

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕПАРАТИВНОГО
ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОРАЛЛОВО-КРОВЯНОЙ СМЕСИ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

© Д.И. Сучков¹, О.А. Юнеман², М.В. Савельева¹, А.В. Павлов¹

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
Рязань, Российская Федерация (1)

НИИ Морфологии человека, Москва, Российская Федерация (2)

Цель. Изучить морфологические особенности репаративного остеогенеза при использовании гранул скелета коралла семейства *Ascororidae* рода *Ascorora* при его инкубации с аутокровью.

Материалы и методы. В эксперименте на лабораторных животных – крысах стока Wistar были изучены остеоиндуктивные свойства гранул скелета натурального коралла семейства *Ascororidae* в смеси с аутокровью и ее инкубации в течение 12 часов при температуре 4⁰С. Подготовленной смесью заполняли дефект бедренной кости.

Результаты. Было выявлено, что при применении данной смеси, процессы репаративного остеогенеза идут эффективней, чем при применении смесей гранул коралла и гидроксиапатита, смешанных с аутокровью животного непосредственно перед оперативным вмешательством. На 14-е сутки при применении разработанной методики в полях зрения регистрировали выраженный регенерационный ангиогенез и значительную долю фиброцитов в макрофагально-фибробласто-эндотелиальном гистионе. На 21-е сутки обнаружено разрастание ретикулофиброзной костной ткани, окруженной полиморфными клетками костного мозга. В этот период отмечена стабилизация доли сосудов и нарастание количества остеоцитов в регенерате. К 28-ым суткам было выявлено формирование пластинчатой костной ткани с гаверсовыми каналами, выраженная оссификация регенерата. Исследование показало, что коралл обладает остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами. Это подтверждает формирование костных структур, как при использовании инкубированной смеси, так и при – непосредственно смешанными с аутокровью перед операцией материалами. Вместе с тем процессы пролиферации костной ткани и регенерация дефекта более выражены при применении предложенного метода.

Выводы. Была разработана и апробирована методика подготовки остеопластического материала для закрытия критических дефектов трубчатых костей на основе гранул натурального скелета коралла рода *Ascorora*. При использовании инкубированной кораллово-кровяной смеси процессы неоостеогенеза идут быстрее, чем при использовании материала, смешанного с аутокровью непосредственно перед имплантацией. Инкубированный материал за счет своей пластичности более эффективен при закрытии дефекта кости. Предложенная методика упрощает подготовку пломбировочной массы, а также ускоряет процессы заживления костной раны.

Ключевые слова: коралл, остеоиндуктивность, репаративный остеогенез, остеокондукция, остеопластические материалы.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF REPARATIVE OSTEOGENESIS WITH THE USE OF CORAL-BLOOD MIXTURE IN THE EXPERIMENT

© D.I. Suchkov¹, O.A. Junemann², M.V. Savelieva¹, A.V. Pavlov¹

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation (1)

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation (2)

Aim. To study the morphological features of reparative osteogenesis when using granules of the skeleton of a coral of the Acroporidae family of the genus *Acropora* during its incubation with autologous blood.

Materials and Methods. In an experiment on laboratory animals – Wistar rats, the osteoinductive properties of the granules of the natural coral skeleton Acroporidae were studied by mixing it with the blood of the animal and incubating it for 12 hours at a temperature of 4°C. The prepared mixture was filled with a defect in the femur.

Results. It was found that with the use of this mixture, the processes of reparative osteogenesis are more effective than using mixtures of granules of coral and hydroxyapatite mixed with the blood of the animal just before surgery. On the 14th day, using our technique, in the fields of vision, pronounced regenerative angiogenesis and a significant proportion of fibrocytes in the macrophage-fibroblasto-endothelial histone were recorded. On the 21st day there was a proliferation of reticulofibrous bone tissue, surrounded by polymorphic bone marrow cells. During this period, the stabilization of the vascular fraction and the increase in the number of osteocytes in the regenerate were noted. By the 28th day, formation of lamellar bone tissue with Havers canals was revealed, marked ossification of the regenerate. The study showed that the coral has osteoinductive and osteoconductive properties. This confirms the formation of bone structures both when using the incubated mixture, and when directly mixed with the blood of the experimental animal before the operation. At the same time, the processes of bone tissue proliferation and defect regeneration are more pronounced when applying the proposed method

Conclusions. A method of the preparation of osteoplastic material to close the critical defects of the tubular bones on the basis of natural skeleton granules of the coral of the genus *Acropora* was developed and tested. Incubated material is more effective at closing the bone defect due to its plasticity. The proposed method simplifies the preparation of the filling mass, and also accelerates the healing process of bone wounds.

