manipulations, but also by the influence of biologically active components of fractionated blood plasma (growth factors, cytokines and their receptors) as participants of afferentation of bone tissue regeneration system.

Keywords: bone, fracture, regeneration, growth factors, osteogenesis stimulation.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее проведенными исследованиями было показано, что фракционированная плазма крови от доноров с активным остеогенезом способна ускорять течение репаративных процессов в костной ткани [2, 7]. На основании этого феномена были разработаны рекомендации для клинического применения такого способа стимуляции регенерации [6]. Однако грамотное применение способа ускорения репаративных процессов

сдерживается отсутствием полноты сведений о его механизмах. Возможно, что в комплекс действующих веществ входят молекулы полипептидной природы, влияющие на различные звенья обеспечения регенераторных процессов в костной ткани. Целью работы явилось исследование фракционированной плазмы крови у пациентов с переломами костей конечностей на содержание ряда биологически активных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты были проинформированы о предстоящих процедурах, в каждом случае получали согласие на их проведение, зафиксированное в истории болезни. Группу исследования составили 10 пациентов в возрасте 20-54 лет (6 мужчин, 4 женщины) с закрытыми оскольчатыми переломами бедренной кости. Группу сравнения составили 11 практически здоровых добровольцев в возрасте 21-38 лет (7 мужчин, 4 женщины). Забор венозной крови в количестве 6,0 мл проводили спустя 13,1 $\pm$ 3,4 суток после травмы. Плазму крови фракционировали. Отбирали аликвоты цельной и фракционированной плазмы и хранили при -75 $^{\circ}$ С для исследования на содержание биологически активных веществ (БАВ).

Определение содержания БАВ в образцах цельной и фракционированной плазмы крови проводили на иммуноферментном анализаторе ELX808 (Bio-Tek

Instruments, USA). Содержание ангиопоэтинов (Ang) 1 и 2, тромбоцитарных факторов роста (PDGF) AA, BB и AB, факторов роста фибробластов (FGF), кислого (acidic) и основного (basic) фактора стволовых клеток (SCF) и его растворимого рецептора SCF-sR, рецептора для фактора роста эндотелия сосудов (sVEGFR1/Flt-1), трансформирующего фактора роста (TGF)- α – иммуноферментными наборами фирмы «Quantikine» фирмы «R&D Systems», эпителиального фактора роста (EGF) – иммуноферментными наборами фирмы «Invitrogen», США, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A), трансформирующих факторов роста (TGF) β 1 и β 2 – иммуноферментными наборами фирмы «eBioscience», IGF-2 – иммуноферментными наборами фирмы «Immunodiagnostic systems», белка, стимулирующего макрофаги (MSP) – иммуноферментными набо-

рами фирмы «RayBiotech».

Фракционирование крови. Компоненты плазмы гепаринизированной крови выделяли по технологии, описанной ранее [6]. Плазму крови в количестве 3,0 мл разводили в два раза раствором NaCl 0,15 М, после чего проводили двукратное осаждение белков с помощью насыщенного раствора аммония сульфата с выделением осадка, преципитировавшего при 30-50 %-ном насыщении соли. Осадок растворяли в растворе мочевины 8 М и разделяли с помощью гель-проникающей хроматографии (хроматографическое оборудование фирмы LKB, Швеция) на колонке с носителем Toyopearl-HW 50F (TOYONAAS, Япония). Фракцию с относительной

молекулярной массой 20-30 kDa отделяли от низкомолекулярных примесей диализом против дистиллированной воды, лиофильно высушивали (оборудование Heto Liolab 3000, Германия) и стерилизовали потоком быстрых электронов на ускорителе ЛУЭ-8-5В (режим: 16-18 кГр). Полученные компоненты плазмы крови непосредственно перед инъекцией растворяли в 3,0 мл стерильного раствора NaCl 0,15 М. Аналогично растворяли аликвоты для исследования на содержание БАВ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрической статистики (W-критерий Вилкоксона), результаты представляли в виде медиан и квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, общепринятых значений норм для факторов роста и цитокинов не существует. Возможно, это является следствием их большой вариабельности, что показали наши исследования концентрации БАВ у группы сравнения (табл. 1). При сравнении величин БАВ между группами было обнаружено, что в плазме крови пациентов, несмотря на высокую вариабельность значений, содержатся достоверно более высокие концентрации трансформирующих факторов роста альфа и бета 1.

