

На правах рукописи

СУЧКОВ ДМИТРИЙ ИГОРЕВИЧ

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОСТЕОГЕНЕЗА
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГРАНУЛ СКЕЛЕТА НАТУРАЛЬНОГО КОРАЛЛА В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология
(медицинские науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Павлов Артем Владимирович

Официальные оппоненты:

Одинцова Ирина Алексеевна - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кафедра гистологии с курсом эмбриологии, заведующая кафедрой;

Волова Лариса Теодоровна - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации», Институт экспериментальной медицины и биотехнологии, главный научный сотрудник, Самарский банк тканей, директор

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу 119992, г. Москва, ул. Россолимо 15/13

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.м.н., доцент

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время отмечается растущая потребность в материалах для замещения костной ткани, поэтому фундаментальные и прикладные исследования сосредоточены на разработке новых костнозамещающих масс и стимулировании репаративного остеогенеза. (Арьев Т.Я., Никитин Г.Д., 1955; Столяров Е.А. и др., 2009; Волова Л.Т., 2011; Хлусов И.А. и др., 2011; Кирилова И.А. и др., 2012; Снетков А. И. и др., 2014; Зорин В.Л. и др., 2014). В связи с этим можно утверждать, что изучение биологической регенерации костной ткани является актуальной проблемой современной морфологии. Несмотря на многолетний интерес к данной проблеме, до настоящего времени нет однозначного выбора материала для замещения костных дефектов (Васильева Л.С. и др., 2002; Braye F. et al., 1996; Yang Y.Q. et al., 2012). В свете прогресса современных производственных технологий в клинической практике все чаще отдается предпочтение синтетическим остеопластическим материалам (Копылов А.Н., с соавт., 2013). Одним из ключевых свойств как синтетических, так и натуральных остеопластических материалов является их биосовместимость (Мелихова В.С., и др., 2009; Свиридова И.К. и др., 2010). Одним из распространенных способов проверки данного свойства является «подкожный тест» *in vivo* (Wu Yu-Chun et al., 2009; Bianco P. et al. 2013; Maridati P. et al. 2015). При проведении данного теста в большинстве случаев вокруг остеопластических масс образуется соединительнотканная капсула, однако возможно развитие асептического воспаления и реакции отторжения (Maridati P. et al., 2015; Janner S.F.M. et al., 2016). Также данный тест показывает скорость резорбции остеопластического материала или его биоинертность. Некоторые исследования подтверждают, что в определенных случаях возникает такое редкое явление, как эктопическое образование остеоида (Bianco P. et al., 2013). Наряду с биоинертностью положительными свойствами остеопластических материалов считается их остеокондукция и остеоиндукция (Foo L.H. et al., 2008). Данные свойства обеспечивают образование матрицы для проникновения и адгезии остеогенных клеток, тем самым стимулируется образование *de novo* кости (Мухаммедов Х.Б. и др., 2017). В настоящее время отмечается возрастающий интерес к мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам, которые способны при определенных условиях дифференцироваться в клетки остеоцитарного дифферона (Снетков А. И. и др., 2014; Кузьменко Д.В. и др., 2017; Киселевский М.В. и др., 2018; Shim J.B. et al., 2014). Однако их получение и применение связано со значительными финансовыми затратами. Отдельным направлением поиска оптимального остеопластического материала является изучение соответствующих свойств природных материалов, таких как скелет натурального коралла (Нагайко А.Е., Холод Р.А., 2015; Аганесов А.Г. и др., 2015; Сергеева

Н.С. и др., 2009; Свиридова И.К. и др., 2010; Puvaneswary S. et al., 2013; Klar R.M. et al., 2013; Geng W. et al., 2013; Ripamonti U. et al., 2015). Исследователями доказано, что его физические свойства и химический состав положительно влияют на репаративный остеогенез (К.А. Al-Salihi et al. 2004; Сергеева Н.С. и др., 2009; Puvaneswary S. et al., 2013; R.M. Klar et al., 2013; U. Ripamonti et al., 2015; А.Е. Нагайко и др., 2015). Вместе с тем остеогенные свойства скелета натурального коралла при гетеротопическом размещении до сих пор являются предметом дискуссии.

Степень разработанности темы исследования

В последнее время в специальной литературе отмечается рост публикаций, затрагивающих тему разработки биосовместимых остеопластических материалов и стимуляции остеогенеза. По мнению многих авторов «золотым стандартом» является аллопластика костных дефектов. Аутотрансплантат является остеоиндуктивным и остеокондуктивным каркасом кости без иммуногенности и содержит значительное количество остеопрогениторных клеток (Столяров Е.А. и др., 2009; Резник Л.Б. и др., 2016; Elgali I. et al., 2016). Следует отметить, что его использование имеет ряд недостатков, включающий ограниченную доступность, переменное качество трансплантата, увеличенное время операции и заболеваемость донорских участков (Кирилова И.А. и др., 2012; Киселевский М.В. и др., 2018; Al-Amer O. et al., 2017). В настоящее время ведутся разработки остеопластических материалов с остеоиндуктивными свойствами и использование их в качестве подложек для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для создания тканеинженерных конструкций, обеспечивающих более быстрое образование костной ткани (Detsch R. et al., 2015). Изучается возможность как применения гранул скелета натурального коралла в неизменённом виде, так и в разработке коралл-основанных остеозамещающих материалов. Для изучения биосовместимости материалов, в частности коралла и коралл-основанных материалов, и их остеогенного потенциала используется как внутрикостное, так и эктопическое помещение (Damien C.J. et al., 1993; Foo L.H. et al., 2008).

Цель исследования

Изучить морфологические особенности репаративного остеогенеза при применении натурального коралла на экспериментальных моделях.

Задачи исследования

1. Изучить цитотоксичность гранул скелета натурального коралла *in vitro*.
2. Изучить факторы, влияющие на образование кости *de novo* при подкожном введении скелета натурального коралла.

3. Определить тканевые и клеточные реакции организма крысы на подкожную имплантацию гранул коралла.
4. Изучить морфологические особенности репаративного остеогенеза при закрытии критического дефекта кости различными фракциями гранул коралла.

Научная новизна

Впервые на экспериментальных моделях проведено комплексное морфологическое исследование остеогенных свойств скелета натурального коралла. Установлены факторы, влияющие на скорость образования костной ткани вне костного ложа.

Впервые показано, что обработка аутокровью и предварительное помещение в желатиновую капсулу гранул скелета натурального коралла приводит к гетеротопическому остеогенезу при подкожном введении. Доказано, что коралл, помещенный в желатиновую капсулу без предварительной обработки аутокровью, при подкожном введении не обладает остеогенными свойствами.

Впервые на основании морфологического исследования подкожных имплантатов дана развернутая характеристика тканевых и клеточных реакций организма крысы на подкожную имплантацию гранул коралла.

Впервые доказано, что образование костной ткани, как при гетеротопическом, так и при ортотопическом введении гранул скелета натурального коралла идет активнее при использовании гранул коралла размером 50-150 мкм, чем при использовании 150-300 мкм.

Научно-практическая и теоретическая значимость

Исследование носит фундаментально-теоретический характер, при этом не лишено значимости для практической медицины. Выявлено явление гетеротопического остеогенеза при подкожном введении гранул коралла, помещенных в желатиновую капсулу и смешанных с аутокровью.

Впервые разработан и апробирован способ получения остеопластической массы на основе гранул скелета коралла в эксперименте. Полученный регенерат показал свою эффективность при ортотопическом размещении. В связи с положительным эффектом смешивания гранул коралла с аутокровью получено авторское свидетельство на подготовку остеопластической массы при подкожной имплантации.

Разработано и апробировано устройство для внешнего остеосинтеза, которое позволяет тестировать костнозамещающие материалы *in vivo* в экспериментальных вмешательствах на мелких лабораторных животных.

Материал исследования дополняет имеющиеся данные о биосовместимости гранул скелета натурального коралла. Морфологическое исследование регенератов костной ткани при имплантации гранул коралла в желатиновой капсуле расширяет представления о

гетеротопическом остеогенезе. Информация о гетеротопическом остеогенезе и биосовместимости гранул коралла может быть использована при подготовке остеопластических материалов на его основе, а также при разработке коралл-основанных остеозамещающих материалов.

Методология и методы исследования

Работа представляет собой морфологическое исследование и была выполнена на 160 крысах - половозрелых самцах линии Wistar одинаковых параметров. Объектом морфологического исследования были подкожные имплантаты и образцы бедренных костей после костной пластики остеопластическим материалом на разные сроки. В работе были использованы гистологические методы исследования (окраски гематоксилином и эозином, по Маллори; по Вейгерту Ван Гизону, по Массон-Голднеру, окраска для выявления возраста фибрина), статистическая обработка результатов, специализированное технологическое оборудование и материалы ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, что позволило выполнить поставленные цели и задачи.