Keywords: coral, osteoinductivity, reparative osteogenesis, osteoconduction, osteoplastic materials.

Актуальной проблемой современной морфологии является изучение процессов репаративного остеогенеза при замещении дефектов остеопластическими материалами. При изучении остеогенеза большое внимание уделяется таким важным свойствам костнозамещающих материалов, как остеоиндукция и остеокондукция, обеспечивающие образование de novo кости с матрицей для проникновения и адгезии остеогенных клеток в поры

и каналы пористых материалов [1-3]. Для реализации данных свойств принимают участие свободно находящиеся в организме мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга, которые способны при определённых условиях выходить из не костных тканей и дифференцироваться в костные клетки [4]. На остеоиндуктивность также влияет пористость остеопластических материалов на микро- и макроуровнях,

которая способствует образованию лакун с остеокитами [2,4].

При изучении скорости остеогенеза учитывается травматизация тканей при оперативном вмешательстве, в ходе которой запускается каскад клеточных реакций, направленных на заживление тканей, но отрицательно сказывающихся на образовании костной ткани (Anderson, 2000). При использовании различных костнозамещающих материалов многие из них могут вызывать иммунологические реакции, в том числе реакцию отторжения [5]. В связи с этим при использовании остеопластических материалов требуется выполнение реакции на биосовместимость [6].

Цель исследования – изучить морфологические особенности репаративного остеогенеза при использовании гранул скелета коралла семейства *Acroporidae* рода *Acropora* при его инкубации с аутокровью.

Материалы и методы

Для апробации в эксперименте был предложен метод подготовки остеопластического пломбировочного материала на основе коралла семейства *Acroporidae* рода *Acropora*, с размером гранул от 98 мкм до 400 мкм (Патент №2644828). Предварительно у экспериментального животного брали венозную кровь до 1,0-1,5 мл, которой обрабатывали измельченный коралл, помещенный в стерильную емкость. Емкость с обработанной кровью кораллом помещали в холодильник на 12 часов при температуре 4°C. Затем инкубированной кораллово-кровяной массой заполняли дефект кости после обработки его антисептиком (раствор фурацилина).

Исследование выполнено на 36 лабораторных крысах – половозрелых самцах стока Wistar, вес которых составил в диапазоне 260-280 г. Все работы на животных с дальнейшим их содержанием были выполнены в виварии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123, Страсбург, 18.03.1986), «Принципами надлежащей лабораторной

практики» (национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ №33044-2014, введен с 1.08.2015), приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (СП 2.2.1.3218-14).

Всем животным под анестезией «Золетил 100» (Virbac С.А., Франция) в дозировке 15 мг/кг веса и «Рометар» (Bioveta, Чехия) в дозировке 6 мг/кг на латеральной стороне правого бедра животного выбривали участок кожного покрова 30х30 мм и обрабатывали его 70%-ным раствором этилового спирта. Операционное поле изолировали стерильными салфетками. В проекции бедренной кости с латеральной стороны бедра скальпелем, для исключения повреждения сосудисто-нервного пучка бедра, производили разрез кожи и фасции. Длина разреза кожи составляла 20-25 мм. Тупым и острым способом обнажали среднюю треть бедренной кости. Кость мобилизовали. Стерильным электрическим бором с концевой фрезой (диаметр 4 мм) выполняли окончательный дефект кости с полным обнажением костномозгового канала. Площадь дефекта составила $12,57 \pm 0,3$ мм². Кровь для пломбировочной массы бралась из хвостовой вены в объеме 1-1,5 мл. Животные были разделены на 3 равные (n=12) группы. В первой группе для замещения сформированной костной полости использовали пломбировочную массу коралла, предварительно инкубированную с аутокровью по предложенной методике. Во второй группе использовали гранулы коралла (98-400 мкм), смешанные с аутокровью непосредственно перед пломбировкой. В третьей группе использовали гидроксипатит с размером частиц 50-150 мкм (ООО «Промтехрезерв», Украина) также непосредственно перед пломбировкой смешанный с аутокровью животного.