В составе фракционированной плазмы крови пациентов ниже порога чувствительности методов определения оказались значения концентраций трансформирующего фактора роста $\beta 2$, основного фактора роста фибробластов и растворимого рецептора для фактора стволовых клеток SCF-sR (табл. 2). Остальные БАВ (TGF- $\beta 1$, IGF-2, Ang-1, Ang-2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, FGF-acidic, SCF, VEGF-A, sVEGFR1/Flt-1, TGF- α , EGF и MSP) обнаружены в диапазонах концентраций 10-6-10-12 г/мл.

Таблица 1

Содержание биологически активных веществ в плазме крови здоровых людей и пациентов

	Значения в плазме крови								p
	здоровых людей				пациентов после травмы				
	n	Me	Кв1	Кв3	n	Me	Кв1	Кв3	
Ang-1 (ng/ml)	8	36,6	33, 5	45,9	11	42,6	35	49,1	0,4447
Ang-2 (ng/ml)	4	1,791	1,691	2,300	4	2,783	2,000	3,244	0,6477
EGF (pg/ml)	6	131,3	120,7	139,2	9	161,7	138,7	185,8	0,0677
FGF-acidic (pg/ml)	7	0	0	0,289	4	0	0	0,071	0,8477
FGF-basic (pg/ml)	9	0	0	2,69	8	7,63	0	13,78	0,1220
IGF-2 (μg/ml)	9	2,09	2,03	2,34	10	2,31	1,86	4,12	0,7133
MSP (ng/ml)	9	219,2	164,8	501,2	9	448,7	267,6	832,3	0,1124
PDGF-AA (ng/ml)	8	4,27	3,43	5,04	3	0,49	0,38	0,54	0,6098
PDGF-AB (ng/ml)	6	14,17	12,72	16,44	12	15,1	10,93	34,54	0,7430
PDGF-BB (ng/ml)	6	2,003	0,672	3,625	9	2,098	1,156	3,938	0,6800
SCF (ng/ml)	5	1,332	1,218	1,493	11	1,209	0,972	1,333	0,3275
SCF-sR (ng/ml)	6	12,79	11,17	12,98	7	9,23	6,91	10,83	0,0741
sVEGF-R1 (pg/ml)	7	62,4	0	76,8	9	56,6	0	73,6	0,9577
TGF-α (ng/ml)	8	6,61	4,8	8,43	4	35,33	27	47,35	0,0085
TGF-β1 (ng/ml)	9	1,111	0,508	7,758	8	27,511	19,644	40,160	0,0009
TGF-β2 (pg/ml)	9	1103,2	898,0	1351,6	1	47,15	47,15	47,15	-
VEGF-A (pg/ml)	7	432,0	342,1	641,4	9	233,3	121,9	958,3	1

Обозначения: Me – медиана, Кв1, Кв3 – 1-й и 3-й квартили значений соответственно; p – статистический уровень значимости различий по W-критерию Вилкоксона.

Таблица 2

Содержание биологически активных веществ во фракционированной плазме крови пациентов

	n	Медиана	1-й квартиль	3-й квартиль
Ang-1 (ng/ml)	7	18,6	15,5	69,6
Ang-2 (pg/ml)	5	187,6	0	323,3
EGF (pg/ml)	7	6,90	4,92	11,2
FGF-acidic (pg/ml)	8	127,1	57,1	226,8
FGF-basic (pg/ml)	6	0	0	0
IGF-2 (μ g/ml)	6	6,26	2,44	9,65
MSP (μ g/ml)	6	15,67	11,25	25,08
PDGF-AA (ng/ml)	6	7,64	5,94	8,71
PDGF-AB (ng/ml)	5	87,8	76,4	13,0
PDGF-BB (ng/ml)	7	14,80	7,77	18,34
SCF (pg/ml)	5	51,8	48,1	54,0
SCF-sR (ng/ml)	5	0	0	0
sVEGF-R1 (pg/ml)	10	0,24	0	4,32
TGF- α (pg/ml)	5	62,2	43,0	213,4
TGF- $\beta 1$ (ng/ml)	8	35,6	11,6	80,6
TGF- $\beta 2$ (pg/ml)	4	0	0	0
VEGF-A (pg/ml)	7	307,5	70,4	1024,6