Исследование было одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол №1 от 31.05.2019 г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Коралл не обладает цитотоксичностью и является биосовместимым материалом при подкожной имплантации.
2. Гранулы коралла размером 50-150 мкм обладают наиболее выраженным остеогенным потенциалом при подкожной имплантации.
3. Подкожная имплантация в желатиновой капсуле гранул коралла, смешанных с кровью, стимулирует гетеротопическое образование костной ткани.
4. Процессы репаративного остеогенеза в костном дефекте идут активнее при замещении его гранулами коралла размером 50-150 мкм.

Достоверность результатов и апробация работы

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, методах исследования, адекватных для поставленных задач статистических методов обработки информации. Основные результаты диссертационного исследования докладывались и обсуждались на Всероссийском студенческом научном форуме с международным участием «Студенческая наука – 2016» (Санкт-Петербург, 2016); Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2016); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием посвящённой 120-летней годовщине со дня рождения профессора Б.М. Соколова

(Рязань, 2016), LXX международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2016» (Беларусь, 2016); III Всероссийской межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (Нижний Новгород, 2017); Всероссийской научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты морфогенеза человека» (Оренбург, 2017); Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017); III национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017); Всероссийской научной конференции "Гистогенез, реактивность и регенерация тканей" (Санкт-Петербург, 2018); конференции "Травма 2018: Мультидисциплинарный подход" (Москва, 2018); Всероссийской научной конференции "Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей" (Рязань, 2018); на VIII съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019).

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры гистологии, патологической анатомии и медицинской генетики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, а также кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором лично были выполнены: экспериментальная часть исследования, морфологические и морфометрические исследования, статистическая обработка полученных данных и анализ результатов, написание текста диссертации. Автор принимал непосредственное участие в написании статей и тезисов и их подготовке к публикации в научных изданиях, участвовал в качестве докладчика на конференциях разного уровня.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология, а именно областей науки, занимающихся исследованием происхождения, строения, развития, функционирования клеток и тканей, их взаимодействия в процессе жизнедеятельности организма как в норме, так и при различных патологических нарушениях.

Публикации по теме работы

По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, из них 3 оригинальные статьи в журналах, включенных в перечень Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и рекомендуемых для публикации

материалов диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук, а также 2 патента РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста (собственного текста 121 страница), содержит 27 таблиц и 62 рисунка, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 169 источников, в том числе 83 отечественных и 86 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, в котором рассматриваются остеопластические материалы и их свойства, способы влияния на остеогенез. Изучаются особенности регенерации костной ткани при использовании гранул скелета натурального коралла, а также явление гетеротопического остеогенеза.

В главе 2 представлено описание материалов и методов исследования цитотоксичности гранул натурального коралла *in vitro*, а также морфометрические методы исследования материалов после подкожной имплантации и препаратов бедренных костей после костной пластики. Дизайн исследования был одобрен Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол №1 от 31.05.2019 г.). Экспериментальная часть работы выполнена на 160 лабораторных крысах – половозрелых самцах линии Wistar.

Для оценки биосовместимости использовали стерильные плоские пластины коралла Асорога площадью 0,5 см² с дальнейшим 2d-культивированием клеток. Образцы помещались в 96-луночный планшет. В лунки рассеивали 2 вида клеток: BMSC (Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells, костномозговые мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки свиньи) и HFb (Human fibroblasts, фибробласты дермы человека) в количестве 82×10³ клеток на лунку. Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C; 5% CO₂) в среде DMEM в течении 6 суток. Замену среды проводили каждые 2 суток. Изучение нефиксированных и фиксированных образцов проводили в инвертированном микроскопе Olympus на различных увеличениях. После оценки результатов культивирования в светлом поле переходили к флуоресцентному анализу. С целью визуализации клеток, адгезировавшихся к поверхности материала, содержимое лунок обрабатывали флюорохромом DAPI в объеме 100 мкл. Также производили сканирующую электронную микроскопию Tescan Vega II SBU (Институт металлургии и материаловедения

им. А.А. Байкова РАН (Москва). Для оценки цитотоксичности использовали одноступенчатый MTS-тест.

Для изучения процессов остеогенеза *in vivo* использовали 160 лабораторных крыс линии Wistar, разделенные на равные 8 групп (n=20). В таблице 1 представлены данные о делении на группы животных (n=120), которые предварительно были разделены на равные 6 групп по 20 особей, для гетеротопической имплантации гранул коралла. Остальные 40 крыс для ортотопической имплантации коралла были разделены на 2 равные группы (n=20) – 7-я группа, с использованием мелких гранул коралла и 8-я группа, с использованием крупных гранул коралла.

Таблица 1 - Деление животных на группы в зависимости от используемого материала при гетеротопической имплантации

Гранулы скелета натурального коралла					
50-150 мкм			150-300 мкм		
Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6
С кровью в капсуле	без крови в капсуле	без желатиновой капсулы	С кровью в капсуле	без крови в капсуле	без желатиновой капсулы

Для изучения остеогенных свойств вне костного ложа гранул коралла использовали подкожную имплантацию, «чистый эксперимент по Solheim» (Solheim, 1998). Всем крысам на предварительно выбритом участке спины размером 3х3 см в области грудного отдела позвоночника после предварительной обработки 70% раствором этилового спирта выполняли разрез по задней срединной линии кожи и подкожно-жировой клетчатки длиной 1 см. С помощью зажима типа «Москит» формировали подкожный карман длиной 1,5 см, шириной 1,0 см.

В группах 1, 2, 4, 5 остеопластические материалы помещали в твердую желатиновую капсулу №2 длиной 1,76±0,03 см (рис.1). На капсулу накладывали отверстия иглой 22G в количестве 10 отверстий на 1 см².

Непосредственно во время операции производили забор крови из хвостовой вены животного в объеме 0,5 мл инсулиновым шприцом (1мл-U40) и при помощи прокола шприцом капсулы в группах 1 и 4 пропитывали остеопластическую массу аутокровью. В группах 2 и 5 гранулы коралла кровью не пропитывали. В группах 3 и 6 гранулы коралла использовались в чистом виде, без желатиновой капсулы. Все материалы имплантировали подкожно в предварительно сформированный карман. Рану зашивали наглухо. Швы всем животным снимали на 14-е сутки. Животных выводили из

эксперимента путем передозировки средств для наркоза на 7, 14, 21 и 28-е сутки, с последующим извлечением имплантированных материалов.



Рисунок 1 – Подготовка и имплантация гранул коралла

а, б - подготовка имплантата в твердой желатиновой капсуле

Имплантация капсулы с кораллово-кровяной смесью под кожу подопытному животному (крыса): в – капсула в сформированном подкожном кармане; г – рана ушита узловым швом

Для ортотопического помещения гранул коралла животным на латеральной стороне бедра под наркозом выбривали участок 25x25 мм с последующей обработкой антисептиком. Операционное поле изолировали стерильными салфетками. Острым и тупым способом обнажали среднюю треть бедренной кости. После мобилизации кости стерильным бором с концевой фрезой (диаметр 4 мм) выполняли окончательный критический дефект с полным обнажением костномозгового канала. Площадь дефекта составила $12,57 \pm 0,3 \text{ мм}^2$. Дефект всем животным пломбировали гранулами коралла – в 1-й группе размером 50-150 мкм, во 2-й 150-300 мкм. Кость иммобилизовали разработанным устройством для накостного остеосинтеза (Патент № 2016121487 (033652) от 31.05.2016).

Образцы костей и материалов после подкожной имплантации фиксировали в 10% формалине 7-10 дней с дальнейшим отмыванием в проточной воде в течении 1 часа. Образцы помещали в декальцинирующий раствор СофтиДек (Биовитрум) на 70-72 часа при температуре 4°C, затем снова отмывали проточной водой в течение 30 минут и 70° спиртом в течение 4-5 дней. После заливки в парафин изготавливали серийные срезы толщиной 10 мкм.

Подготовленные препараты окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори; по Вейгерт Ван Гизону, по Массон-Голднеру, для выявления возраста фибрина (гематоксилин Майера, раствор марциуса желтого, раствор кислотного красного, раствор фосфорновольфрамовой кислоты, раствор анилинового синего). Гистологическое исследование образцов осуществляли на аппаратно-программном комплексе Leica DM-2500. На гистологических препаратах материала после подкожной имплантации и препаратов бедренных костей в 20 полях зрения, на изображении 350x250 мкм, (площадь 87,5 мм²) оценивали: состав и толщину периферической соединительнотканной капсулы имплантата; количество и диаметр сосудов в имплантате и в соединительнотканной капсуле имплантата; площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани; площадь декальцинированных гранул коралла, представленных пустотами; показатель заполнения гранул коралла клеточными элементами; площадь хондрогенеза; площадь костного мозга; площадь костных структур.