Далее у всех животных выполнялась иммобилизация костных отломков

проволочным «серкляжем». Дефект укрывался мышцей. Рану ушивали послойно наглухо. Швы снимались на 14-е сутки после оперативного вмешательства. Животные по 4 из каждой группы выводились из эксперимента путем передозировки средств для наркоза на 14, 21 и 28-е сутки. Далее производили вычленение оперированной бедренной кости для дальнейшего морфологического исследования. Образцы костей фиксировали в 10% нейтральном формалине 7-10 дней с дальнейшим отмыванием в проточной воде в течении 1 часа. Далее образцы помещали в декальцинирующую жидкость Рихмана-Гельфанда-Хилла на 70-72 часа при температуре 4°C, затем снова отмывали проточной водой в течение 30 минут и 70°-ным спиртом в течение 4-5 дней. После заливки в парафин изготавливали серийные срезы толщиной 10 мкм. Для окраски препаратов использовали: гематоксилин и эозин; окраску по Маллори. Окрашенные препараты заключали в канадский бальзам.

Гистологическое исследование и из-

мерение морфометрических параметров образцов осуществляли на аппаратно-программном комплексе Leica DM-2500. В каждом исследуемом срезе в 20 полях зрения бедренной кости оценивали: количество сосудов, количество и соотношение клеток остеоцитарного дифферона, площадь костного мозга, площадь волокнистой ткани, количество клеток воспалительного ряда, количество клеток инородных тел. Рассчитывалось среднее значение исследуемого параметра, данные заносились в таблицу в виде $M \pm m$, где M – исследуемый параметр, m – ошибка среднего арифметического. Данные были представлены в табличном и графическом видах (табл. 1, рис. 1, 2). Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни в программном пакете Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Результаты и их обсуждение

Динамические показатели остеогенеза в костной ране после закрытия остеопластическими материалами представлены в таблице 1.

Таблица 1

Динамические показатели остеогенеза в костной ране после закрытия остеопластическими материалами

Исследуемый показатель в п.з. ($M \pm m$)	Сутки после закрытия костного дефекта остеопластическими материалами								
	14-е сутки			21-е сутки			28-е сутки		
	Исследуемая группа			Исследуемая группа			Исследуемая группа		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
количество сосудов, шт	12,3±0,6	6±0,3	7,4±0,4	18,1±1,3	9,6±0,1	12,2±0,5	16±0,7	11,3±0,1	14,3±0,2
количество остеобластов, шт	12±3,1	0	0	122±12,1	34±7,3	48,2±11,3	136±26,1	96±12,3	103±14,3
площадь костного мозга, мм ²	3,1±0,3	1,5±0,2	0,9±0,3	11,1±0,6	4,3±1,4	3,6±1,3	31,2±4,8	7,8±4,1	18,3±3,0
площадь волокнистой ткани, мм ²	30,1±4,3	27,1±7,4	42,3±6,1	58,7±7,7	31,1±3,7	47,4±5,2	36,1±2,8	57,7±12,3	45,3±6,7
количество клеток воспалительного ряда, шт	ед. в п.з	11,3±3,2	9,1±2,1	0	7±1,2	ед. в п.з	0	ед. в п.з	0

На 1-е сутки у всех животных отмечался отек мягких тканей, падающее положение оперированной конечности, отделения из операционной раны носили серозно-геморрагический характер. Подкожных гематом выявлено не было. К концу 5-6 суток животные восстановили полный объем движения в поврежденной конечности. На 7-е сутки местных воспалительных явлений не наблюдалось. Рана зажила первичным натяжением на 10-е сутки.

На 14-е сутки в препаратах всех групп отмечалось значительное представление макрафагально-фибробласто-эндотелиального гистиона. При этом отмечено снижение доли фибробластов с преобладанием количества фиброцитов во второй и третьей группах. В первой группе регистрировали увеличение количества хрящевых клеток (рис. 2 а). При этом достоверных данных о превалировании репаративного хондрогенеза над формированием ретикуло-фиброзной ткани не выявлено. Наиболее интенсивный ангиогенез отмечался на 14-е сутки в 1-й группе, наименее выраженный – во 2-й группе. Отмечено, что процессы ангиогенеза ста-

билизируются во всех группах на 21 сутки, и сохраняются на данном уровне до конца эксперимента.

Следует отметить, что использование коралла, смешанного с аутокровью непосредственно перед операцией, вызывает образование наибольшего количества клеток инородных тел, которые сохраняются до конца эксперимента, а при использовании инкубированной смеси коралла с аутокровью данные клетки встречаются в поле зрения единично. При использовании гидроксиапатита выявляются до 3-5 клеток инородных тел в поле зрения, которые полностью исчезают к 28-м суткам эксперимента. Клетки воспалительного ряда присутствовали в умеренном количестве в группах 2 и 3, в группе 1 данных они встречались единично в поле зрения. Данные клетки не выявлялись к 28-м суткам во всех группах после закрытия костного дефекта.

В группе с использованием инкубированной кораллово-кровяной смеси регистрировали разрастание ретикулофиброзной костной ткани (рис. 2 в), при этом значительно снизились показатели хрящевых клеток.

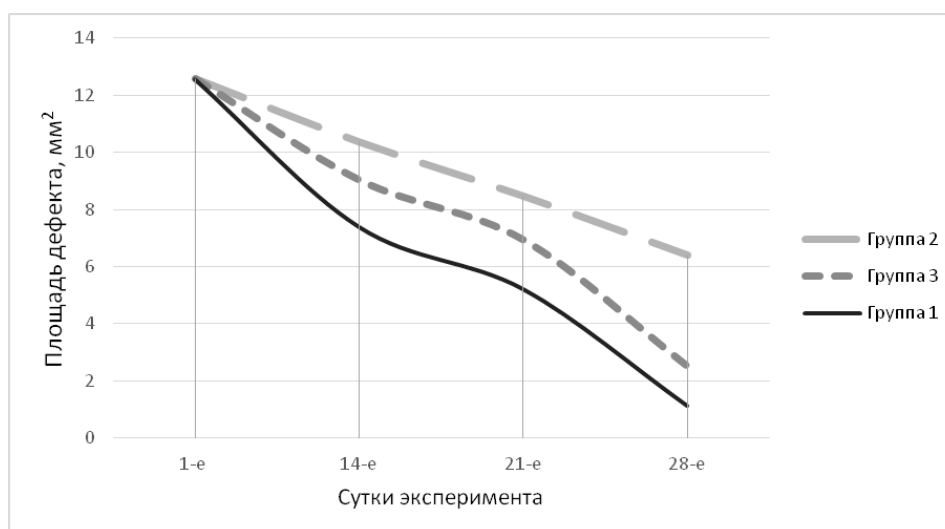


Рис. 1. Динамика площади дефекта бедренной кости в разных экспериментальных группах

Площадь фиброзной ткани с преобладанием фиброцитов на 14-е сутки была больше в группе при использовании гид-

роксиапатита (группа 3), что вероятнее всего связано с более мелкими гранулами данного вещества. Однако, на 21 сутки

площадь данной ткани была наибольшей в 1 группе, наименьшей в 2 группе. Площадь рыхлой волокнистой ткани к 28-м суткам увеличивалась в группе 2, а в остальных группах заметно уменьшалась.

Участки молодой костной ткани визуализировались уже к 14-м суткам во всех группах. Площадь костного мозга была наибольшая в группе с инкубированной кораллово-кровяной смесью на всем протяжении эксперимента. При сравнении остальных групп процессы остеогенеза шли заметно быстрее в группе 3, чем в группе 2.

Можно отметить, что была обнаружена достоверная корреляционная связь между

активностью ангиогенеза и формированием новых костных структур, что подтверждается увеличением количества костных структур и клеток в группах с наибольшим количеством сосудов – группы 1 и 3.

При оценке площади дефекта (рис. 1), можно предположить, что плотная консистенция коралла с аутокровью после предварительной инкубации способствует более плотной пломбировке костного дефекта. При использовании остеопластических материалов, смешанных непосредственно перед имплантацией, происходит вымывание током крови из костномозгового канала части материала в окружающие ткани.