Таким образом, исследование показало наличие во фракционированной плазме крови ряда факторов роста, их рецепторов и цитокинов в концентрациях, являющихся биологически значимыми для соединений этих классов. Несмотря на то, что влияние факторов роста на регенерацию костной ткани в экспериментальных и клинических условиях изучено довольно подробно [1, 8, 9, 10], исследователи вновь и вновь возвращаются к изучению их роли при нормальном течении процессов регенерации. Это вызвано, по-видимому, несоответствием между обнадеживающими эффектами применения различных стимуляторов *in vitro* и в экспериментах на животных и, с другой стороны, более чем скромными успехами от внедрения этих стимуляторов в клиническую практику [1]. Подобное сочетание феноменов получено и в наших исследованиях при применении инъекций фракционированной плазмы в клинику и эксперименте [2]. Корень этой проблемы, на наш взгляд, лежит в законах регенерации в рамках организма человека как целостной системы.

Как известно, схематично роль биологически активных соединений в регенерации костной ткани выглядит следующим образом [5]. Полипептидные факторы остеогенеза, в которые входят и факторы роста, депонированы в костном матриксе и способны высвобождаться в гуморальное русло как при физиологическом ремоделировании, так и при репаративном костеобразовании. При репаративной регенерации костная ткань подвергается более сильному разрушению, чем при физиологическом ремоделировании. Этот процесс участвует в формировании значительно более высоких концентраций в крови биологически важных костных регуляторов после травмы костной ткани. Воздействие высоких концентраций полипептидных факторов остеогенеза на дистантно расположенные клетки-мишени продолжается вплоть до осуществления ими своей части программы репаративной регенерации. После этого часть молекул переходит в неактивное состояние, в том числе сорбируется на вновь образующемся костном матриксе, и их концентрации приходят в диапазон, соответствующий физиологическому ремоделированию.

Мы полагаем, что введение во вновь образующуюся ткань костного регенерата полипептидных факторов остеогенеза необходимо рассматривать не только как фактор, действующий местно, но и как фактор дополнительной афферентации от места введения в центральное звено функциональной системы костной регенерации. Как следует из архитектоники функциональной системы, центральное звено составляют зоны коры и подкорковых образований, формирующие акцепторы результатов регенерации структур костной ткани и принимающие программу регенерации на основании информации в памяти и афферентного синтеза информации от рецептивных полей костной ткани. Программа регенерации, принимаемая центральным звеном, складывается как на основании функционального запроса от места повреждения (в норме – ремоделирования), так и на основании учета метаболического состояния других рецептивных полей костной ткани и всего организма в целом. Мы полагаем, что успешная работа физиологических систем, к числу которых относится и система регенерации костной ткани, зависит от степени «обре-

менности» организма патологическими системами (например, система пристрастия к курению), которые «оттягивают» на себя ресурсы организма. В случае расхода существенной доли ресурсов организма на патологические системы на различных стадиях осуществления программы регенерации возможно возникновение известных вариантов дисрегенераций – от замедленного сращения до ложного сустава [3].