Измерения морфометрических параметров проводили в программе ImadgJ (National Institutes of Health, США). Статистическая обработка полученных результатов выполнялась с использованием персонального компьютера под управлением операционной системы Microsoft Windows 8.1 и программного обеспечения Microsoft Excel 2016, StatSoft Statistica 6.0. Проверка на нормальность распределения исследуемого материала показала, что распределение данных отличается от нормального (тест Шапиро-Уилка). Поскольку распределение количественных данных отличалось от нормального, были использованы непараметрические методы описательной статистики (производилось вычисление медианы и интерквартильных интервалов) и анализа (представляющие собой функции, зависящие непосредственно от вариантов данной совокупности с их частотами). Описательная статистика количественных признаков представлена в виде центральной тенденции — медианы (Me) и дисперсии — интерквартильного размаха (верхний и нижний квартили: 25 и 75 процентиля). В тексте это представлено как Me [LQ;UQ].

Для определения статистической значимости различия средних величин использовался непараметрический статистический Т-критерий Вилкоксона. Сравнение трёх и более не связанных между собой групп по количественному признаку выполнено с использованием критерия Краскела-Уоллиса для признаков, имеющих распределение отличное от нормального. Для определения статистической значимости различия средних величин (в двух независимых группах по одному признаку) был использован непараметрический статистический критерий Манна – Уитни. Различия средних арифметических величин считали достоверными при 95%-ном пороге вероятности (нулевая гипотеза отклонялась, если уровень статистической значимости (p) был менее 0,05).

В главе 3 представлены результаты собственных исследований.

При изучении полученных данных при проведении тестов *in vitro* отмечено, что клетки на поверхности материала характеризовались веретеновидной или отростчатой формой и распределялись по поверхности относительно равномерно. Результаты флуоресцентной микроскопии демонстрируют выраженную адгезию клеток на использованных в эксперименте материалах. Установлено, что клетки в ходе миграции и пролиферации проникают в естественные углубления рельефа и нативные каналы материала. По данным сканирующей электронной микроскопии отмечены признаки синтетической активности клеток, начальные проявления накопления внеклеточного матрикса (рис. 2).

По данным MTS-теста увеличивается среднее значение метаболической активности клеток под действием кораллов в концентрации 100%, снижается под воздействием ОКФ 100%. В более низких концентрациях вещества они не оказали достоверного цитотоксического эффекта.

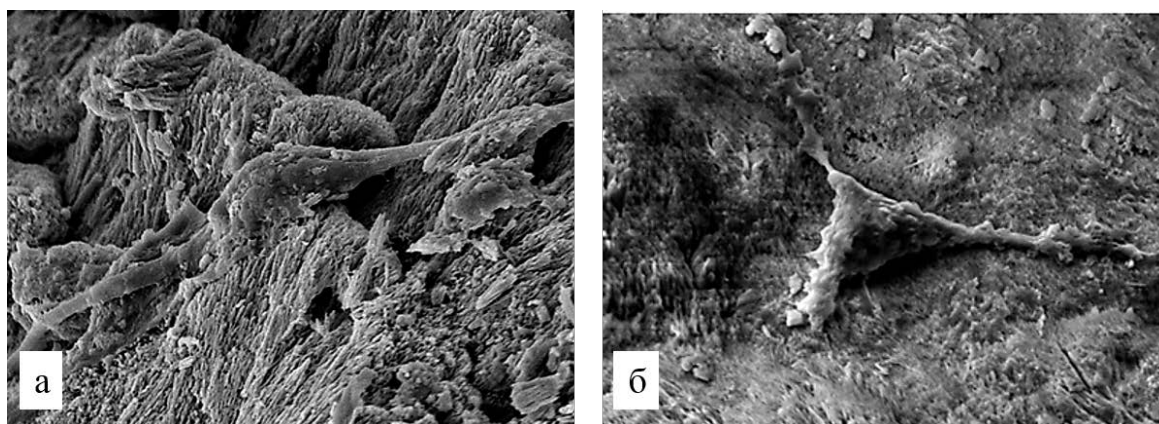


Рисунок 2 - Фибробласты дермы человека на поверхности скелета коралла *Acropora*
а – отдельно лежащий плотно адгезированный веретеновидный фибробласт; б – отдельно лежащий полигональный плотно адгезированный фибробласт. Сканирующая электронная микроскопия. Ув. ×4000

Проведенные исследования позволили установить ряд значимых фактов. Скелет коралла *Acropora* при примененной процедуре пробоподготовки существенным образом не снижает жизнеспособность клеток механоцитарного роста, не препятствует их адгезии в культуральной 2d системе. Кроме этого, он не угнетает существенным образом клеточный метаболизм в части клеточного дыхания, а значит – энергообеспечения клетки. Более того, при использовании максимально концентрированных смывов кораллов наоборот, интенсифицирует обменные процессы. Поверхность коралла, несмотря на сложный нативный рельеф, не препятствует адгезии клеток *in vitro* и является приемлемой для их распластывания и постепенной колонизации гранулы (рис. 3). Полученные данные позволяют предположить наличие синтетических процессов клеточными культурами, направленных на синтез компонентов внеклеточного матрикса.

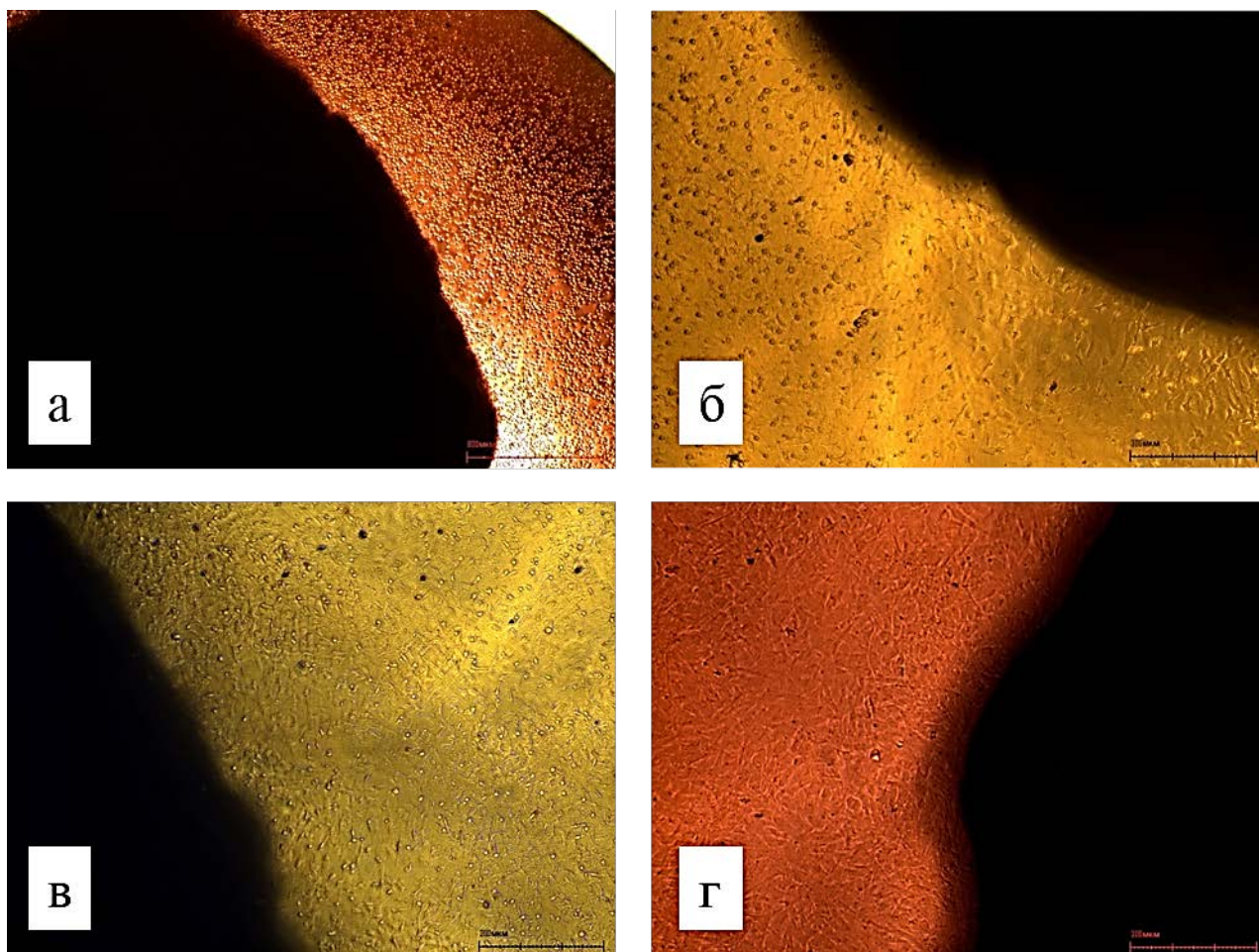


Рисунок 3 - Результаты культивирования BMSC в присутствии фрагментов скелета коралла Асгорога, проекция светонепроницаемого фрагмента скелета коралла
а – непосредственно после высева клеток; б – на 2 сут. культивирования; в, г – на 3 сут. культивирования

Реакция тканей животных на оперативное вмешательство и имплантацию материалов протекало по схеме, характерной для раневого процесса и реакции на введение инородного тела. Температура тела крыс приходила в норму к концу вторых суток. В экспериментальных группах явлений отторжения имплантатов, нагноения и расхождения швов у всех животных выявлено не было. Отсутствие данных явлений на всех сроках наблюдения в области имплантации свидетельствовало о биосовместимости коралла с тканями кожи животного.

