

22. Parks R. E., Agarwal R. P. In: The Enzymes, 3rd ed., Boyer P. D. ed. № 4. Acad. Press, 1972, 7, 483.
23. Parks R. E., Stoeckler J. D. et al. In: Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents. N. Y. Academic, 1981, 229.
24. Shewach D. S., Chern J. W., Pillote R. E. et al. Cancer Res., 1986, 46, 2, 519.
25. Shimotohno K., Temin H. M. Cell, 1981, 26, 67.
26. Simmond H. A., Cameron J. S. et al. Fortschr. Urol. and Nephrol., 1981, 16, 52.
27. Stoeckler J. D., Canbor C., Kuhns V. et al. Biochem. Pharmacol., 1982, 31, 2, 163.
28. Stoeckler J. D., Ealick S. E., Bugg C. E., Parks R. E. J. Feder. Proc., 1986, 45, 12, 2773.
29. Varmus H. Science, 1982, 216, 812.

УДК 615.361—012+616.71—073.75

Л. И. КОСТАНДЯН, А. М. САРКИСЯН

ОСТЕОИНДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ КОСТНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ И КОНСЕРВАЦИИ

В опытах на белых крысах проводилась гетеротопическая имплантация аллогенного костного матрикса, стерилизованного и консервированного различными методами. Установлено, что выбор способа стерилизации и консервации трансплантатов играет решающее значение для сохранения индукционных свойств. Стерилизация костного матрикса 0,25% раствором нашатырного спирта, его последующее замораживание или лиофилизация являются наиболее оптимальным вариантом применения в клинике.

Актуальность проблемы костной аллопластики на современном этапе изучения вопросов репаративной регенерации костной ткани не вызывает сомнений. Возрастает интерес к вопросу стимуляции остеогенеза деминерализованным костным трансплантатом — костным матриксом, который является высокоэффективным остеоиндуктором, побуждающим развитие остеогенной ткани, а также стимулятором размножения реагирующих на него клеточных форм [1, 5, 6]. Фундаментальные исследования в области изучения остеоиндуктивных свойств различных компонентов костного матрикса подтвердили концепцию направленной дифференцировки мезенхимальных клеток в хрящевые и костные, индуцируемые уникальным костным корфогенетическим белком [2, 3, 4, 5, 7, 8, 9].

Учитывая свойства костного матрикса, его успешно используют при оперативном лечении ряда заболеваний костной системы, главным образом в случаях необходимости активизации репаративной регенерации. Положительные результаты этого лечения зависят не столько от метода оперативного вмешательства, сколько от правильного выбора способа заготовки, стерилизации и консервации костного матрикса. В связи с этим мы решили изучить влияние некоторых стерилизующих и консервирующих средств на остеоиндуктивные свойства костного матрикса и разработать оптимальный вариант их применения в клинике.

Материал и методы

Экспериментальной моделью изучения индукционных свойств костного матрикса явилась эктопическая имплантация, при которой созда-

ются определенные возможности исследования. Опыты проводились в 6 сериях на 360 крысах линии Wistar массой 140—160 г. В I серии костный матрикс стерилизовался и консервировался 0,5% раствором формалина, во II заготавливался в стерильных условиях и замораживался при температуре -12°C , в III стерилизовался смесью 0,5% раствора муравьиной кислоты с 1% раствором пергидроля, замораживался при температуре -12°C , в IV стерилизовался 0,25% раствором нашатырного спирта и замораживался при температуре -12°C , в V стерилизовался также смесью 0,5% раствора муравьиной кислоты с 1% раствором пергидроля и подвергался лиофилизации, а в VI обрабатывался перед лиофилизацией 0,25% раствором нашатырного спирта. Во всех сериях экспериментов производилась эктопическая имплантация в мышцы передней брюшной стенки аллогенного костного матрикса в виде кусочков весом 15—20 мг.

Забой животных проводили под эфирным наркозом на 7, 14, 21, 30, 60, 90-й дни. Часть имплантатов в установленные сроки извлекалась, фиксировалась в растворах 10% формалина и Карнуа. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином, по Ван Гизону. Для гистохимического выявления гликогена и нейтральных гликозаминогликанов проводили ШИК-реакцию с использованием амилазы для ферментативного контроля. Кислые гликозаминогликаны окрашивали толуидиновым синим. РНК выявляли по методу Браше. В криостатных срезах определялась щелочная фосфатаза по методу Гомори, сукцинат- и лактатдегидрогеназа — по методу Нахласа. Деминерализация проводилась в 10% растворе ЭДТА (рН 7,2). Другая часть имплантатов извлекалась, взвешивалась, определялись сухой вес и вес солевых остатков. Полученные количественные данные обрабатывались методом математической статистики по Стьюденту-Фишеру. Помимо этого, изучалось изменение иммунологической реактивности организма в ответ на имплантацию костного матрикса, стерилизованного и консервированного различными методами. С этой целью проводилось определение уровня Т- и В-лимфоцитов в периферической крови, показателя повреждения нейтрофилов (ППН) и реакции бласттрансформации лимфоцитов на 7, 14, 21, 30, 60 и 90-й дни.

Результаты и обсуждение

Эксперименты показали, что в ранние сроки постимплантационного периода, т. е. на 7 и 14-е сутки, во всех сериях костный матрикс подвергался активной резорбции, особенно по периферии, с частичным его замещением молодой незрелой остеобластической тканью, сопровождающейся множеством прорастающих в месте резорбции мелких сосудов. Остеобласты на этих участках крупные, полигональной формы с базофильной цитоплазмой, межклеточное вещество остеобластической ткани слабо эозинофильно с хаотически расположенными в нем остеобластами, отдельные резорбированные участки костного матрикса замещены хондрогенной тканью. Начиная с этой стадии гистогенеза происходит формирование дефинитивной остеогенной ткани с одновремен-

ным накоплением в ней РНК, нейтральных и кислых гликозаминогликанов. В процессе дальнейшей дифференцировки остеобласты приобретают вытянутую форму. Формирование грубоволокнистой кости на 30-й день протекает по типу хондро- и остеогенеза. Сформированные участки грубоволокнистой кости окрашиваются по ван Гизону в различные оттенки красного цвета в зависимости от степени дифференцировки. В почти сформированной костномозговой полости отмечается активное формирование синусоидов с форменными элементами крови. Необходимо отметить, что в серии с замороженным и лиофилизированным костным матриксом, стерилизованным 0,25% раствором нашатырного спирта, все процессы перестройки и синхронного замещения остеогенной тканью протекают более бурно с формированием первичных остеонов. На 60 и 90-й дни происходит завершение остеогенеза, который выражается формированием пластинчатой кости, перемежающейся грубоволокнистой, которая, в свою очередь, перестраивается с формированием первичных гаверсовых систем.

Анализируя данные количественных показателей зольных остатков всех серий экспериментов, видим, что в серии опытов с формализированным костным матриксом на 14-й день отмечаются лишь следы зольных остатков, в то время как в сериях с замороженным и лиофилизированным костным матриксом наблюдается начинающийся неоостеогенез, который выражается в более заметном содержании золы: $2,0 \pm 0,6$, $0,9 \pm 0,2$, $1,4 \pm 0,1$, $4,9 \pm 0,5$ и $8,7 \pm 1,9$ во II, III, IV, V и VI сериях соответственно. Нарастание золы в сериях с замороженным и лиофилизированным костным матриксом во все сроки исследований протекает более интенсивно, чем в серии с формализированным костным матриксом: $0,5 \pm 0,1$; $1,6 \pm 0,4$; $4,3 \pm 0,7$; $13,7 \pm 2,7$ (I серия); $11,3 \pm 1,4$; $21,8 \pm 2,4$; $23,7 \pm 2,0$; $29,3 \pm 1,2$ (II серия); $7,2 \pm 0,9$; $10,9 \pm 1,6$; $20,6 \pm 2,7$; $29,5 \pm 1,0$ (III серия); $8,5 \pm 1,2$; $11,6 \pm 2,2$; $27,0 \pm 2,1$; $29,1 \pm 3,7$ (IV серия); $11,7 \pm 1,6$; $19,5 \pm 1,0$; $22,7 \pm 1,8$; $29,4 \pm 1,8$ (V серия); $20,7 \pm 2,2$; $23,6 \pm 0,7$; $30,3 \pm 2,4$; $42,8 \pm 2,3$ (VI серия) соответственно на 21-, 30-, 60-, 90-й дни исследований.

Результаты изучения иммунологической реактивности организма реципиента в ответ на эктопическую имплантацию костного матрикса, стерилизованного и консервированного различными методами, показали, что в серии опытов с формализированным матриксом повышение Т-РОК наблюдается с 7-го дня эксперимента ($20,0 \pm 1,45$), возрастая на 21 и 30-й дни ($22,0 \pm 1,56$ и $29,0 \pm 1,97$). В серии опытов с замороженным и лиофилизированным костным матриксом повышение содержания Т-РОК наблюдается на 14-й день исследований ($18,8 \pm 0,83$), снижается с 21-го дня ($14,0 \pm 1,35$) и приходит к норме на 30-й день ($10,0 \pm 0,93$). ППН в серии с формализированным костным матриксом остается высоким вплоть до 60-го дня: $0,25 \pm 0,005$, $0,26 \pm 0,023$, $0,18 \pm 0,014$, $0,15 \pm 0,009$ и $0,10 \pm 0,005$ соответственно на 7, 14, 21, 30 и 60-й дни. В сериях с замороженным и лиофилизированным костным матриксом ППН нормализуется на 30-й день ($0,08 \pm 0,003$), оставаясь в пределах нормы до конца эксперимента. Остановив внимание на реакции бласттрансформации (РБТ) лимфоцитов, видим, что на 7 и 14-й дни РБТ на фи-

тогемагглютинин снижена во всех сериях эксперимента (до 21-го дня): $64 \pm 1,25$ (формалинизированный), $49,3 \pm 1,35$ (замороженный), $68,5 \pm 2,1$ (лиофилизированный костный матрикс). Начиная с 21-го дня РБТ в сериях с замороженным и лиофилизированным костным матриксом возвращается к норме, составляя $74,0 \pm 1,14$ и $72,6 \pm 2,3$.

Таким образом, консервация костного матрикса замораживанием и лиофилизацией приводит к более раннему эктопическому остеогенезу, чем консервация 0,5% раствором формалина. Аллотрансплантация замороженного и лиофилизированного костного матрикса вызывает менее выраженную иммунологическую реакцию реципиента, чем аллотрансплантация костного матрикса, стерилизованного и консервированного в 0,5% растворе формалина. Стерилизация костного матрикса 0,5% раствором нашатырного спирта является наиболее щадящим методом с точки зрения максимального сохранения индуктивного начала.

Ереванский НИИ травматологии и
ортопедии им. проф. Х. А. Петросяна

Поступила 8/II 1988 г.

Լ. Ի. ԿՈՍՏԱՆԴՅԱՆ, Ա. Մ. ՍԱՐԿԻՍՅԱՆ

**ԱՊԱՀԱՆՔԱՅՆԱՑՎԱԾ ՈՍԿՐԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾ ՔԱՊԱՏՎԱՍՏՆԵՐԻ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ՝ ԿԱԽՎԱԾ ՄԱՆՐԷԱԶԵՐՄԱՆ ԵՎ
ԿՈՆՍԵՐՎԱՑՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐԻՑ**

Սպիտակ առնետների վրա կատարված են զանազան եղանակներով մանրէազերծված և կոնսերվացված ոսկրային մատրիքսի հետերոտոպիկ փոխպատվաստման փորձեր: Հեղինակները օգտագործելով կազմաբանական հյուսվածքաբանական, իմունոլոգիական և քանակական մեթոդները հանգեցին եզրակացության, որ հյուսվածքապատվաստի ինգրուցիոն հատկությունների լիարժեք պահպանման գործում վճռական դեր է կատարում մանրէազերծման և կոնսերվացման եղանակի ընտրությունը: Յույց է տրված, որ 0,25% անուշադրի սպիրտի լուծույթով ոսկրային մատրիքսի մանրէազերծումը և նրա հետագա սառնեցումը կամ լիոֆիլիզացիան լավագույն եղանակն է հանդիսանում կլինիկական կիրառման համար:

L. I. KOSTANDIAN, A. M. SARKISSIAN

**OSTEOINDUCTIVE PROPERTIES OF DEMINERALIZED BONE
TRANSPLANTS, DEPENDING ON THE METHODS OF STERILIZATION
AND CONSERVATION**

In the experiments on albino rats the heterotopic implantation of the allogenic bone matrix has been conducted. It is established that the choice of the method of sterilization and conservation of the transplants has a significant role in the preservation of the inductive properties. It is shown that the sterilization of the bone matrix by 0,25% solution of ammonia spirit, its following freezing or lyophilization is the most optimal method applied in clinical conditions.

1. Chalmers J., Grat D., Rush I. J. Bone Jt. Surg., 1975, 57—B, 1, 36.
2. Firschein H. E., Urist M. R. Calcif. Tissue Res., 1971, 7, 108.
3. Harakas N. Clin. Orthop., 1984, 188, 239.
4. Nogami H., Urist M. Clin. Orthop., 1974, 100:235.
5. Urist M. Science, 1965, 150, 12, 893.
6. Urist M., Dowell T., Hay P., Strates B. Clin. Orthop., 1968, 59, 59.
7. Urist M. Calcif. Tissue Res., 4 (suppl.): 98, 1970.
8. Urist M., Jwata H., Boyd S. D. J. Histochem. Cytochem., 1974, 22:88.
9. Urist M. Clin. Orthop., 1977, 124, 251.

УДК 616.71—089.844

И. А. ОСЕПЯН, Н. Н. ГЕВОРКЯН

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ КОСТНОМОЗГОВЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ОСНОВЕ ПОРИСТОГО УГЛЕРОДА ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ ДЕФЕКТОВ КОСТЕЙ

Изучались остеогенные свойства костномозговых фибробластов при замещении стандартного дефекта свода черепа. С помощью рентгенологических и гистологических методов исследования установлено, что при применении пористого углерода в качестве основы для костномозговых фибробластов происходит армирование восстановленной кости.

В настоящей работе поставлена задача создать оптимальные условия для репаративной регенерации костной ткани. С этой целью использовали модель дефекта свода черепа кролика диаметром 1,3 см. Такие дефекты, по данным большинства исследователей, у половозрелых особей восстанавливаются атипично с образованием фиброзного рубца [1]. В качестве трансплантата использованы аутологичные костномозговые фибробласты, адсорбированные порошком пористого углерода. Фибробласты получены путем эксплантации костного мозга в монослойные культуры.

Исходя из того, что пористый углерод обладает биосовместимостью и по биомеханическим свойствам приближается к костной ткани, мы выбрали его в качестве основы для костномозговых фибробластов, выращенных *in vitro*. Использование углерода в травматологии выявило полное отсутствие токсичности и канцерогенности, а также возможность образования заместительных тканей на его основе [5]. При применении такого трансплантата получается органотипическая кость, армированная углеродом, что представляет интерес для клиники, поскольку существующие методы замещения дефектов костей или недостаточно эффективны, или небезвредны для организма, или мало удобны для использования в клинических условиях.

Для замещения дефектов свода черепа в эксперименте мы использовали остеогенные свойства костноматричных фибробластов, выращенных *in vitro*.

Материал и методы

Эксперименты проводились следующим образом. У кроликов новозеландской породы массой 2,5—3 кг под нембуталовым наркозом резе-