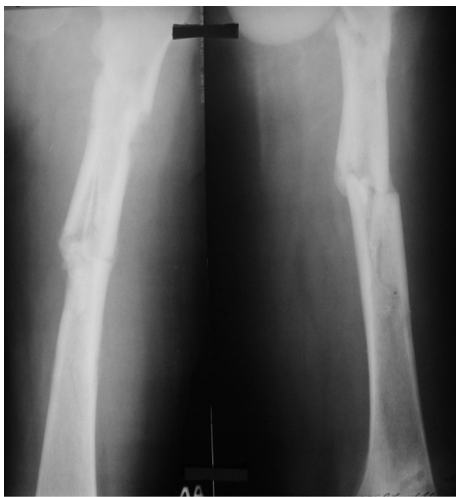
В наших исследованиях для будущего анализа эффективности действия фракционированной аутоплазмы мы формировали пары пациентов, обладающих схожим метаболическим фоном и характером травмы. Для иллюстрации приводим одну из пар клинических случаев.

Больной К., 28 лет. Поступил через 7 дней после травмы (прямая, автодорожная). Диагноз: закрытый двойной оскольчатый перелом средней трети диафиза левого бедра со смещением. Оперирован в ургентном порядке: закрытый чрескостный остеосинтез левого бедра аппаратом Илизарова. Репозиция в послеоперационном периоде в течение 7 дней. Получал ЛФК, возрастающую нагрузку на конечность. Проведен постепенный демонтаж аппарата. Аппарат снят на 142-е сутки.

На контрольном осмотре через 39 дней диагностирована трансформация регенерата с варусной деформацией бедра 30 градусов. Со слов больного, через две недели после снятия резко поднял ногу из горизонтального положения. Произведен реостеосинтез, фиксация в течение 90 дней (рис. 1).

Больной М., 27 лет. Поступил через 2 дня после травмы (непрямая, бытовая). Диагноз: закрытый двойной продольно расколотый перелом правого бедра в средней трети диафиза со смещением. Оперирован в ургентном порядке: закрытый чрескостный остеосинтез правого бедра аппаратом Илизарова. Репозиция на операционном столе. С целью ускорения заполнения межосколкового диастаза на 80-е сутки после травмы ввели компоненты аутоплазмы (кровь взята на 15-е сутки). В послеоперационном периоде использовали способы и приемы, стимулирующие созревание контактного костного регенерата: лечебную физкультуру, возрастающую нагрузку на конечность, постепенный демонтаж аппарата. Аппарат снят на 145-е сутки. Результат изучен через 2 месяца (рис. 2). Ходит при помощи 1 трости. Объем движений в коленном суставе: сгибание 90, разгибание 180 градусов. Полного заполнения межосколкового диастаза на этом сроке не произошло, однако на стыке промежуточных осколков с костными отломками по совокупности признаков определяется прочное костное сращение [4].

Таким образом, в обоих приведенных случаях наблюдался практически одинаковый срок фиксации; однако в случае без применения инъекций с компонентами аутоплазмы отмечали трансформацию регенерата с варусной деформацией бедра. Конечно, при схожести исходного состояния обоих пациентов невозможно говорить об абсолютном тождестве метаболического фона и проведения лечебных мероприятий. Однако, вероятно, что более удачный вариант регенерации может быть обусловлен не только более грамотно проведенными хирургическими манипуляциями, но и воздействием биологически активных компонентов фракционированной плазмы крови (факторов роста, цитокинов и их рецепторов) в качестве участников афферентации системы регенерации костной ткани по приведенному выше механизму.



а



б

Рис. 1. Рентгенограммы бедра больного К. в прямой и боковой проекциях: а – в день снятия аппарата; б – при повторном поступлении с рефрактурой



а



б

Рис. 2. Рентгенограммы бедра пациента М. через 2 месяца после снятия аппарата: а – прямая проекция; б – боковая проекция

ЛИТЕРАТУРА

1. Булатов А. А., Савельев В. И., Калинин А. В. Применение костных морфогенетических белков в эксперименте и клинике // Травматология и ортопедия России. 2005. № 1. С. 46-52.
Bulatov AA, Savel'ev VI, Kalinin AV. Primenenie kostnykh morfogeneticheskikh belkov v eksperimente i klinike [Experimental and clinical use of bone morphogenetic proteins]. Travmatologiya i ortopediya Rossii. 2005;(1): 46-52.
2. Гребнева О. Л. Ускорение минерализации дистракционного 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.
Grebneva OL, Kovin'ka MA, Aranovich AM, Osipova EV. Uskorenie mineralizatsii distraktsionnogo regenerata s pomoshch'yu komponentov plazmy krvi [Acceleration of distraction regenerate bone mineralization with blood plasma components]. Genij ortopedii. 2010;(2):11-14.
3. Корнилов Н. В., Аврунин А. С. Восстановление динамического равновесия в области травматического поля // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. № 4. С. 77-80.
Kornilov NV, Avrunin AS. Vosstanovlenie dinamicheskogo ravnovesiya v oblasti travmaticheskogo polia [Recovery of dynamic balance in traumatic field zone]. Ortopediya, travmatologiya i protezirovaniye. 2000;(4):77-80.
4. Чрескостный остеосинтез при лечении оскольчатых переломов / В. И. Шевцов, С. И. Швед, Ю. М. Сысенко. Курган, 2002. 331 с.
Shevtsov VI, Shved SI, Sysenko IuM. Chreskostnyi osteosintez pri lechenii oskol'chatykh perelomov [Transosseous osteosynthesis in treatment of comminuted fractures]. Kurgan. 2002. 331 s.
5. Щепеткин И. А. Полипептидные факторы остеогенеза // Успехи современной биологии. 1994. Т. 114, Вып. 4. С. 454-466.
Shchepetkin IA. Polipeptidnye faktory osteogeneza [Osteogenesis polypeptide factors]. Uspekhi sovremennoi biologii. 1994;114 (4):454-466.
6. Ускорение костной регенерации экстракорпорально модифицированной аутоплазмой : мед. технология / ФГУН "РНЦ "ВТО" им. акад. Г. А. Илизарова Росздрава" ; сост. : А. В. Попков, М. А. Ковинька, О. Л. Гребнева, Д. А. Попков, И. А. Талашова. Курган, 2006. 9 с.
Popkov AV, Kovin'ka MA, Grebneva OL, Popkov DA, Talashova IA. Uskorenie kostnoi regeneratsii ekstrakorporal'no modifitsirovannoi autoplazmoi : med. tekhnologiya [Acceleration of bone regeneration extracorporeally using modified autoplasm: medical technology]. FGUN "RNTs "VTO" im. akad. G. A. Ilizarova Roszdrava". Kurgan. 2006. 9 s.
7. Способ стимуляции репаративного остеогенеза : пат. 2193868 Рос. Федерация. № 98105940/14 ; заявл. 26.03.1998 ; опубл. 10.12.2002, Бюл. 34.
Pat. 2193868 RF. Sposob stimulatsii reparativnogo osteogeneza [A technique for reparative osteogenesis stimulation]. № 98105940/14 ; zaiaavl. 26.03.1998 ; opubl. 10.12.2002. Biul. 34.
8. Kanitkar M, Tailor HD, Khan WS. The use of growth factors and mesenchymal stem cells in orthopaedics. Open Orthop J. 2011; 5 (Suppl 2):271-275.
9. Kempen DHR, Creemers LB, Alblas J, Lu L, Verbout AJ, Yaszemski MJ, Dhert WJA. Growth factor interactions in bone regeneration. Tissue Eng. Part B Rev. 2010;16(6):551-566. doi: 10.1089/ten.teb.2010.0176.
10. Nordsletten L, Madsen JE. The effect of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Scand J Surg. 2006;95(2):91-94.

Рукопись поступила 09.10.2012.

Сведения об авторах:

1. Гребнева Ольга Леонидовна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, с. н. с. клинко-экспериментального лабораторного отдела, к. б. н.; e-mail: olgrebneva@bk.ru.
2. Самусенко Дмитрий Валерьевич – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, с. н. с. научно-клинической лаборатории травматологии, к. м. н.; e-mail: dvsamusenko@mail.ru.
3. Ковинька Михаил Александрович – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, с. н. с. клинко-экспериментального лабораторного отдела, к. б. н.; e-mail: mkovinka@mail.ru.
4. Лунёва Светлана Николаевна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, руководитель клинко-экспериментального лабораторного отдела, д. б. н.; e-mail: luneva_s@mail.ru.