При гистологическом исследовании материалов на 7-е сутки после подкожной имплантации во всех группах отмечено образование соединительнотканной капсулы по периметру (рис. 4). Под капсулой были расположены пустоты от декальцинированных гранул коралла. Наиболее выраженная капсула имплантата была в группах при подкожной имплантации коралла в желатиновой капсуле, вне зависимости от размера и обработки кровью, вероятно за счет коллагена, содержащегося в ее составе.

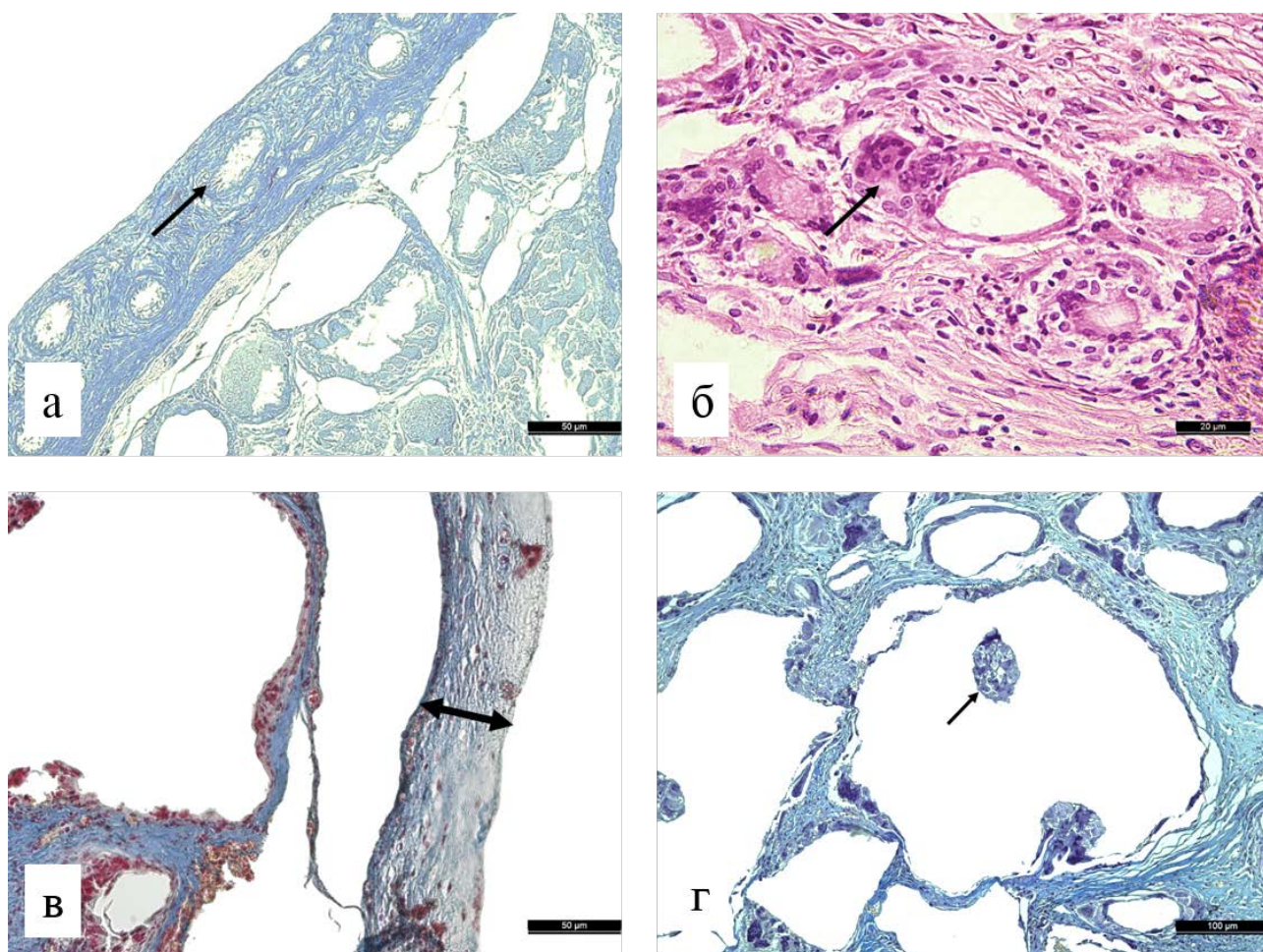


Рисунок 4 - Материалы после подкожной имплантации на 7-е сутки

а- сосуды, расположенные в капсуле имплантата (стрелка), 1-я группа, окраска по Маллори x200. Гигантские многоядерные клетки в области гранул коралла (стрелка). 1-я группа, окраска гематоксилином и эозином; б - гигантские многоядерные клетки в области гранул коралла (стрелка). 1-я группа, окраска гематоксилином и эозином, x500; в - тонкая капсула имплантата, двойной стрелкой указана капсула, 3-я группа. Окраска для выявления возраста фибрина, x200; г- гигантские многоядерные клетки (стрелка), расположенные в грануле коралла (представлены пустотами), 4-я группа. Окраска по Маллори, x100

Таблица 2 – Сравнение морфометрических данных 1-ой и 4-ой групп на 7-е сутки эксперимента

Показатель Me (LQ;UQ)	1 группа	4 группа	U-критерий Манна-Уитни
Толщина капсулы, мкм	65[55;72]	59[55;64]	0,138
Количество сосудов в имплантате, шт	4[3;4]	3[2;4]	0,088
Площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани, мкм ²	55[44;57]	26[23;33]	0,001*
Заполнение гранул коралла клеточными элементами, %	25[23;36]	10[8;12]	0,001*

*выделены достоверные отличия при $p < 0,05$

Наиболее выраженный ангиогенез был в группах, где предварительно гранулы коралла были смешаны с кровью и помещены в желатиновую капсулу (группы 1 и 4) (таб. 2). Во всех группах отмечалось различное количество гигантских многоядерных клеток, свидетельствующее о начале резорбции гранул коралла. Следует отметить, что мелкие гранулы коралла, предварительно смешанные с кровью и помещенные в желатиновую капсулу (1 группа), наиболее активно подвергались резорбции с последующим заполнением их клеточными элементами (рис. 5).

