

THE MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE THYMUS: UNDER THE INFLUENCE OF THE HYPERBARIC FACTOR

The histochemical and morphometric analysis of the thymus under the influence of hyperbaric factor has been carried out.

It is established that the single hyperbaric influence on the organism does not cause in experimental animals' thymus significant affections.

УДК 616.71—018.2—089.843

И. А. ОСЕПЯН, А. В. ТЕВОСЯНЦ, Р. К. ЧАЙЛАХЯН,
А. А. САРКИСЯН, Н. Н. ГЕВОРКЯН

ПЛАСТИКА НЕРЕГЕНЕРИРУЮЩИХ ДЕФЕКТОВ КОСТЕЙ ЧЕРЕПА ИМПЛАНТАЦИЕЙ КОСТНОМОЗГОВЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В СОЧЕТАНИИ С ГУБЧАТЫМ КОСТНЫМ МАТРИКСОМ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Культивированные *in vitro* костномозговые фибробласты, в последующем перенесенные на губчатый костный матрикс, явились эффективным стимулирующим имплантатом репаративного генеза. Оценка проведенного эксперимента произведена с помощью количественных, морфологических и биохимических тестов исследований.

Метод монослойного культивирования взвеси клеток костного мозга позволил выделить популяцию остеогенных клеток-предшественников [3, 4, 5], которые, реализуя свои костеобразовательные потенции, не нуждаются в дополнительных индукционных воздействиях. При трансплантации костномозговых фибробластов в диффузионные камеры [1, 3, 4, 5, 7] или в открытую систему (подпочечную капсулу) развивается кость, либо кость с гемопоэзом [6, 8, 9].

Исходя из вышеизложенного, представляет интерес возможность использования остеогенных свойств костномозговых фибробластов при имплантации в топический очаг, как например, в дефект костной ткани. Нами была выбрана модель больших дефектов свода черепа, не обладающих регенерацией. В них имплантировали массу аутологичных костномозговых фибробластов, помещенных в пористый каркас (костный матрикс).

Целью настоящего эксперимента было изучить характер и динамику замещения костного дефекта черепа при имплантации костномозговых фибробластов в сочетании с губчатым костным матриксом, дать количественную и качественную оценку постимплантационному генезу с применением морфологических и биохимических тестов исследования.

Материал и методы

Опыты проводили на 116 половозрелых кроликах Новозеландской и Калифорнийской породы массой 2—3 кг. Под нембуталовым наркозом с помощью циркулярного электротрепана вырезали и удаляли участок правой теменной кости диаметром 12—13 мм, куда вводили костномоз-

товые фибробласты, выращенные по методике, разработанной в лаборатории иммуноморфологии НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР. Методика культивирования костномозговых фибробластов заключалась в следующем. У кроликов под местной анестезией (0,25% новокаин) резецировали часть фрагмента правой подвздошной кости. Кость рассекали на две части и содержимое медуллярной полости выскабливали в культуральную среду 199. Полученные костномозговые клетки засевали во флаконы РУ с площадью дна 62 см^2 из расчета 10^5 клеток на 1 см^2 . Культивирование проводили на синтетических средах (199, Игла) с добавлением 20% инактивированной кроличьей сыворотки. Каждый флакон, содержащий 80% среды и 20% сыворотки, продували 5% CO_2 и помещали в термостат при температуре 37°C . На 7—8-е сутки культивирования во флаконах РУ образовывались колонии фибробластоподобных клеток в количестве 50 и более. С целью наращивания численности фибробластов проводили ряд последовательных пассажей, в результате которых последние не утрачивали свои остеогенные свойства. Перед имплантацией клетки снимали со стекла, готовили клеточную суспензию, подсчитывали число клеток, затем центрифугировали и осадок набирали на губчатый костный матрикс. Приготовление губчатого костного матрикса проводили по методике, разработанной в ЕрНИИТО [2]. Благодаря своей эластичности, пористости губчатый костный матрикс хорошо впитывает и удерживает фибробласты.