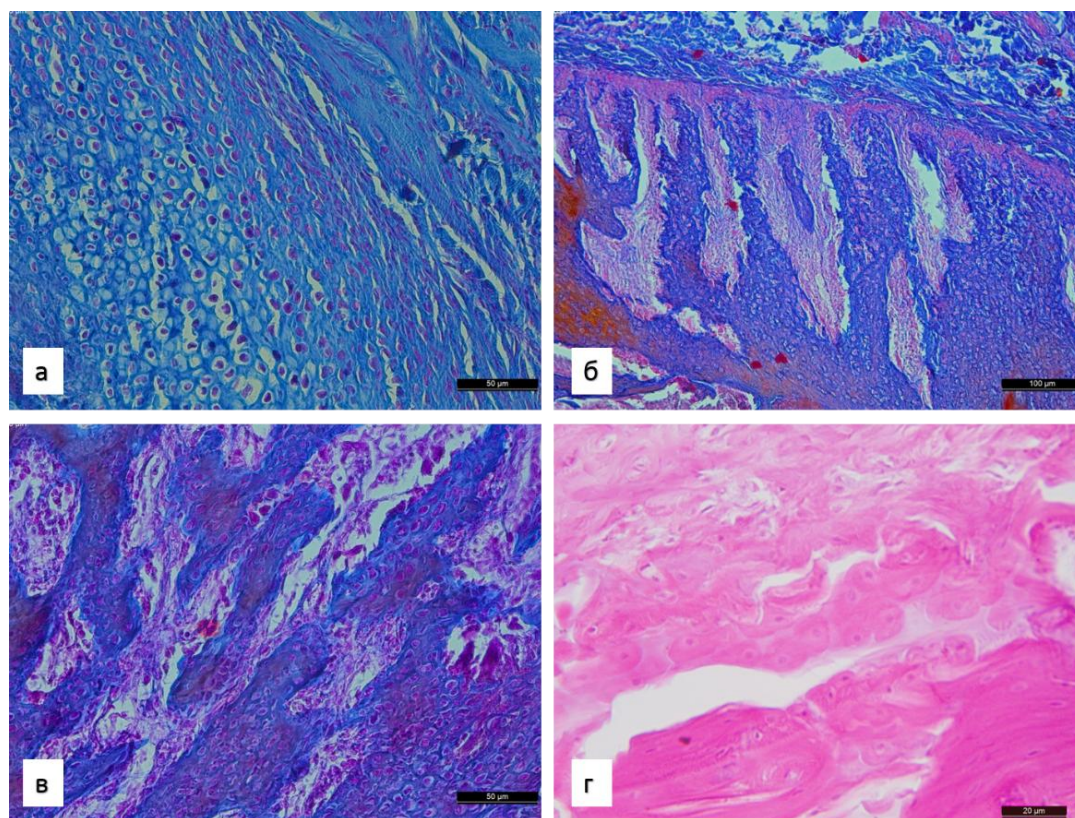


Рис. 2. Гистологический препарат бедренной кости при использовании в качестве остеопластического материала инкубированной кораллово-кровяной смеси: а – 14-е сутки, хрящевые клетки и ретикулофиброзная костная ткань; б, в – 21 сутки, формирование незрелой костной ткани, г – 28-е сутки, тонковолокнистая костная ткань с гаверсовыми системами

При использовании инкубированной кораллово-кровяной смеси к 28-ым суткам после имплантации, отмечено нарастание процессов минерализации ретикулофиб-

розной костной ткани с формированием пластинчатой костной ткани, характеризующийся преобладанием доли остеоцитов в остеоцитарном диффероне, наличи-

ем сформированных гаверсовых систем (рис. 2 г), что в других группах к этому сроку не наблюдалось.

Заключение

Была разработана и апробирована методика подготовки остеопластического материала для закрытия критических дефектов трубчатых костей на основе гранул натурального скелета коралла рода *Асорога*. При использовании инкубированной кораллово-кровяной смеси процессы неоостеогенеза идут быстрее, чем при использовании материала, смешанного с аутокровью непосредственно перед имплантацией. Инкубированный материал за счет своей пластичности более эффек-

тивен при закрытии дефекта кости. Предложенная методика упрощает подготовку пломбировочной массы, а также ускоряет процессы заживления костной раны.

Дополнительная информация

Конфликт интересов: отсутствует.

Участие авторов.

Экспериментальные этапы работы, морфологические и морфометрические исследования, статистическая обработка полученных данных и анализ результатов – Д.И.С.

Рецензирование, морфологическое исследование – О.А.Ю.

Экспериментальные этапы работы, статистическая обработка полученных данных, перевод статьи – М.В.С.

Рецензирование, научная и практическая консультация при ведении исследования – А.В.П.

Литература

1. Кузьманин С.А., Назаров Е.А., Веснов И.Г. Экспериментальное исследование сил сцепления композиционного материала из фосфата кальция и германия с костью // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2016. Т. 24, №2. С. 92-100. doi: 10.17816/pavlovj2016292-100
2. Meretoja V.V., Tirri T., Malin M., et al. Ectopic bone formation in and soft-tissue response to P(CL/DLLA)/bioactive glass composite scaffolds // Clinical Oral Implants Research. 2014. Vol. 25, №2. P. 159-164. doi:10.1111/clr.12051
3. Barradas Ana M.C., Yuan H., Clemens A., et al. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms // European Cells and Materials. 2011. №21. P. 407-429. doi: 10.22203/ecm.v021a31
4. Новочадов В.В., Гайфуллин Н.М., Залевский Д.А., и др. Остеоинтеграция имплантатов с биоактивной поверхностью, модифицированной напылением хитозана в эксперименте у крыс // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2013. Т. 21, №2. С. 30-35. doi:10.17816/pavlovj2013230-35
5. Хелминская Н.М., Кравец В.И., Гончарова А.В., и др. Об эффективности и перспективах использования плазмы крови в комплексном замещении ограниченных костных дефектов челюстей // Медицинский альманах. 2015. Т. 38, №3. С. 199-202.
6. Еремин Н.В., Мнихович М.В. Электронно-микроскопическая характеристика ангиогенеза и клеточных взаимодействий в кожной ране под влиянием низкоинтенсивного лазерного

излучения // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2014. Т. 2, №2. С. 23-34.

References

1. Kuzmanin SA, Nazarov EA, Vesnov IG. Composite material based on calcium phosphate and germanium (experimental study). *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2016;24(2):92-100. (In Russ). doi:10.17816/pavlovj2016292-100
2. Meretoja VV, Tirri T, Malin M, et al. Ectopic bone formation in and soft-tissue response to P(CL/DLLA)/bioactive glass composite scaffolds. *Clinical Oral Implants Research*. 2014;25(2):159-64. doi:10.1111/clr.12051
3. Barradas Ana MC, Yuan H, Clemens A, et al. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European Cells and Materials*. 2011;21: 407-29. doi:10.22203/ecm.v021a31
4. Novochadov VV, Gajfullin NM, Zalevskij DA, et al. The chitosan-coated implants with bioactive surface demonstrate improved characteristics of osseointegration in rats. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2013;21(2):30-5. doi:10.17816/pavlovj2013230-35. (In Russ).
5. Helminskaya NM, Kravec VI, Goncharova AV, et al. On efficiency and prospects of use of blood plasma in complex substitution and limitation of bone defects of jaws. *Medicinskij Al'manakh*. 2015;(3):199-202. (In Russ).
6. Eremin NV, Mnikhovich MV. Electron-microscopic characteristics of angiogenesis and cell interactions in skin wound under the influence of low level laser radiation. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2014;2(2):23-34. (In Russ).

Информация об авторах [Authors Info]

***Сучков Дмитрий Игоревич** – ассистент кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация. e-mail: argoncs@mail.ru

SPIN: 1286-8130, ORCID ID: 0000-0001-5513-9104.

Dmitry I. Suchkov – assistant of the Department of Department of Cardiovascular, Roentgen-Endovascular, Operative Surgery and Topographic Anatomy, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation. e-mail: argoncs@mail.ru

SPIN: 1286-8130, ORCID ID: 0000-0001-5513-9104.

Юнеман Ольга Андреевна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории развития нервной системы ФГБНУ НИИМЧ, Москва, Российская Федерация.

SPIN: 8045-9113, ORCID ID: 0000-0001-5828-5393.

Olga A. Junemann – PhD of Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation.

SPIN: 8045-9113, ORCID ID: 0000-0001-5828-5393.

Савельева Маргарита Викторовна – студент лечебного факультета, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация.

SPIN: 9848-1715, ORCID ID: 0000-0002-8553-5631.

Margarita V. Savelieva – Student of the Medical Faculty, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

SPIN: 9848-1715, ORCID ID: 0000-0002-8553-5631.

Павлов Артем Владимирович – д.м.н., доцент, заведующий кафедрой анатомии, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация.

SPIN: 4227-7508, ORCID ID: 0000-0002-8224-824X.

Artem V. Pavlov – MD, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Anatomy, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

SPIN: 4227-7508, ORCID ID: 0000-0002-8224-824X.

Цитировать: Сучков Д.И., Юнеман О.А., Савельева М.В., Павлов А.В. Морфологическая характеристика репаративного остеогенеза при использовании кораллово-кровяной смеси в эксперименте // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2018. Т. 6, №4. С. 524-531. doi:10.23888/HMJ201864524-531

To cite this article: Suchkov DI, Junemann OA, Savelieva MV, Pavlov AV. Morphological characteristics of reparative osteogenesis with the use of coral-blood mixture in the experiment. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2018;6(4):524-31. doi:10.23888/HMJ201864524-531

Поступила / Received: 09.11.2017
Принята в печать / Accepted: 17.12.2018