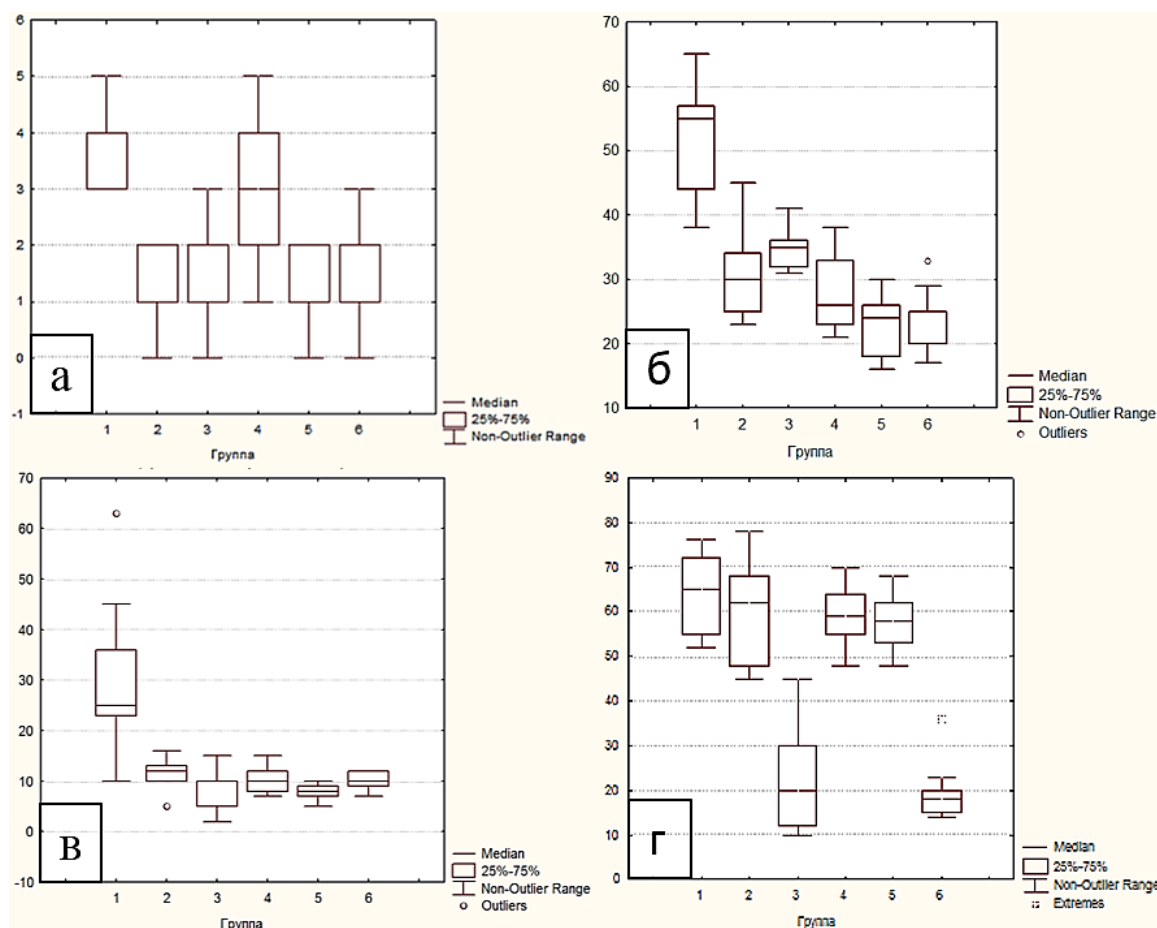


Рисунок 5 - Морфометрические параметры на 7-е сутки

а - количество сосудов в имплантате, шт; б - площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани, мкм^2 ; в - показатель заполнения гранул коралла, %; г - толщина капсулы имплантата, мкм . Критерий Краскела-Уоллиса $<0,0001$

На 14-е сутки эксперимента соединительнотканная капсула имплантата продолжала утолщаться во всех группах. Наиболее активный ангиогенез и образование рыхлой волокнистой соединительной ткани были в имплантатах, где гранулы коралла предварительно были обработаны кровью и помещены в желатиновую капсулу (1-я и 4-я группы). Резорбция гранул коралла также шла быстрее в данных группах. Однако, наиболее активно шла в 1-группе, при этом наиболее мелкие гранулы коралла практически полностью подвергались резорбции с последующим их замещением клеточными элементами, в том

числе гигантскими клетками инородных тел (рис. 6). При этом только в 1-й группе, где использовались мелкие гранулы коралла, обработанные кровью, площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани превалировала над пустотами от декальцинированного коралла. Происходило увеличение количества гигантских многоядерных клеток во всех группах. На всем протяжении эксперимента данные клетки встречались как по периферии, так и в пустотах от растворенных гранул коралла.

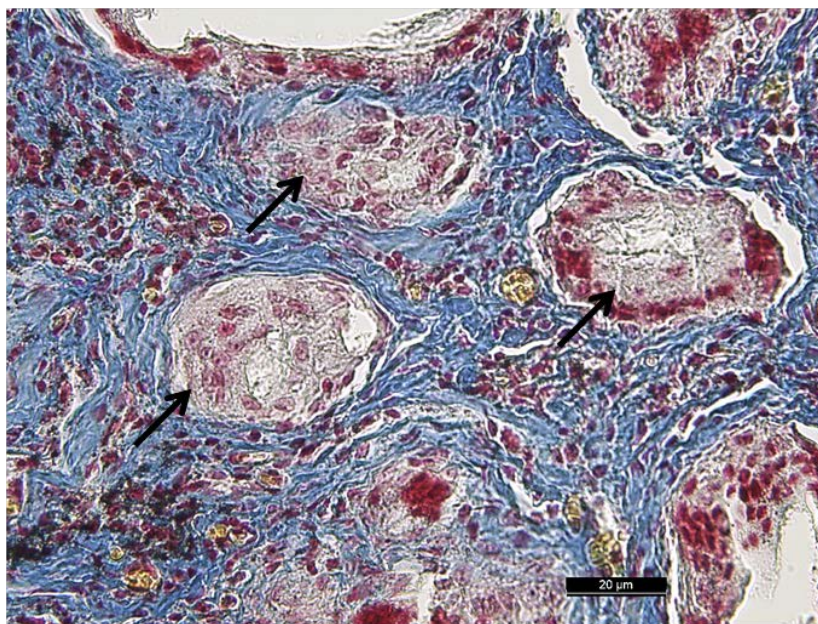


Рисунок 6 - Полная резорбция мелких гранул коралла и заполнение пустот клеточными элементами (стрелки). 1-я группа, 14-е сутки, окраска для выявления возраста фибрина, x400

При гистологической характеристике материала, полученного после подкожной имплантации на 21-е сутки, в 1-й группе отмечены признаки гетеротопического остеогенеза, наиболее выраженного по периферии имплантата под соединительнотканной капсулой. Определялись участки хондрогенеза, при этом площадь хрящевых клеток составила 12[12;20] мкм. Также отмечены обширные зоны с остеопрогениторными клетками, расположенные по периферии имплантата (рис.7). В центральных отделах препарата процессов остеогенеза выявлено не было. По периферии препарата в полях зрения встречались участки ретикулофиброзного костного регенерата, площадь которого составила 7[5;7] мкм². Он был представлен в виде хаотично расположенных молодых костных балок.

Во всех группах на 21-е сутки продолжалась активная резорбция гранул коралла, наиболее выраженная в 1-ой группе, где имплантировалась подкожно смесь мелких гранул коралла с кровью в желатиновой капсуле. На фоне активного ангиогенеза и образования рыхлой волокнистой соединительной ткани в данной группе выявлялись признаки остеогенеза. В других группах признаков остеогенеза не отмечалось. Также в 1-ой группе на

данный срок эксперимента было отмечено истончение капсулы по сравнению с предыдущим сроком.

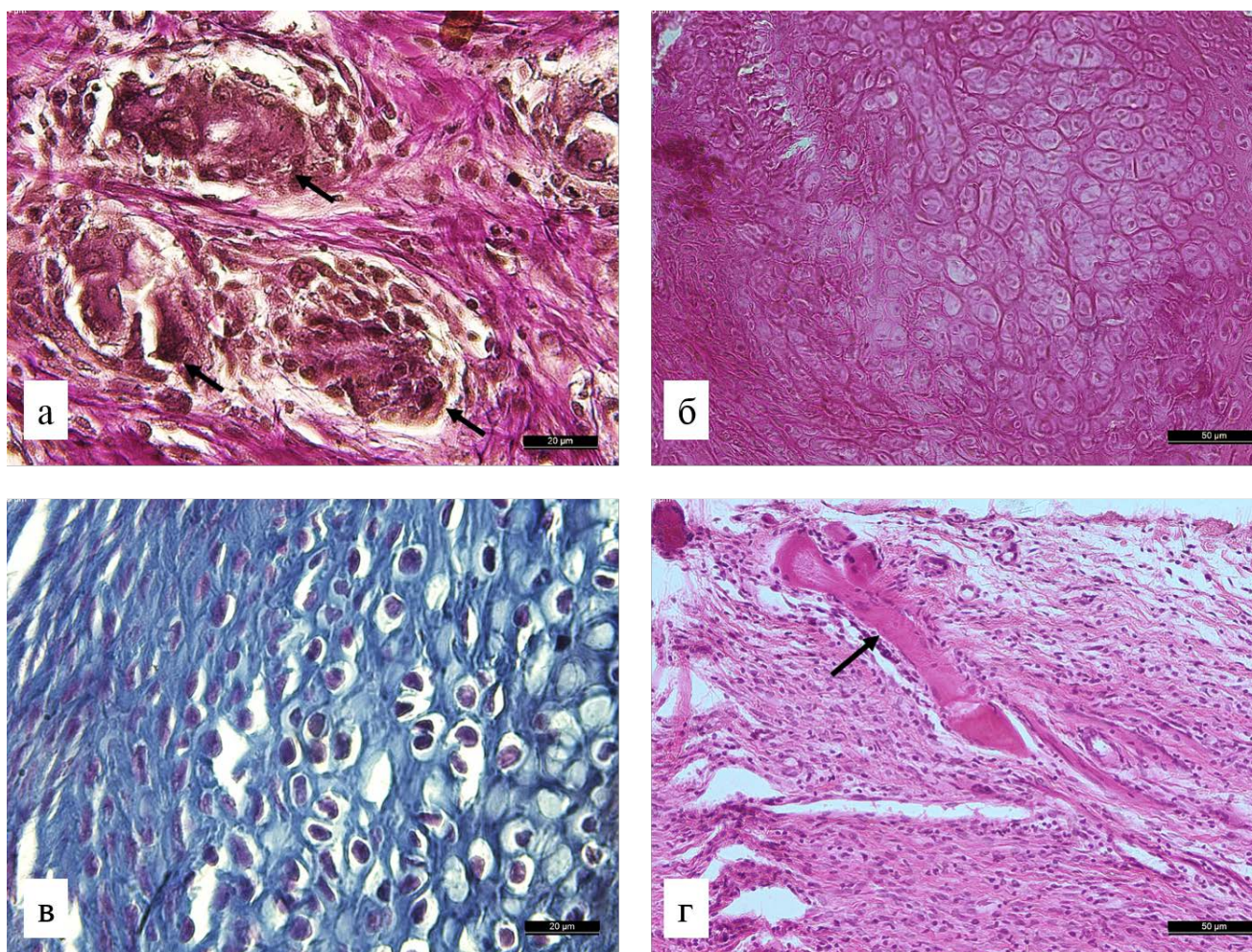


Рисунок 7 - Препараты материалов после подкожной имплантации на 21-е сутки, 1-я группа