Гистологические исследования. Изучение процесса регенерации дефекта свода черепа производили в динамике на 7, 14, 21, 30, 90 и 180-е сутки. В указанные сроки животных выводили из эксперимента и забивали путем воздушной эмболии. Изъятые после забоя тканевые блоки, включающие в себя материнскую кость и регенерат, фиксировали в 10% растворе формалина или Карнуа, деминерализовали в 5% растворе трихлоруксусной или 5% растворе азотной кислоты. После этого следовала обычная гистологическая проводка с последующей заливкой в парафин. Парафиновые срезы толщиной 7—10 мк окрашивали гематоксилин-эозином, по ван Гизону и толудиновым синим при pH—4,8 (для выявления кислых гликозаминогликанов). Для выявления нейтральных гликозаминогликанов и гликогена проводили ШИК-реакцию с использованием ферментативного контроля на амилазу. Срезы подвергали микроскопическому анализу.

Биохимические исследования. В сыворотке крови в указанные сроки определяли: сиаловые кислоты по Qess, активность щелочной фосфатазы и неорганический фосфор по Боданскому, кальций и магний с помощью диагностических чехословацких наборов «La cheta». Для количественного анализа процесса регенерации дефекта теменной кости животных выкроенные трансплантаты (образцы брали без захвата зоны ложа реципиента) взвешивали на аналитических весах и помещали в термостат на 24 часа при температуре 57°C для удаления влаги, затем повторно взвешивали для определения сухого веса, после чего образцы подвергали озолению в муфельной печи при 800° в течение часа и в них определяли вес зольных остатков. Цифровые данные обрабатывали ме-

тодом математической статистики по Стьюденту-Фишеру с определением доверительных границ при уровне значимости 0,01.

Результаты и обсуждение

В I серии эксперимента дефект теменной кости черепа оставляли без замещения (контроль). Во II серии—в дефект имплантировали аутологичные костномозговые фибробласты при концентрации $3,2 \times 10^6 \pm \pm 0,2 \times 10^9$ на губчатом матриксе.

Микроскопические исследования в контрольной группе показали, что созданный у кроликов дефект свода черепа в ранние сроки неизменен. К 30-ым суткам он замещается васкуляризованной грануляционной тканью, которая через 2 месяца дифференцируется в рубцовую. К концу эксперимента появляются признаки регенерации со стороны краевой части материнской кости, однако центр дефекта представлен грубоволокнистой костью, плотной и рыхлой соединительной тканью.



Рис. 1.

Во II серии эксперимента, где в дефект теменной кости черепа имплантировали губчатый костный матрикс в сочетании с костномозговыми фибробластами, на 7—14-е сутки микроскопическое исследование показало, что в пространстве между балками костного матрикса располагались активно растущие фибробласты. По краю имплантата, а также в области ложа наблюдались участки неоостеогенеза. В центральных участках имплантата пересаженные клетки погибали. Характерным на 21—30-е сутки постимплантационного периода генеза является нарастание процесса неоостеогенеза как в области ложа, так и в центральных участках имплантата, появление среди ретикулярной ткани вновь образованных костномозговых островков с гемопоэтическими элементами (рис. 1). На 60—90-е сутки в области ложа происходит образование пластинчатой кости с вполне сформированными гаверсовыми каналами. В центральных участках регенерата процесс неоостеогенеза нарастает по сравнению с предыдущими сроками, однако еще сохраняются балки незамещенного матрикса (рис. 2). К концу эксперимента, т. е. к 180-му

дно в области ложа регенерата костномозговая полость полностью восстановлена и заполнена костным мозгом. Дефект замещен перестроенной костной тканью, в пространстве между балками костной ткани—

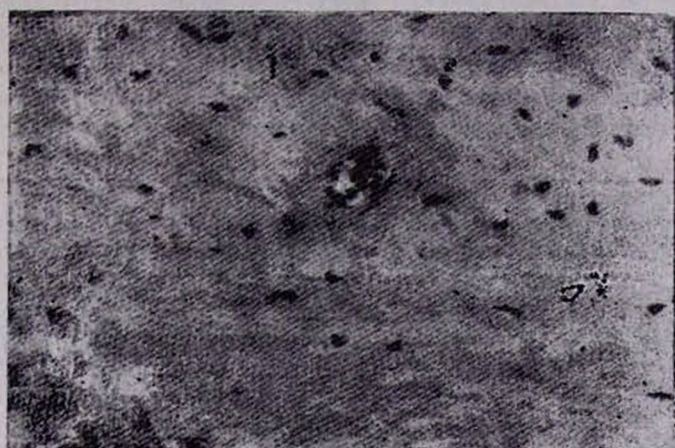


Рис. 2.

