

УДК 611—018.4+616—089.843

А. А. ХАНИН, Л. Г. ПЕТРОСЯН, А. В. ТЕВОСЯНЦ

## ЭКТОПИЧЕСКИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МАТРИКСА

В опытах на белых крысах проводилась гетеротопическая имплантация аллогенного костного матрикса. Применяя морфологические, гистохимические и количественные методы исследования, авторы пришли к выводу, что костный матрикс в подавляющем большинстве случаев является эффективным индуктором остеогенеза.

В последние годы весьма успешно развиваются исследования индукционного остеогенеза. В частности, особый интерес представляет экспериментальная модель эктопического остеогенеза с использованием в качестве индуктора девитализированной кости и костного матрикса [3, 5, 8, 10, 19, 20]. Некоторые авторы считают девитализированную кость индуктором остеогенеза [15, 16, 17], большинство же исследователей это положение или отрицали, или же наблюдали феномен индукции в незначительном объеме [2, 9, 11, 13, 14, 18, 19]. Это обстоятельство способствовало пересмотру роли минерального компонента имплантируемой кости в индукции остеогенеза. Было выдвинуто предположение, что прочная связь неорганических солей с матриксом препятствует контакту индуцибельных клеточных элементов с остеоиндуктивным фактором [9, 12, 21].

Изложенное обусловило использование нами в настоящем исследовании в качестве индуктора остеогенеза кости, лишенной минерального компонента (костный матрикс).

### Материал и методы исследований

У растущих белых крыс «Wistar» после декапитации извлекались бедренные кости, которые очищались от мягких тканей и костного мозга, обезжиривались в эфире, а затем декальцинировались в 0,3 М трихлоруксусной кислоте при температуре 4°C. Контроль за декальцинацией проводился с помощью оксалата аммония и гистохимической реакции на кальций по Косса. Перед имплантацией матрикс промывался стерильным холодным физиологическим раствором до установления pH в пределах 7,1—7,2. Подготовленные таким образом фрагменты матрикса разрезались на продольные части весом 20—30 мг, которые имплантировались крысам-реципиентам в мышцы передней брюшной стенки. Всего 52

подопытным животным было произведено 79 имплантаций аллогенного костного матрикса. Материал для исследования забирался на 7, 14, 21, 30, 60 и 90-е сутки. Часть извлеченных из мышц имплантатов высушивалась, озолялась, и в золе (избирательно) биохимически определялся кальций. Весовые показатели, полученные после высушивания и озоления имплантатов, обрабатывались методом математической статистики по Стьюденту-Фишеру. Другая часть имплантатов исследовалась гистологически и гистохимически. Имплантаты фиксировались в жидкости Карнуа, декальцинировались при температуре 4°C в 5% трихлоруксусной кислоте, а затем заливались в парафин. Парафиновые срезы, толщиной 5—7 мк окрашивались гематоксилин-эозином и по Ван Гизону. Выборочно срезы окрашивались аzur-эозином по Максиму. Для гистохимического выявления гликогена и нейтральных гликозаминогликанов проводили ШИК-реакцию с использованием для ферментативного контроля амилазы. Кислые гликозаминогликаны окрашивали толуидиновым и алциановым синим. РНК выявлялась по методу Браше с соответствующим ферментативным контролем. Кальций определялся по методу Косса только в имплантатах, извлеченных в ранние сроки исследования (7-, 14-, 21-й день). Для этой цели использовались замороженные срезы недекальцинированных свежих образцов. Кроме того, нами в криостатных срезах декальцинированных имплантатов выявлялись АТФ-аза по методу Падикула и Германа, сукцинат- и лактатдегидрогеназы по методу Нахласа с соавторами и щелочная фосфатаза по методу Гомори. Декальцинация этих образцов ткани проводилась в 10% забуференной ЭДТА (рН 7,2) при температуре 2—4°C.

### Результаты исследования

Наши опыты показали, что матрикс кортикальной обезжиренной кости диафиза бедра растущих крыс содержит  $43,6 \pm 0,9\%$  сухого вещества. При сжигании образцов матрикса зола не обнаруживается (рис. 1). В постимплантационном периоде костный матрикс подвергается интенсивной резорбции, в ранние сроки с участием сегментоядерных лейкоцитов. В полость резорбции проникают капилляры и многочисленные крупные мезенхимоподобные клетки с овальным светлым ядром (рис. 2а). Такие же клетки располагаются и на периферии имплантатов. В непосредственной близости к матриксу они обогащаются щелочной фосфатазой, сукцинатдегидрогеназой и АТФ-азой. Подъем активности этой группы ферментов сочетается с базофилией цитоплазмы, накоплением в ней РНК, гликогена, кислых гликозаминогликанов и амилазоустойчивой ШИК-положительной субстанции. Уже на 14-е сутки видны скопления остеогенных клеток, замурованных в гомогенном межклеточном веществе, отличающемся интенсивной метахромазией и яркой диффузной окраской при постановке ШИК-реакции. На этой стадии гистогенеза происходит формирование дефинитивной костной ткани. Дифференцирующиеся остеобласты уменьшаются в размере и приобретают отрост-

чатую форму. Кальций в основном веществе выявляется на ранних стадиях остеогенеза, и по его отсутствию можно судить о завершающих этапах обызвествления органической основы. Очаги аппозиционного по отношению к полостям резорбции остеогенеза затем увеличиваются как

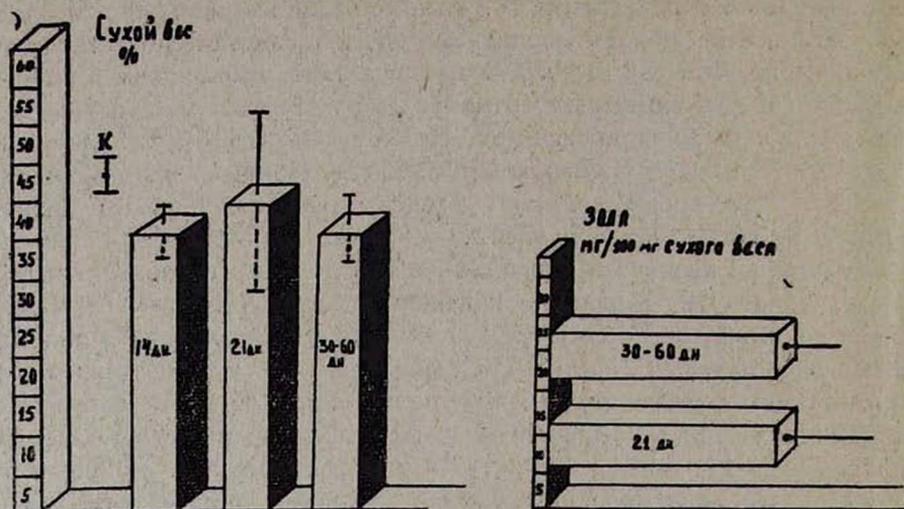


Рис. 1. Показатели сухого веса и золы имплантированного в мышцы аллогенного костного матрикса.

в размере, так и в количестве синхронно с процессом миграции в резорбирующиеся участки матрикса новых генераций мезенхимоподобных клеток (рис. 2 б).

Наряду с остеогенезом в матриксе уже на 7—14-е сутки отмечается и хондрогенез, который имеет место в аваскулярных участках гаверсовых и фолькмановских каналов, в небольших резорбированных участках матрикса и редко—на периферии имплантата (рис. 2 г). Хондробласты богаты РНК, лактатдегидрогеназой, АТФ-азой, кислыми и нейтральными полисахаридами, которые накапливаются и в межклеточном веществе. На 14-е сутки в части очагов хондрогенеза хрящевые клетки гипертрофируются, распадаются с вакуолизацией цитоплазмы, накоплением в ней глыбок гликогена, кариопикнозом и кариорексисом ядер. Интерцеллюлярно и на периферии этих очагов обнаруживается щелочная фосфатаза. Здесь же выявляются массивные отложения кальция (рис. 2 в).

Впоследствии в дегенерирующем обызвествленном хряще происходит энхондральный остеогенез с образованием нередко обширных полей грубоволокнистой кости. К 30-м суткам неохондрогенез резко уменьшается и превалирует энхондральный и аппозиционный остеогенез. На 90-е сутки остаются лишь незначительные участки старого матрикса, и большая часть имплантата представлена пластинчатой костью с очагами грубоволокнистой (рис. 2 д). Одновременно происходит перестройка грубоволокнистой кости с образованием сосудистых каналов и формированием первичных гаверсовых систем. Следует отметить, что неогенез к этому

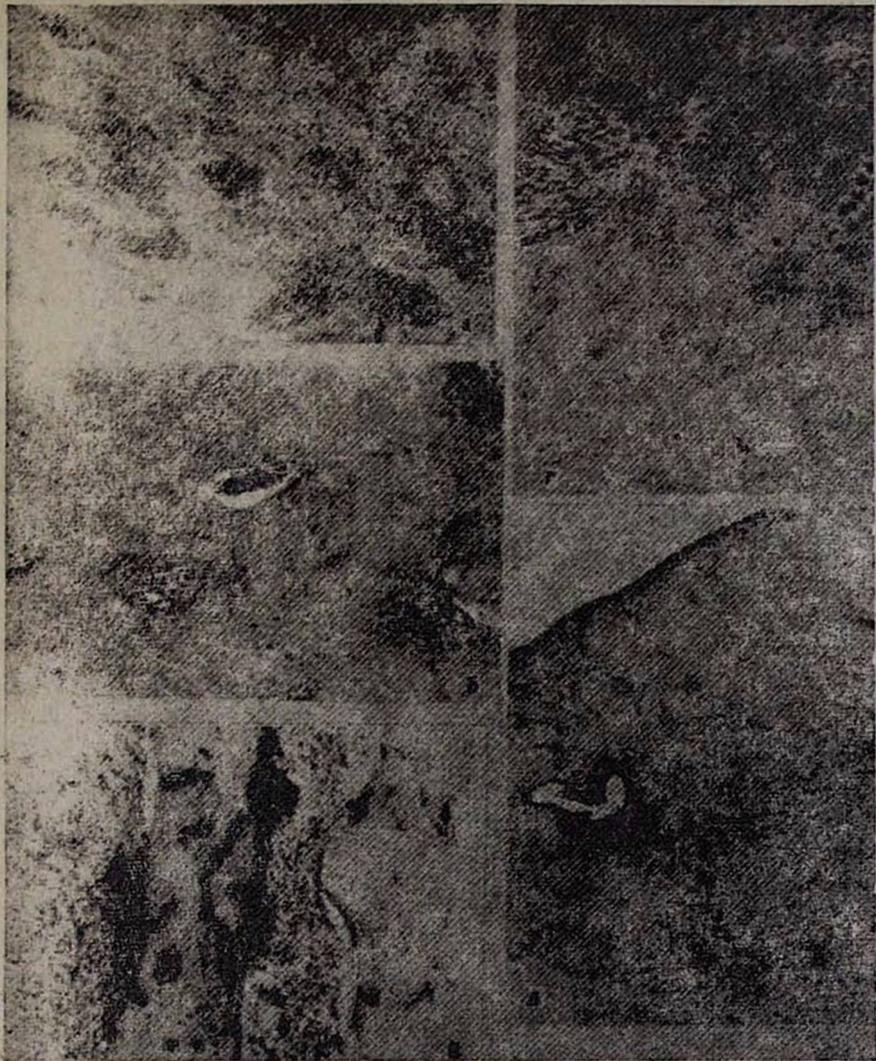


Рис. 2. Постимплантационный эктопический остеогенез в аллогенном костном матриксе. а) в резорбированных участках безостеоцитного матрикса на 7-е сутки видны скопления крупных мезенхимоподобных клеток. Гематоксилин-эозин. Ув. 600; б) к месячному сроку видны очаги аппозиционного остеогенеза и участки грубоволокнистой кости. Гематоксилин-эозин. Ув. 130; в) скопление кальция в очагах хондро- и остеогенеза на 14-е сутки после имплантации костного матрикса. Окраска по Косса с докрасиванием сафранином. Ув. 30; г) 14-й день после имплантации матрикса. Видны очаги хондрогенеза в гаверсовых каналах и в узком участке полости резорбции. Ван Гизон. Ув. 130; д) к 3-месячному сроку имплантированный костный матрикс большей частью замещен новообразованной костной тканью. Гематоксилин-эозин. Ув. 30.

сроку полностью не затухает, и наблюдаются, правда, в незначительном объеме, аппозиционный остеогенез и редкие скопления хрящевых клеток.

Наряду с этим в 5 случаях новообразованная кость содержала очаги гемопоэза, локализовавшиеся чаще в 2—4 ограниченных полостях.

Таблица

Остео- и хондрогенез в имплантатах аллогенного  
костного матрикса

Сроки исследования (в днях)	Аллогенный матрикс		
	общее число имплантатов	хондрогенез	остеогенез
7	7	6	—
14	11	10	10
21	9	9	8
30	11	10	10
60	9	9	8
90	8	8	8

В целом, при эктопической имплантации аллогенного костного матрикса, как видно из таблицы, хондро- и остеогенез развивались в подавляющем большинстве случаев. Причем остеогенез как морфологический признак постимплантационного процесса варьирует в незначительных пределах. В совокупности выборки (исключая 7-дневный срок) он наблюдается в 44 из 48 имплантатов, что составляет 91,8% случаев. Данные морфологических исследований подтверждаются и количественно. Из рис. 1 видно, что интенсификация неогенеза к 21-ым суткам приводит к восполнению утерянного при резорбции сухого веса имплантатов, а дифференциация новообразованных костных структур—к появлению в них золы в пределах 8,8 мг/100 мг сухого веса. В контрольных пробах золы биохимически определялся кальций. Дальнейшая дифференцировка новообразованной костной ткани, формирование отдельных полостей резорбции и сосудистых каналов сопровождается некоторым уменьшением сухого веса имплантатов на 30—60-е сутки, однако минерализация возрастает более чем в 2 раза.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что аллогенный костный матрикс крыс обладает выраженными остеоиндуктивными свойствами. Проникающие в имплантат в процессе резорбции соединительнотканые клеточные популяции, контактируя с матриксом, дифференцируются в сторону хондро- и остеогенеза со специфической для такого рода генеза цитохимической характеристикой. В результате аллогенный матрикс в короткие сроки замещается структурированной костной тканью с очагами гемопоэза. Если факт эктопической индукции можно считать очевидным, то вопрос происхождения скелетогенных индуцибельных клеток-предшественников остается открытым.

В настоящее время, помимо теоретических проблем, возникших в результате установления феномена аутоиндукции костной ткани в постнатальном периоде, весьма перспективна, на наш взгляд, постановка и практических задач. Опыт Ереванского НИИ травматологии и ортопедии [1, 4, 6, 7] показывает, что костный матрикс можно с успехом использовать при восстановительно-реконструктивных операциях у ортопедотравматологических больных.

Ереванский научно-исследовательский институт травматологии  
и ортопедии им. проф. Х. А. Петросяна

Поступила 8/VII 1978 г..

Ա. Ա. ԽԱՆԻՆ, Լ. Գ. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ- Ա. Վ. ՔԵՎՈՍՅԱՆՑ

### ԱՐՏԱՏԵՎԱՅԻՆ ՈՍԿՐԱՌԱԶԱՑՈՒՄԸ ՈՍԿՐԱՅԻՆ ՄԱՏՐԻՔՍԻ ՆԵՐՊԱՏՎԱՍՏՄԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

52 սպիտակ առնետների վրա անց է կացվել արագին ոսկրային մատրիքի ալլատեղ ներպատվաստում: Մոխրացված ներպատվաստների և կշռային ցուցանիշների ուսումնասիրության ճանապարհով կատարվել են հետնորդապատվաստային պրոցեսների մորֆոլոգիական, հիստոքիմիական և քանակական ուսումնասիրություններ: Փորձի արդյունքները ցույց տվեցին, որ ոսկրային մատրիքը օժտված է արտահայտված ոսկրա-ինդուկցիոն հատկություններով: Շարակցահյուսվածքային բջջային պոպուլյացիաները ռեզորբցիայի պրոցեսներում ներթափանցում են ներպատվաստի մեջ, կապի մեջ մտնում մատրիքի հետ և դիֆերենցվում կոնդիլի և ոսկրի առաջացման ուղղությամբ, որն էլ բնութագրվում է իրեն յուրահատուկ բիոսինթետիկական ցուցանիշներով: Այսպիսով, արդյունքում ստացվում է, որ արագին ոսկրային մատրիքը կարճ ժամկետներում փոխարինվում է հեմոպոեզի օջախներով կառուցվածքային ոսկրային հյուսվածքով:

A. A. KHANIN, L. G. PETROSYAN, A. V. TEVOSYANTS

### ECTOPIC OSTEOGENESIS IN IMPLANTATION OF A BONE MATRIX

Heterologous implantation of an allogenic bone matrix was conducted on albinorats. Using morphological, histochemical and quantitative methods of investigation, the authors came to the conclusion, that a bone matrix, in many cases, is an effective inductor of osteogenesis.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аствацатурян А. А., Вартанян Ш. Г., Кананян Б. К., Агазарян Ш. М. Тез. докл. Республиканской научной конф., посв. 30-летию ЕрНИИТО и 60-летию Великой Октябрьской социалистической революции. Ереван, 1977, стр. 63.
2. Костандян Л. И., Голикова Н. А. Экспериментальная хирургия, 1966, 5, стр. 65.
3. Лалькина К. С., Фриденштейн А. Я. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 1972, 74, 11, стр. 88.

4. Мгоян Г. Х., Амбарян Р. С., Чилингарян С. А. Тез. докл. Республиканской научной конф., посв. 30-летию ЕрНИИТО и 60-летию Великой Октябрьской социалистической революции. Ереван, 1977, стр. 17.
5. Мелик-Тангян Д. В., Чоликян С. К., Тевосян А. В., Петросян Л. Г. Тез. докл. I научн. конф. морфологов Еревана, посв. 25-летию организации Ереванского отделения Всесоюзного научного общества АГЭ. Ереван, 1977, стр. 34.
6. Минасян А. Г., Мандриkyн Э. А., Ханин А. А., Агазарян Ш. М., Агаджанян Н. Б. Тез. докл. Республиканской научной конф., посв. 30-летию ЕрНИИТО и 60-летию Великой Октябрьской социалистической революции. Ереван, 1977, стр. 58.
7. Осемян И. А., Ханин А. А., Минасян А. Г., Аракелов Г. С., Агазарян Ш. М., Мандриkyн Э. А., Тевосянц А. В. Там же, стр. 65.
8. Ханин А. А., Мелик-Тангян Д. В., Чоликян С. К., Баюшева Э. И., Аракелов Г. С. Тез. докл. научной конф. ЕрНИИТО. Ереван, 1976, стр. 85.
9. Ханин А. А., Чоликян С. К., Петросян Л. Г., Тевосян А. В. Ж. экспериментальной и клинической медицины АН Арм. ССР, 1977, 3, стр. 34.
10. Ханин А. А. Тез. докл. I научн. конф. морфологов Еревана, посв. 25-летию организации Ереванского отделения Всесоюзного научного общества АГЭ. Ереван, 1977, стр. 48.
11. Andersen K. Transpl. Bull., 1959, 24, 1:198.
12. Bang G., Urist M. R. Arch. Surg., 1967, 94, 6:781.
13. Bruyh P. P., Kabish W. T. Am. J. Anat., 1955, 96:375.
14. Campbell C. J., Brower T., McFadden D., Payne E., Doherty J. J. Bone Jt. Surg., 1953, 35—A:332.
15. Chalmers J. J. Bone Jt. Surg., 1959, 41—B, 1:110.
16. Huggins Ch., Reddi A. A. Cell. Proc. Growth, develop. and different proc. symp. Bhabha Atom Res. Cent. Bombay., 1972:209.
17. Ray R., Holloway J. J. Bone Jt. Surg., 1957, 39—A, 5:1119.
18. Urist M. R., McLean F. J. Bone Jt. Surg., 1952, 34—A:443.
19. Urist M. R. Science, 1965, 150, 12:893.
20. Urist M. R., Hisashi S., Boyd S. D., Ceccotti P. L. J. Histochem., Cytochem. 1974, 22, 2:88.
21. Veromans J. D., Urist M. R. Arch. Oral. Biol., 1967, 12, 7:999.