а- резорбция гранул коралла (указана стрелками) и их замещение клеточными элементами, окраска по Вейгерту-Ван Гизон, х400. б - хондрогенез по периферии имплантата, окраска гематоксином и эозином х200, в - остеопрогениторные клетки в имплантате, окраска по Маллори х400, г - формирование ретикулофиброзной костной ткани, стрелкой указана костная балка, окраска гематоксином и эозином х200

При гистологической характеристике материала после подкожной имплантации на 28-е сутки, в 1-й группе как в центре, так и по периферии имплантата под капсулой визуализировался хондрогенез, площадь хрящевых клеток составила $25[23;35]$ мкм². Отмечалось формирование костных трабекул, которые объединялись между собой и образовывали единые системы. Между ними были расположены каналы и полости. Отмечено, что полости были заполнены гемопозитическими островками, площадь которых составила $10[8;12]$ мкм². Процесс остеогенеза был наиболее выражен подкапсульно в периферической зоне имплантата.

На единичных участках препарата отмечено объединение сформированной капсулы имплантата с новообразованными костными структурами. Во многих полях зрения определялись остеопрогениторные клетки. Следует отметить, что на некоторых участках была отмечена перестройка новообразованной костной ткани в более зрелую пластинчатую с формированием остеогенных структур (рис. 8). Единично визуализировались остеоны.

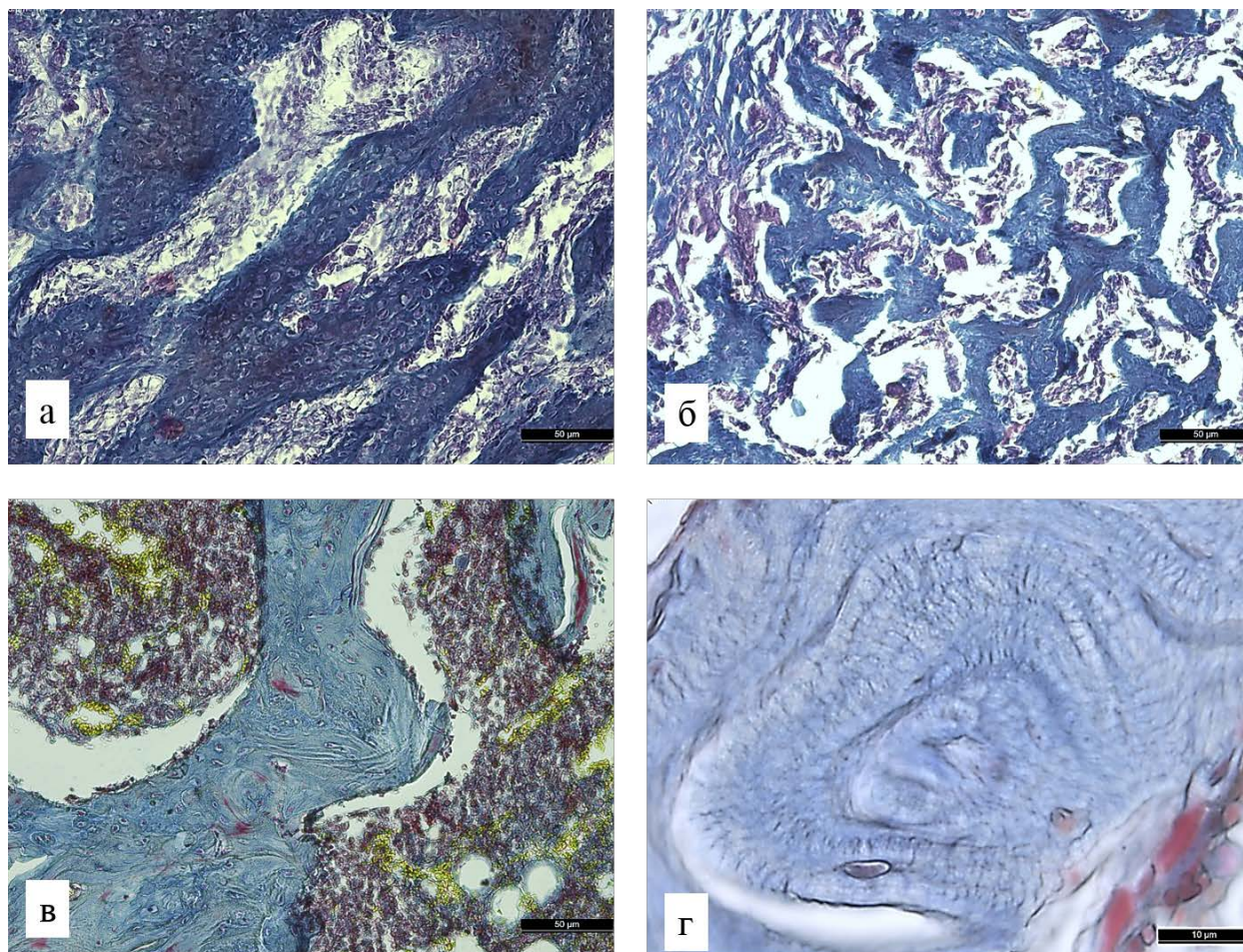


Рисунок 8 - Препараты материалов после подкожной имплантации на 28-е сутки, 1-я группа

а, б- ретикулофиброзная костная ткань, окраска по Маллори x200, в - формирование пластинчатой костной ткани, окруженной костным мозгом, окраска для выявления возраста фибрина, x200, г - формирование пластинчатой кости, окраска для выявления возраста фибрина, x1000

В остальных группах на 28-е сутки продолжались процессы резорбции. Происходило истончение капсулы имплантата в 1-й и 4-й группах. Следует отметить продолжающийся гетеротопический остеогенез в 1-й группе в виде образования костного мозга, формирования пластинчатой костной ткани. В 4-й группе, где подкожно имплантировались крупные гранулы коралла, смешанные с кровью в желатиновой капсуле, отмечались начальные признаки остеогенеза в виде образования участков хрящевой ткани и единичных костных структур.

При изучении полученных статистических данных следует отметить, что как желатиновая капсула, так и смешивание гранул коралла статистически достоверно положительно влияют на образование важных морфологических структур для дальнейшего остеогенеза (рис. 9).

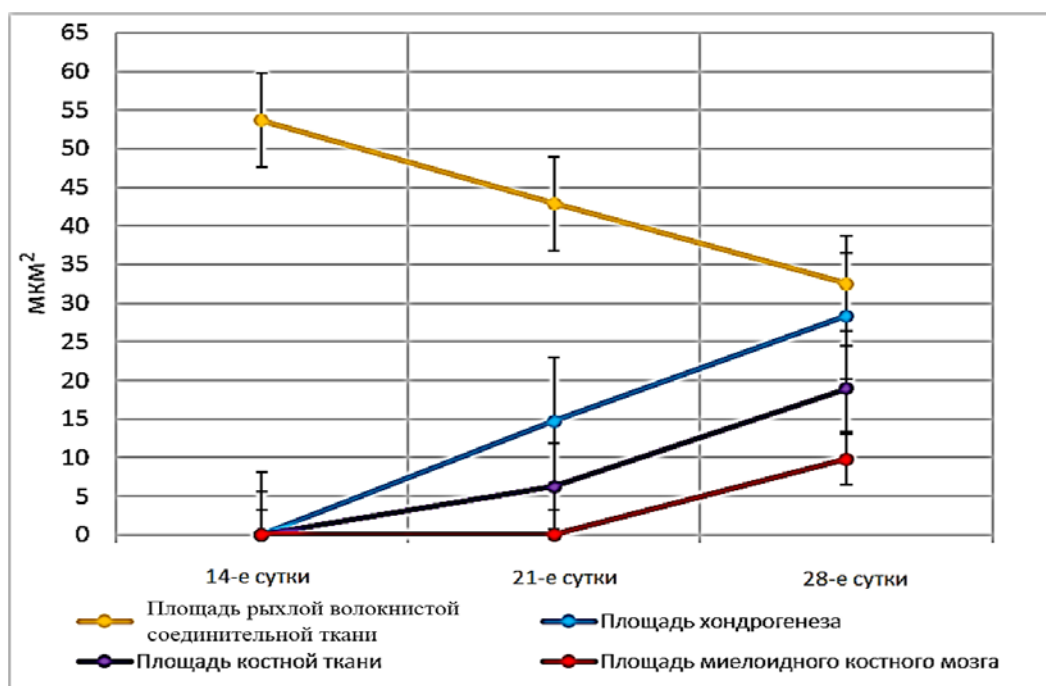


Рисунок 9 – Взаимоотношение остеогенеза от морфологических параметров, 1-я группа - смесь мелких гранул коралла с кровью в желатиновой капсуле