хорошо развитый костный мозг. Остатки имплантированного матрикса почти отсутствуют (рис. 3.).

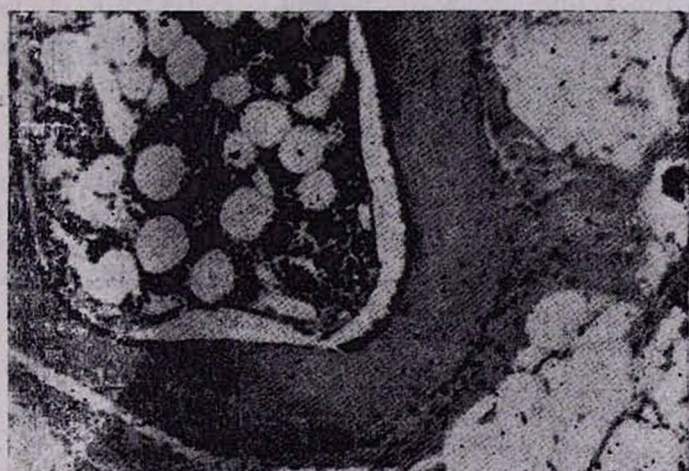


Рис. 3.

Биохимические исследования в динамике явились подтверждением микроскопической картины постимплантационного генеза. Известно, что углеводсодержащие белки, являясь основным материалом, из которого построено межклеточное вещество соединительной ткани, закономерным образом в соответствии с развитием патологического процесса изменяются в сыворотке крови, т. е. углеводсодержащие белки несут количественную характеристику всех фаз процесса, начиная с резорбции и заканчивая репарацией. На 7—14—21-е сутки содержание сиаловых кислот (табл. 1) соответственно увеличено. К 14-ым суткам отмечается резкая остеобластическая реакция, которая к 21-ым суткам нормализуется.

Таблица 1*

Биохимические показатели крови после имплантации костномозговых фибробластов с аутологичным костным матриксом

Сроки исследования (сутки)	Силловые кислоты, ЕД	Щелочная фосфатаза, ВЕ	Кальций, мг %	Фосфор неорганический, мг %	Магний, мг %
7	230,0 $\pm$ 4,7	6,3 $\pm$ 0,08	2,03 $\pm$ 0,12	1,2 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,04
	202,5 $\div$ 257,6	5,83 $\div$ 6,77	1,3 $\div$ 2,7	0,8 $\div$ 1,6	0,48 $\div$ 0,88
14	223,8 $\pm$ 17,4	22,1 $\pm$ 1,3	2,36 $\pm$ 0,08	1,41 $\pm$ 0,08	0,6 $\pm$ 0,03
	143,8 $\div$ 303,8	16,0 $\div$ 23,0	1,95 $\div$ 2,75	1,01 $\div$ 1,81	0,58 $\div$ 0,8
21	225,0 $\pm$ 19,3	6,7 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 0,1	1,38 $\pm$ 0,1	0,66 $\pm$ 0,02
	136,2 $\div$ 313,8	0,31 $\div$ 13,9	1,65 $\div$ 2,65	1,3 $\div$ 1,5	0,57 $\div$ 0,75
30	215,0 $\pm$ 16,01	13,6 $\pm$ 0,8	12,0 $\pm$ 0,1	1,53 $\pm$ 0,2	0,75 $\pm$ 0,1
	141,4 $\div$ 288,6	9,9 $\div$ 2,7	1,66 $\div$ 12,58	0,63 $\div$ 2,43	0,63 $\div$ 2,43
60	208,0 $\pm$ 20,1	10,7 $\pm$ 1,1	12,01 $\pm$ 0,06	1,45 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,01
	91,5 $\div$ 325,1	4,3 $\div$ 17,1	12,41 $\div$ 16,1	1,45 $\div$ 1,85	0,55 $\div$ 0,87
90	251,5 $\pm$ 7,4	12,2 $\pm$ 0,9	12,0 $\pm$ 0,03	1,4 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,01
	215,5 $\div$ 286,5	8,1 $\div$ 16,3	1,96 $\div$ 2,16	1,3 $\div$ 1,5	0,61 $\div$ 0,70
180	256,2 $\pm$ 1,4	15,5 $\pm$ 2,2	12,0 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	0,66 $\pm$ 0,02
	199,8 $\div$ 312,6	16,6 $\div$ 24,4	11,5 $\div$ 12,3	1,0 $\div$ 1,8	0,58 $\div$ 0,77

Таблица 2*

Данные количественного анализа при имплантации в область дефекта теменной кости

Сроки исследования (сутки)	Костный матрикс в сочетании с костномозговыми фибробластами	
	сухой вес, %	зола, мг/100 мг сухого веса
14	37,3 $\pm$ 0,8 32,6 $\div$ 4,2	19,8 $\pm$ 1,1 13,4 $\div$ 26,2
21	48,6 $\pm$ 0,6 45,1 $\div$ 52,1	31,5 $\pm$ 0,4 29,2 $\div$ 38,8
30	53,5 $\pm$ 3,5 33,1 $\div$ 73,5	37,8 $\pm$ 2,0 23,1 $\div$ 46,5
60	54,7 $\pm$ 3,0 37,2 $\div$ 72,2	37,2 $\pm$ 2,2 24,2 $\div$ 49,8
90	69,8 $\pm$ 1,6 60,5 $\div$ 79,1	46,5 $\pm$ 1,5 37,7 $\div$ 55,3
180	69,4 $\pm$ 0,9 65,8 $\div$ 73,0	47,2 $\pm$ 6,5 21,0 $\div$ 73,4
Контроль	70,7 $\pm$ 1,4 62,5 $\div$ 78,9	54,9 $\pm$ 2,3 41,5 $\div$ 68,3

Содержание минеральных компонентов костной ткани (Са, Р и Mg) в эти сроки ниже физиологических пределов для животных. К месячному

сроку уровень сиаловой кислоты понижается, активность щелочной фосфатазы достигает $13,6 \pm 0,8$ с индивидуальным разбросом до 27 ВЕ. Показатели минеральной фракции уменьшены. Биохимические данные этого срока идентичны морфологическим изменениям. На 90—180-е сутки исследования угловодсодержащих белков, реактантов острой фазы, отмечается наибольшая метаболическая активность регенерационного остеогенеза. На фоне остеобластической реакции нормализуется процесс минерализации. Концентрация кальция в сыворотке крови достигает $12,0 \pm 0,03$ (табл. 1).

Количественная оценка регенерата, т. е. зольных остатков, из расчета на 100 мг сухого веса показывает (табл. 2), что во II серии эксперимента сухой вес и зольные остатки максимально приближены к контрольным данным.

Таким образом, показатели морфологического, биохимического и количественного исследований убеждают в высоких остеоиндуктивных и остеогенных свойствах сочетанного применения губчатого костного матрикса и костномозговых фибробластов, выращенных *in vitro*.

Ереванский НИИТО

Поступила 29/I 1988 г.

Ի. Հ. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ, Ա. Վ. ԹԵՎՈՍՅԱՆՅ, Ռ. Կ. ՉԱՅԼԱԽՅԱՆ,
Ա. Ա. ՄԱՐԳՍՅԱՆ, Ն. Ն. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ

ՓՈՐՁՈՒՄ ԳԱՆԳԻ ՈՍԿՐԵՐԻ ՈՉ ՌԵԳԵՆԵՐԱՅՎՈՂ ԴԵՖԵԿՏՆԵՐԻ ՊԼԱՍՏԻԿԱՆ
ՈՍԿՐԱՍՈՒԾԱՅԻՆ ՖԻԲՐՈԲԼԱՍՏՆԵՐԻ ՆԵՐՊԱՏՎԱՍՏԱՄԱՐ
ԶՈՒԳԱԿՑՎԱԾ ՍՊՈՆԵԳԱՅԻՆ ՈՍԿՐԱՅԻՆ ՄԱՏՐԻՔՍՈՎ

Հաստատված է, որ *in vitro* կուլտիվացված ոսկրածուծային ֆիբրոբլաստները հետադառնա տեղափոխված սպոնգային ոսկրային մատրիքսի վրա, հատուցողական գեներդի արդյունավետ խթանիչ ներպատվաստ են: Անցկացված փորձի գնահատումը կատարվել է քանակական, ձևաբանական և կենսաքիմիական տեսանկյունից:

H. HOSEPIAN, A. V. TEVOSYANTS, R. K. CHAILAKHIAN, A. A. SARKISSIAN,
N. N. GEVORKIAN

THE PLASTY OF NONREGENERATIVE DEFECTS OF THE SKULL
BONES BY IMPLANTATION OF MEDULLAR FIBROBLASTS COMBINED
WITH THE SPONGE BONE MATRIX IN THE EXPERIMENT

It is established that the cultivated *in vitro* medullar fibroblasts, lately removed on the sponge bone matrix are effective stimulating implants of reparative genesis. The evaluation of the results has been carried out with the help of quantitative, morphologic and biochemical tests.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мискарова Э. В., Лалыкина К. С., Кокорин И. Н., Фриденштейн А. Я. Булл. эксп. биол., 1970, 80, 9, с. 78.
2. Осемян И. А., Козлова В. В., Айвазян В. П., Чопикян С. К., Саркисян А. М. Заготовка и консервация губчатого и трубчатого костного матрикса. Методические рекомендации. Ереван, 1984.

3. Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Лалыкина К. С. Цитология, 1970, 12, с. 1147.
4. Фриденштейн А. Я., Лопыкина К. С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. М., 1973.
5. Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М., 1980.
6. Чайлахян Р. К., Герасимов Ю. В., Фриденштейн А. Я. Бюлл. эксп. биол., 1978, 88, 12, с. 705.
7. Ashton B. A., Allen T. D., Howlett C. P., Eagelson C. L., Owen M., Hattori G. Clin. Orthop., 1980, 151, 294.
8. Baiton Dorothy F., Maloney Mary A., Pat Harvey M. J. Exp. Med., 1986, 163, 2, 400.
9. Pat Harvey M., Maloney Mary A., Flanery M. Exp. Hematol., 1982, 10, 738.

УДК 612.117+616.155.1]—073.756

Н. В. АСРЯН, Ю. Н. РАПЯН, Н. Р. ПОГОСЯН, Э. С. СЕКОЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИБС МЕТОДОМ ДИФРАКЦИИ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

Методом дифракции рентгеновских лучей изучены структурные изменения в фосфолипидах мембран эритроцитов, выделенных из донорской крови, из крови больных ИБС и больных ИБС, прошедших полный курс ультразвуковой (УЗ) терапии. Выявлены значительные различия структур фосфолипидов мембран эритроцитов у больных и доноров. Установлено, что при УЗ терапии происходит частичное восстановление структуры фосфолипидов мембран эритроцитов.

Возрастающее число исследований на молекулярном уровне с очевидностью свидетельствует о структурно-метаболических изменениях в липид-липидных и липид-белковых взаимоотношениях биологических мембран, приводящих к нарушению их физико-химических свойств, что лежит в основе ряда патологических процессов, в том числе и ИБС [1].

За последние годы отмечается интенсивный поиск биологически активных методов коррекции ишемических повреждений, в число которых входят физические преформированные факторы. Учитывая первостепенную роль фосфолипидов в поддержании структурной целостности биологических мембран, а также тот факт, что эритроцитам крови свойственен тип метаболизма, характерный для тканей сердца [6], мы провели исследования по изучению влияния ультразвука в терапевтических дозах на структуру фосфолипидов.

Материал и методы

Обследовано 10 больных ИБС (стенокардия напряжения), получивших УЗ-терапию. Озвучивание проводилось паравертебрально на уровне С₄—Д₃ позвонков в импульсном режиме интенсивностью 0,1—0,2 Вт/см² по лабильной методике. Контактной средой служило вазелиновое масло. Длительность воздействия УЗ колебаний составляла по 2 мин с каждой стороны. Процедуры назначались через день, на курс 8—10 сеансов.

Фосфолипиды из мембран эритроцитов крови были выделены методом Folch [5]. С целью выявления структурных изменений под влиянием ультразвука они выделялись из крови больных после УЗ-терапии. Об-