Отсутствие явлений гетеротопического остеогенеза в группах при использовании гранул коралла в желатиновой капсуле без смешивания с аутокровью являлось следствием отсутствия клеточных элементов крови и организации кровяного сгустка. При использовании желатиновой капсулы образуется более выраженная соединительнотканная капсула, окружающая коралл, чем в группах без её использования. Это наблюдение позволило сделать заключение о том, что использование желатиновой капсулы замедляло процессы резорбции. Однако в группах, где происходило предварительное смешивание с аутокровью, резорбция шла активнее, несмотря на образовавшуюся соединительнотканную капсулу, окружающую имплантат. Таким образом, при предварительной обработке коралла кровью желатиновая капсула с ее способностью ускорять формирование соединительнотканной капсулы вокруг имплантата создавала необходимые условия для возникновения гетеротопического остеогенеза.

Эктопически имплантированный коралл без желатиновой капсулы является биосовместимым, но не обладает остеогенной реакцией. Однако, при применении остеоиндуцирующих материалов, остеогенных клеток, факторов роста, а в настоящей работе имплантация в желатиновой капсуле с периферической венозной кровью вызывает

гетеротопическое образование костной ткани. Источником костного регенерата в данной работе являлись элементы кровяного сгустка, фиброциты и остеокласты. Желатиновая капсула позволила на время ограничить гранулы коралла от окружающих тканей с пулом клеток периферической венозной крови, что способствовало наиболее выраженному образованию клеточных элементов и в последующем привело к образованию ретикулофиброзной костной ткани. Подкожная имплантация гранул коралла в желатиновой капсуле без крови не вызывала гетеротопический остеогенез, что подтверждено статистическими данными. Мелкие гранулы коралла - 50-150 мкм, по сравнению с крупными – 150-300 мкм, подвергались более быстрой резорбции на фоне выраженного ангиогенеза.

При костной пластике костного дефекта бедренной кости у животных во всех группах отмечалась резорбция гранул коралла, которая была более выраженная в 7-й группе при использовании мелких гранул коралла. На 14-е сутки отмечалось образование ретикулофиброзной костной ткани, площадь которой превалировала в 7-й группе. Также на данный срок отмечалось формирование неоднородного периоста под устройством для остеосинтеза, толщина которого достоверно не отличалась между группами на одинаковые сроки. Наиболее активные процессы шли со стороны эндоста. Во всех группах визуализировалась интеграция костного регенерата в виде активного ангиогенеза. Следует отметить, что мелкие гранулы коралла наиболее активно резорбировались (рис. 10).

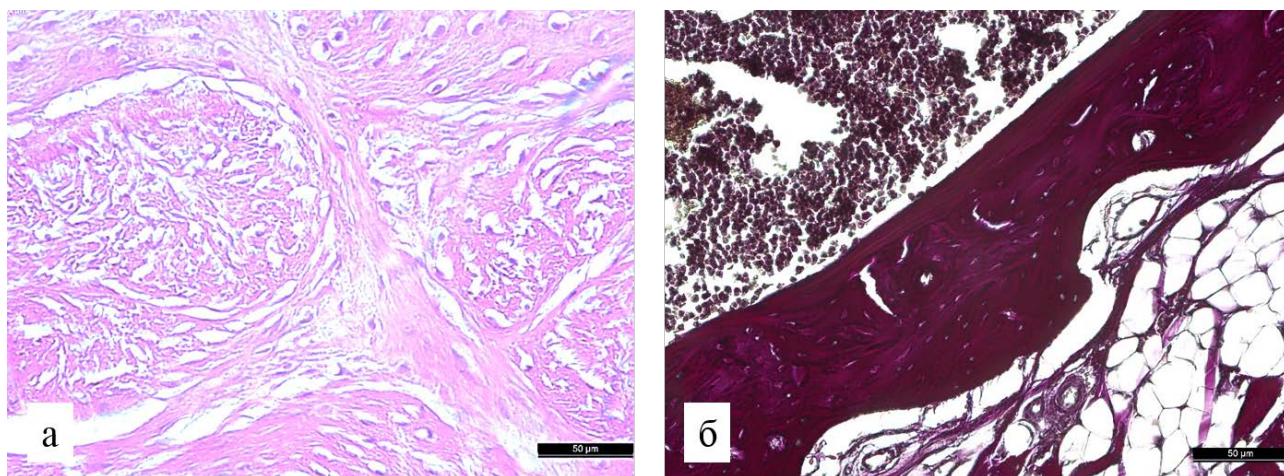


Рисунок 10 - Гистологическая картина препаратов бедренных костей, 8-я группа, 14-е сутки

а- замещение клеточными элементами гранул коралла, окраска гематоксилином и эозином x200; б - формирование пластинчатой костной ткани. 7-я группа, 28-е сутки, окраска по Вейгерт-Ван Гизон, x400

На 28-е сутки отмечалась продолжающаяся резорбция гранул коралла, наиболее активная в 7-й группе. Во всех группах отмечалось образование зрелой пластинчатой

костной ткани, а также формирование лакун с костным мозгом, площадь которых превалировала в 7-й группе, где дефект закрывали мелкими гранулами коралла (рис. 11).

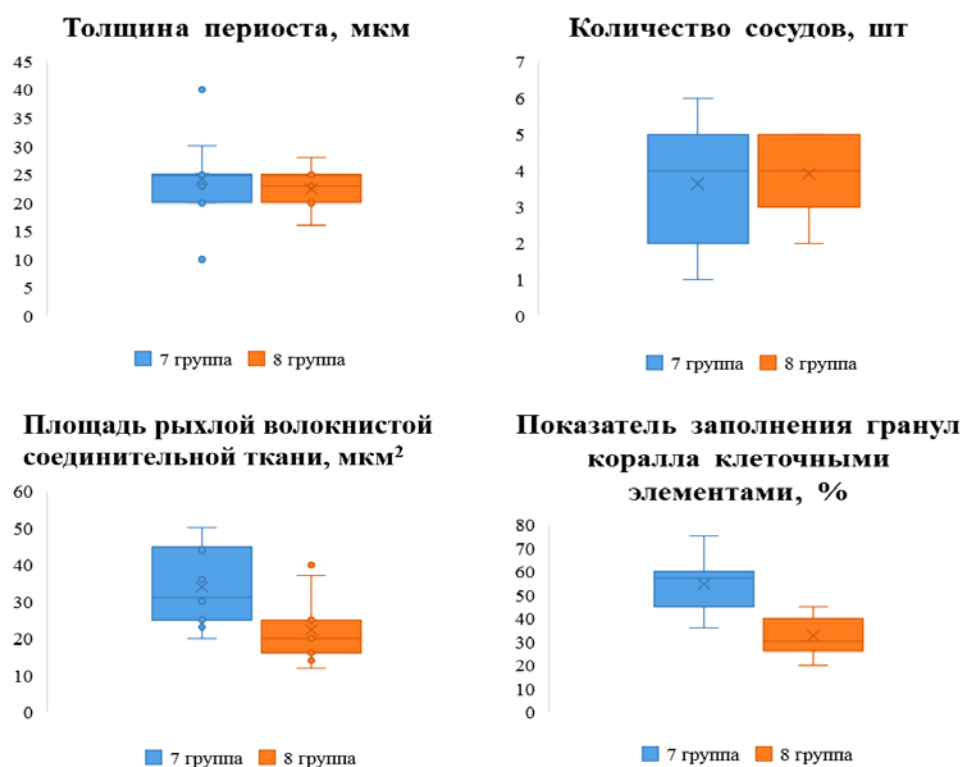


Рисунок 11 – Сравнение морфометрических данных 7-й и 8-й групп на 28-е сутки эксперимента

Таким образом, вне зависимости от размера гранул коралл обладает остеоиндуктивным свойством, более выраженным при использовании мелких гранул.

ВЫВОДЫ

1. В тестах *in vitro* было показано, что скелет коралла рода *Acropora* не обладает цитотоксичностью и не препятствует адгезии культуры клеток механоцитарного ряда (BMSC, HFb).
2. Скелет натурального коралла при подкожном введении в желатиновой капсуле с предварительной обработкой аутокровью стимулирует гетеротопическое образование костной ткани. При этом использование желатиновой капсулы с клетками периферической венозной крови внутри способствует образованию и накоплению клеточных элементов, приводя к формированию ретикулофиброзной костной ткани на 21-е сутки эксперимента. Использование мелких гранул коралла в желатиновой капсуле с кровью приводит к более выраженному гетеротопическому остеогенезу. При этом к концу эксперимента в данной группе остеобластов было больше на 39 %, чем при использовании крупных гранул коралла в желатиновой капсуле с кровью.
3. При подкожной имплантации коралла признаков отторжения выявлено не было, во всех группах отмечена резорбция гранул коралла, активное образование рыхлой волокнистой

соединительной ткани, активный ангиогенез. При использовании мелкой фракции гранул коралла размером 50-150 мкм, смешанных с аутокровью в желатиновой капсуле, отмечается выраженный остеогенный эффект за счет усиленного ангиогенеза, быстрой резорбции гранул с последующим их замещением клеточными элементами к концу эксперимента на 95 %.

4. Костная пластика критического костного дефекта гранулами коралла приводит к образованию зрелой костной ткани на месте резорбируемых гранул коралла. При этом на 28-е сутки площадь костной ткани больше на 50% в группах, где использовали для костной пластики мелкие гранулы коралла, чем в группах с крупными гранулами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В экспериментальных исследованиях по получению костных трансплантатов следует учитывать положительный эффект предварительной обработки биологического остеопластического материала аутокровью и помещения его в желатиновую капсулу. При выборе размера гранулированных форм остеопластических материалов следует отдавать предпочтение таким, размер которых составляет 50-150 мкм. Одновременное применение аутокрови, желатиновой капсулы и гранул скелета натурального коралла позволяет получить эффективный регенерат костной ткани для последующего ортотопического помещения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Сучков Д.И.** Морфологическая оценка репаративной регенерации костной ткани в экспериментальной ране // Д.И. Сучков // Сб. материалов Всероссийского студ. научного форума с Международным участием «Студенческая наука – 2016». г. Санкт-Петербург. – 2016. – С.124.

2. **Сучков, Д.И.** Морфологическое исследование репаративной регенерации костной ткани при диафизарных переломах в эксперименте / Д.И. Сучков // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с Международным участием, посвященный 120-летию годовщине со дня рождения профессора Б.М. Соколова (3-4 июня 2016 г.).- Рязань, 2016.- С. 203-204.

3. **Сучков, Д.И.** Морфологическое исследование репаративной регенерации костной ткани в эксперименте / Д.И. Сучков// Сборник тезисов докладов LXX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2016».- Минск (Беларусь), 2016.- С. 1224.

4. **Сучков, Д.И.** Особенности репаративной регенерации костной ткани в эксперименте / Д.И. Сучков // Сборник материалов II Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (15-16 сентября 2016 г.).- Рязань, 2016.- С. 287-288.

5. Изучение репаративного остеогенеза при использовании устройства для подготовки пломбировочной массы / **Д.И. Сучков**, А.В. Павлов, А.А. Виноградов, О.А. Юнеман // Фундаментальные и прикладные аспекты морфогенеза человека (26-28 октября 2017 г.). - Оренбург, 2017. - С.198-201.
6. **Сучков, Д.И.** Сравнение способов погружного на костного остеосинтеза в эксперименте / Д.И. Сучков, А.В. Павлов // III Всероссийская, 14-я межрегиональная с Международным участием Научная сессия молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (15-16 марта 2017 г.). - Нижний Новгород, 2017. - С. 468-469.
7. **Сучков Д.И.** Стимуляция репаративного остеогенеза при использовании инкубированного измельченного коралла рода *Acropora* с применением экспериментальной модели на костного остеосинтеза / Д.И. Сучков, А.В. Павлов // Гены и клетки. - 2017. -Том 12, № 3. - С. 239-240. - (Содерж. журн.: Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине (Москва 15-18 ноября 2017 г.).
8. **Сучков Д.И.** Морфологические особенности гетеротопического остеогенеза при применении устройства для подготовки пломбировочной массы костных дефектов / Д.И. Сучков, А.В. Павлов, А.А. Виноградов // Материалы Всероссийской конф. молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии». - Рязань, 2017. - С.56-57.
9. Гистологическая оценка остеорепаративных процессов в костной ране при использовании измельченного коралла семейства *Acroporidae* / **Д.И. Сучков**, А.В. Павлов, А.А. Виноградов, О.А. Юнеман // Материалы Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей»: сборник трудов «Вопросы морфологии XXI века». - Санкт-Петербург, 2018.- Выпуск 5.- С. 240-243.
10. Морфологическая характеристика остеогенеза при использовании кораллово-кровяной смеси в эксперименте / **Д.И. Сучков**, А.В. Павлов, А.А. Виноградов, М.В. Савельева // Морфология. - 2018.- Выпуск 3.- С. 267-268.- (Содерж. журн.: Материалы XIV Конгресса Международной ассоциации морфологов (19-22 сентября 2018 г.)).
11. Морфологическая характеристика репаративного остеогенеза при использовании кораллово-кровяной смеси в эксперименте / **Д.И. Сучков**, О.А. Юнеман, М.В. Савельева, А.В. Павлов // **Наука молодых (Eruditio Juvenium)**. – 2018. - Том 6, №4. - С. 524-531.
12. Морфологические особенности репаративного остеогенеза при применении инкубированного коралла с аутокровью в эксперименте / **Д.И. Сучков** [и др.] // **Медицинский вестник Башкортостана**. - 2018. - Т. 13, №5(77).- С.43-47.- (Соавт.: А.В. Павлов, О.А. Юнеман, А.А. Виноградов, С.Р. Жеребяткина, В.Е. Тимофеев).

13. Морфологические особенности репаративного остеогенеза при применении устройства для подготовки пломбировочной массы / **Д.И. Сучков**, А.В. Павлов, О.А. Юнеман, А.А. Виноградов // Материалы Всероссийской научной конференции "Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей" / под ред. Р.В. Деева.- Рязань, 2018.- С. 79-81.

14. Экспериментальная модель остеосинтеза и возможность ее использования при переломах диафиза трубчатых костей / А.В. Павлов, А.А. Виноградов, В.Е. Тимофеев, **Д.И. Сучков** // Травма - 2018: мультидисциплинарный подход: сборник тезисов Международной конференции / Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова. - Москва, 2018.- С. 199.

15. Морфологические особенности костного регенерата при применении нового устройства для погружного остеосинтеза в эксперименте / **Д.И. Сучков** [и др.] // **Acta biomedica scientifica**.- 2019.- Вып. 4 (1).- С. 155-161.- (Соавт.: А.В. Павлов, А.А. Виноградов, С.Р. Жеребятьева, В.Е. Тимофеев, Г.С. Лазутина, Н.В. Овчинникова, В.Н. Тарасова).

16. Экспериментальное изучение гетеротопического остеогенеза, индуцированного гранулами натурального коралла семейства *Acroporidae* рода *Acropora* / **Д.И. Сучков** [и др.] // Морфология. - 2019.- Т.155, №2.- С.275-276.- (Соавт.: А.В. Павлов, А.А. Виноградов, А.В. Павлов, С.Р. Жеребятьева, В.Е. Тимофеев, В.Н. Тарасова).

17. Устройство для накостного остеосинтеза трубчатых костей в эксперименте: **патент №2638442** Российская Федерация / Виноградов А.А., Андреева И.В., Павлов А.В., **Сучков Д.И.**, Мнихович М.В., заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, заявл. № 2016121487 от 31.05.2016; опубликовано 13.12.2017, 10 с.

18. Способ приготовления пломбировочной массы для закрытия дефекта кости: **патент №2676478** Российская Федерация / Виноградов А.А., Андреева И.В., Павлов А.В., **Сучков Д.И.**, заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, заявл. № 2017136241 от 12.10.2017; опубликовано 29.12.2018, 15 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BMSC - bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга свиньи клетки

DMEM - dulbecco's modified Eagles medium, питательная среда

HFb - human fibroblasts, фибробласты дермы человека

MTS-тест - одноступенчатый тест оценки метаболической активности клеток

PBS - Phosphate buffered saline, Натрий-фосфатный буфер

ГО – гетеротопический оксификат

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки