

Гистологические исследования биопсийного материала костной ткани животных при использовании остеопластического биоконпозиционного покрытия имплантов, ускоряющего консолидацию

Дмитрий Алексеевич Артемьев, Сергей Владимирович Козлов,
Ирина Владимировна Зирук, Владимир Сергеевич Клоков, Яна Евгеньевна Ярош

Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия, e-mail: ahdnvj@mail.ru

Аннотация. В современной ветеринарной и гуманной медицине достаточно остро стоит вопрос оптимизации репаративного остеогенеза, направленного на ускорение консолидации, профилактики бактериальной инфекции, метод стабилизации, а также активацию остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств. Этого можно достичь с помощью остеопластических биоконпозиционных покрытий имплантов. Определена роль таких компонентов, как гидроксиапатит, метилурацил, амоксициллин в метаболических процессах, направленных на регенераторные, антибактериальные и метаболические процессы остеогенеза. Гистологическим методом изучены количественные и качественные аспекты сращения перелома средней трети диафиза длинных трубчатых костей (лучевая кость) при применении разработанного биоконпозиционного покрытия. Материалом для изучения являлись гистотопографические препараты костных регенератов, полученные на 35-е сутки с помощью иглы для трепанобиопсии костной ткани, после установления консолидации смоделированного перелома за счет имплантов с разработанным остеопластическим покрытием. В результате исследования гистотопографических материалов при использовании 3,5 и 5 % биоконпозиционного покрытия для ускорения консолидации установлено, что в опытных группах отсутствует какое-либо количество разработанного компонента, что свидетельствует о биосовместимости с полной биоинтеграцией без проявления аллергизирующего и цитостатического эффекта. На всем протяжении эксперимента между опытными группами существенной разницы не выявлено, в каждой визуализируется восстановленная микроциркуляция с множеством физиологических гаверсов каналов с кровеносными сосудами, нервной системой и адекватной трофикой тканей. Гистологическое исследование сформировавшегося костного регенерата необходимо для подтверждения законченного ускоренного процесса остеогенеза у мелких непродуктивных животных.

Ключевые слова: гистология; остеон; гаверсов канал; остеокит; пластинки; перелом; консолидация; собаки; биоконпозиционный материал; остеосинтез.

Для цитирования: Артемьев Д. А., Козлов С. В., Зирук И. В., Клоков В. С., Ярош Я. Е. Гистологические исследования биопсийного материала костной ткани животных при использовании остеопластического биоконпозиционного покрытия имплантов, ускоряющего консолидацию // Аграрный научный журнал. 2023. № 10. С. 87–93. <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2023i10pp87-93>.

VETERINARY MEDICINE AND ZOOTECHNICS

Original article

Histological examination of biopsy material of animal bone tissue using osteoplastic biocomposite coating of implants accelerating consolidation

Dmitry A. Artemyev, Sergey V. Kozlov, Irina V. Ziruk, Vladimir S. Klovov, Yana E. Yarosh

Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilova, Saratov, Russia, e-mail: ahdnvj@mail.ru

Abstract. In modern veterinary and humane medicine, the issue of optimizing reparative osteogenesis, aimed at accelerating consolidation, preventing bacterial infection, a stabilization method, as well as activating osteoinductive and osteoconductive properties, is quite acute. This can be achieved using osteoplastic biocomposite coatings on implants. The significant role of such components as hydroxyapatite, methyluracil, amoxicillin in metabolic processes aimed at regenerative,





antibacterial and metabolic processes of osteogenesis has been determined. The group of authors set the goal of the study: to study, using a histological method, the quantitative and qualitative aspects of fusion of a fracture of the middle third of the diaphysis of long tubular bones (radius), in an experiment, using the developed biocomposite coating. The material for this study was histotopographic preparations of bone regenerates obtained on day 35 using a needle for trephine biopsy of bone tissue, after consolidation of the simulated fracture was established using implants with the developed osteoplastic coating. As a result of the study of histotopographic materials using 3.5% and 5% biocomposite coating to accelerate consolidation, in the experimental groups there is no amount of the developed composite, which indicates biocompatibility with complete biointegration without allergenic and cytostatic effects. Throughout the experiment, no significant difference was found between the experimental groups; in each group, restored microcirculation was visualized with many physiological Haversian canals with blood vessels, the nervous system and adequate tissue trophism. Histological examination of the formed bone regenerate is necessary to confirm the completed accelerated process of osteogenesis in small non-productive animals.

Keywords: histology; osteon; Haversian canal; osteocyte; plates; fracture; consolidation; dogs; biocomposite material; osteosynthesis.

For citation. Artemyev D. A., Kozlov S. V., Ziruk I. V., Klovov V. S., Yarosh Ya. E. Histological examination of biopsy material of animal bone tissue using osteoplastic biocomposite coating of implants accelerating consolidation. *Agrarnyy nauchnyy zhurnal* = The Agrarian Scientific Journal. 2023;(10):87–93. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.28983/asj.y2023i10pp87-93>.

Введение. Существенная роль в этиопатогенезе сниженной консолидации переломов отведена ухудшенной васкуляризации и объективным гемоциркуляторным повреждениям в области патологической подвижности костных отломков [1, 2, 3, 5]. Осложнения данного процесса выражаются в многообразии патологических изменений, связанных с формированием дегенеративно-дистрофических патологий, определяются инфекциями и ятрогенными воздействиями, что в свою очередь отрицательно влияет на потенцию физиологической репаративной регенерации [4, 9, 12].

Коллективом авторов разработано биокомпозиционное остеопластическое покрытие на имплантаты на основе гидроксиапатита, метилурацила, амоксициллина и полилактида для интрамедуллярного введения, в частности, в зону нарушения анатомической целостности костей или ложного сустава.

Благодаря данному покрытию оптимизируются условия для репаративного остеогенеза, который характеризуется затруднительным, трудоемким и стадийным процессом. При этом сокращаются сроки консолидации перелома за счет остеокондуктивного, остеоиндуктивного и антибактериального потенциала, с учетом полной биоинтеграции без реакции на инородное тело. Прижизненная оценка биореологических свойств костной структуры возможна благодаря фундаментальным морфологическим исследованиям на светооптическом уровне срезов после декальцинации срезов, гистотопограмм и рентгеноморфологического изучения [6, 8, 10, 11]. Данные методы способны дать характеристику и определить вектор, скорость и результат процесса консолидирования, васкуляризации и ангиогенеза, а также ответить на некоторые вопросы, связанные с особенностями строения костных регенератов [7, 13, 14].

Цель настоящего исследования – изучение репаративного остеогенеза перелома средней трети диафиза длинных трубчатых костей (лучевая кость) в эксперименте.

Методика исследований. Работа была проведена в центре коллективного пользования «Молекулярная биология» на кафедре «Болезни животных и ВСЭ» и в морфологической лаборатории на кафедре «Морфология, патология животных и биология» Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова. В эксперимент были включены 14 собак годовалого возраста, массой тела $10,5 \pm 2,5$ кг.

В контрольной группе ($n = 4$) однократно осуществляли перпендикулярный латеро-медиальный забор костного регенерата со средней трети диафиза лучевой кости с помощью иглы для трепанобиопсии костной ткани BEST LISAS (БЕСТ ЛИАС) BSL1305, 13G. При этом общую анестезию животным проводили миорелаксантом Медитин 0,1 % (0,1 мл/кг) и комплексным анестетиком Телазол 100 мг (10–13 мг/кг), также применяли местную инфильтрационную анестезию с помощью 0,5%-го Новокаина в дозе 5–10 мл на животное.

Животным I опытной группы ($n = 5$) с целью изучения гистологических и рентгенологических объектов проводили кортикотомию лучевой кости в области средней трети диафиза. Осуществляли интрамедуллярный остеосинтез спицей с разработанным остеопластическим биокомпозиционным покрытием (3,5 %), состоящим из 1 г гидроксиапатита, 1 г метилурацила, 0,05 г амоксициллина, 3,5 г полилактида и 50 миллилитров хлороформа. Метод нанесения покрытия на спицы – погружение (окунание), при этом доводили толщину покрытия до 2,0 мм. После консолидации смоделированных переломов, подтвержденных клиническим и рентгенологическим методом, на 37-е сутки, для гисто-



логического исследования проводили забор костного регенерата зоны сращения костной ткани с помощью иглы для трепанобиопсии BEST LISAS, по отработанной методике.

Животным II опытной группы ($n = 5$), с учетом аналогичного проведения алгоритма эксперимента I опытной группы, применяли покрытие (5 %), состоящее из 1 г гидроксиапатита, 1 г метилурацила, 0,05 г амоксициллина, 5 г полилактида и 50 миллилитров хлороформа.

Следует отметить, что у всех экспериментальных животных произошла полная консолидация моделированных переломов, после окончания эксперимента все имплантаты были удалены.

Рентгенографию проводили с помощью рентгеновского аппарата EcoRayOrange 1040HF (Панель-детектор PZ-medical 1417) (Южная Корея). Для контроля динамики минерализации в области перелома на аппаратно-компьютерном комплексе ZOOMED (ПО: VetConsole; Версия ПО: V5.0.0.6; Название фирмы: PZMedical; Авторские права: Copyright(C) 2021 PZMedicalTechnology-CompanyLimited) обрабатывали оцифрованные изображения рентгеновских снимков, исполненных в двух стандартных (латеро-медиально, дорзо-вентрально) ортогональных проекциях.

Гистологическое исследование костной ткани, полученной благодаря толстоигольной пункционной биопсии, проводили по стандартной методике в нашей модификации [8].

Изначально проводили декальцинацию полученного материала с помощью декальцинатора на основе муравьиной и соляной кислот, затем фиксировали материал и изготавливали гистологические срезы на санном микротоме (МС – 2), которые затем окрашивали с помощью тионин-пикриновой кислоты по методу Шморля. Исследование готовых гистопрепаратов осуществляли с помощью светооптического микроскопа (Микромед-2, Китай) под увеличением $\times 40$, $\times 200$, $\times 400$.

Результаты исследований. При сравнительном рассмотрении гистотопографических препаратов костных регенератов в контрольной группе отмечали физиологическое морфологическое строение, представленное пластинчатой тканью, состоящее из гаверсовых (вдоль) и фолькмановских (поперек) каналов, расположенных в компактной и губчатой структуре. Визуализируется достаточно большое количество остеобластов, формирующих матрикс и остеоцитов, поддерживающий данный матрикс. На рис. 1, 2, 3 достаточно визуализируются округлой формы остеоны (А), гаверсовы каналы с кровенаполненными кровеносными сосудами (Б), также концентрически расположенный матрикс (В) со вставочными пластинками. В них видны остециты (Г), связанные между собой отростками, также между остеонами располагаются остаточные пластинки старых разрушенных остеонов с общим слоем генеральных пластинок (Д).

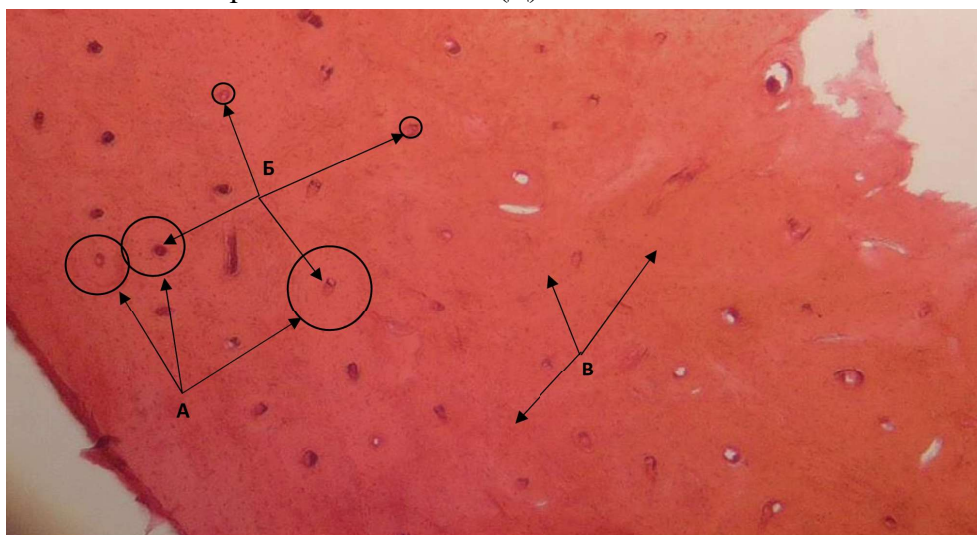


Рис. 1. Гистологическое строение костной ткани животных контрольной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. $\times 40$

На рис. 4–9 представлена гистологическая картина законсолидированной зоны моделированных переломов с учетом применения 3,5 и 5 % биокомпозиционного остеопластического покрытия имплантатов. Важно отметить, что время, потраченное на сращение, составило 36–38 суток во всех опытных группах.

На гистосрезках опытных групп отсутствует какое-либо количество разработанного покрытия, что свидетельствует о биосовместимости с полной биоинтеграцией без проявления аллергизирующего и цитостатического эффекта.

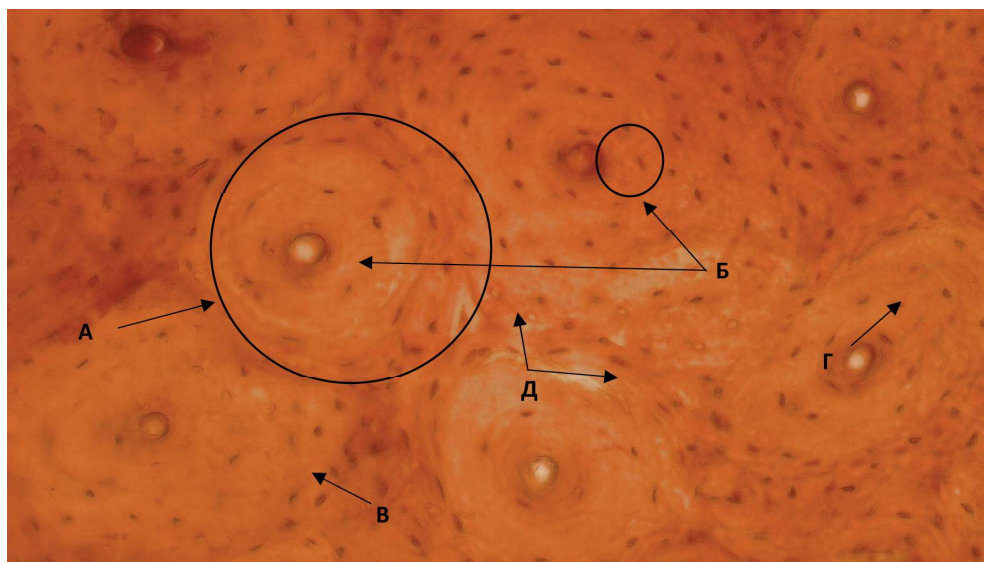


Рис. 2. Гистологическое строение костной ткани животных контрольной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. $\times 200$

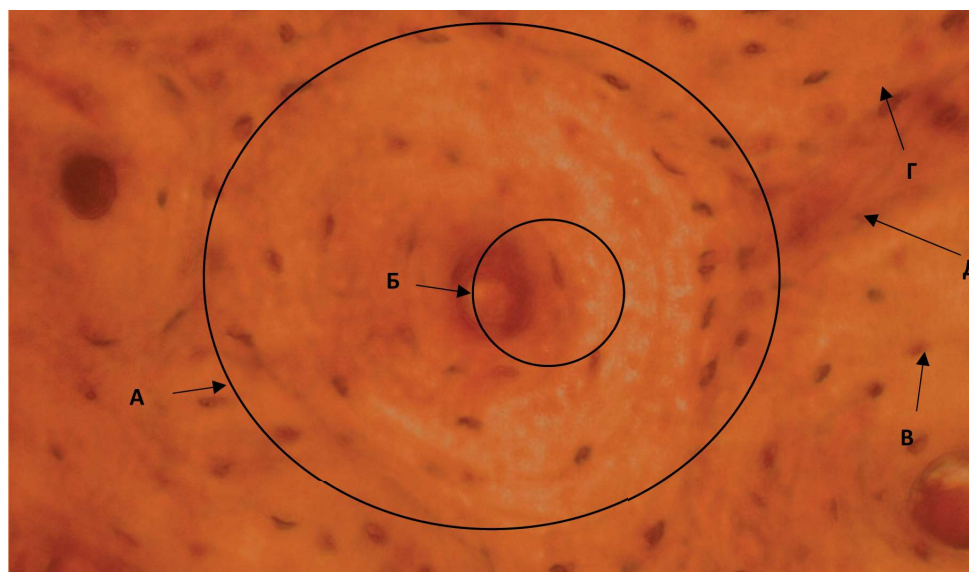


Рис. 3. Гистологическое строение костной ткани животных контрольной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. $\times 400$

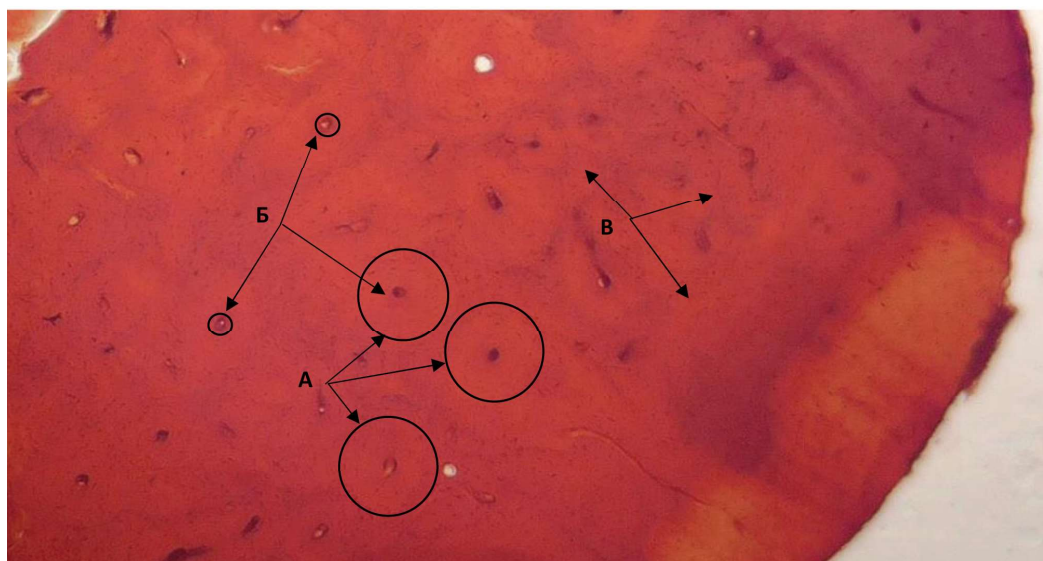


Рис. 4. Гистологическое строение костной ткани животных I опытной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. $\times 40$

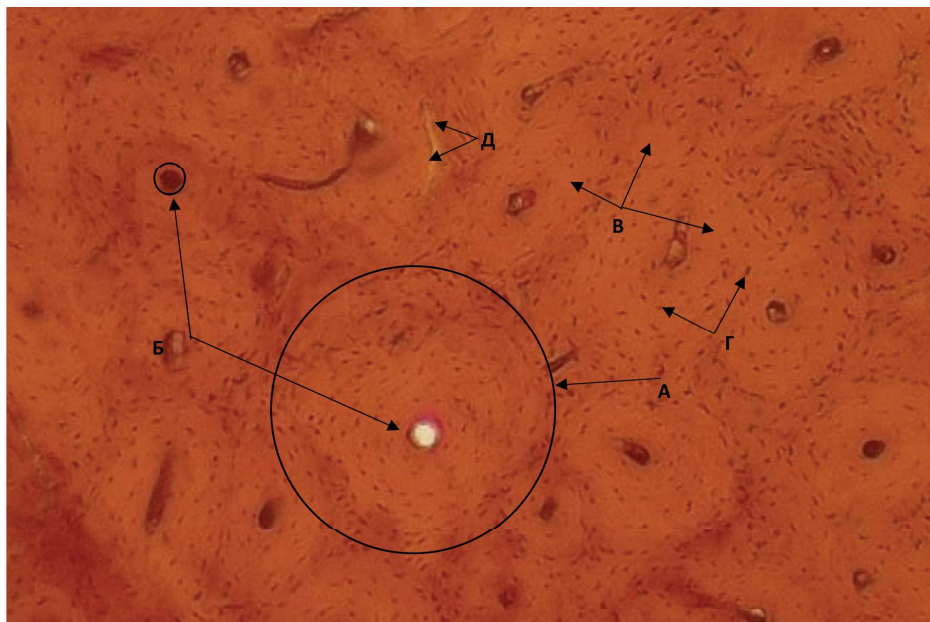


Рис. 5. Гистологическое строение костной ткани животных I опытной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. ×200

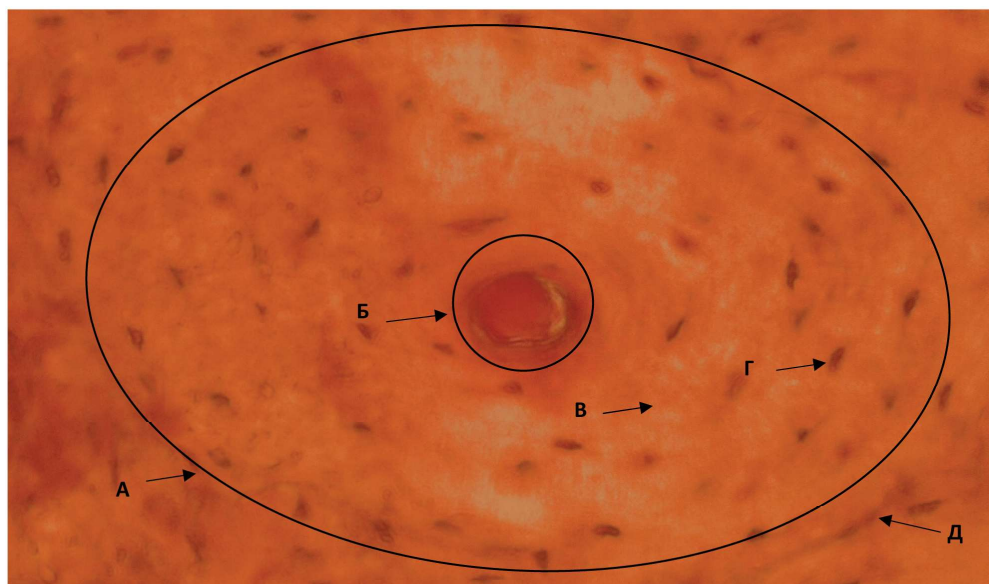


Рис. 6. Гистологическое строение костной ткани животных I опытной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. ×400



Рис. 7. Гистологическое строение костной ткани животных II опытной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. ×40

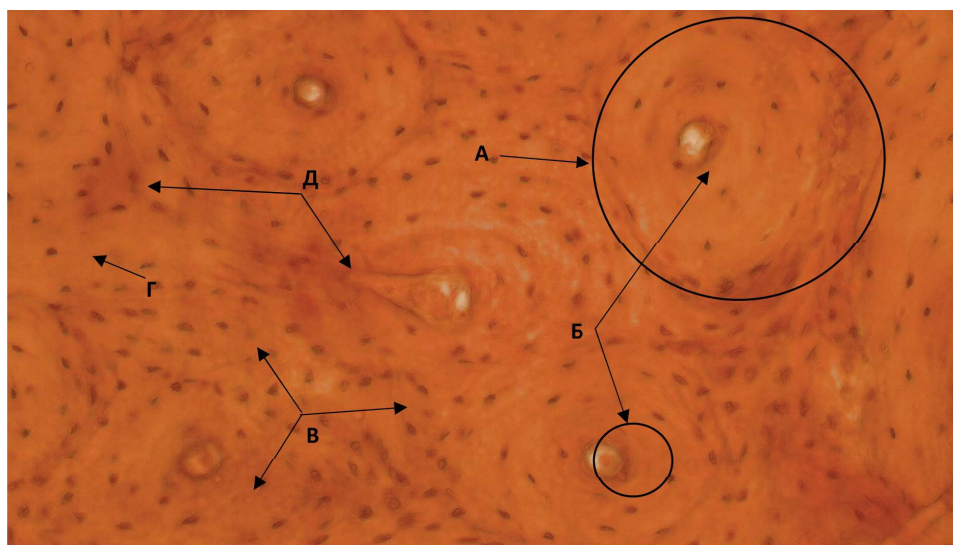


Рис. 8. Гистологическое строение костной ткани животных II опытной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. $\times 200$

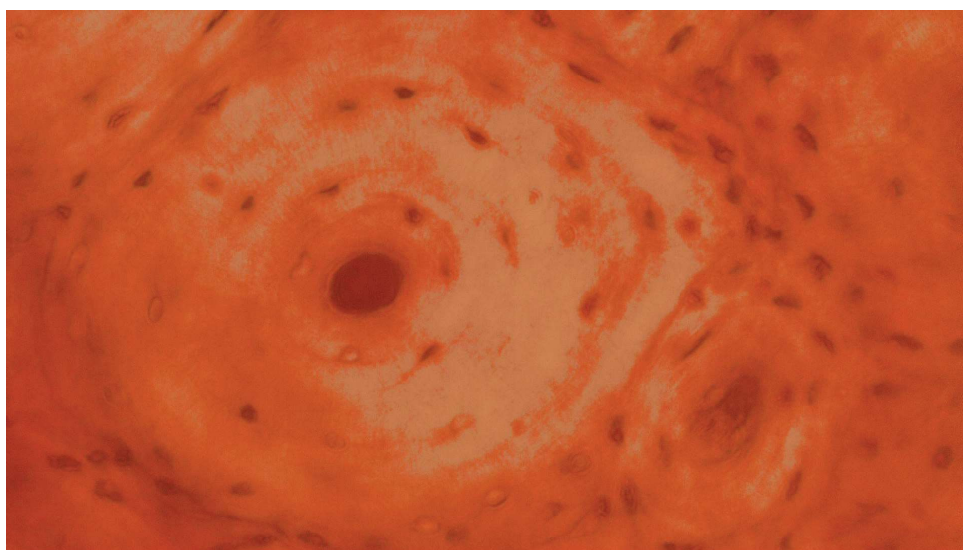


Рис. 9. Гистологическое строение костной ткани животных II опытной группы. Поперечный срез. Окраска по методу Шморля. $\times 400$

На гистосрезах (см. рис. 4, 5, 6) при применении 3,5 % покрытия отсутствует воспалительный процесс, препятствующий формированию здоровой костной ткани, наличие небольшого межтканевого пространства указывает на более компактную структуру вновь образованных структур. Визуализируется восстановленная микроциркуляция с множеством физиологических гаверсовых каналов с кровеносными сосудами, нервной системой и адекватной трофикой тканей. Отсутствие фиброзной, склерозно-хрящевой ткани свидетельствует об ускоренном процессе репаративного остеогенеза.

На гистосрезах (см. рис. 7, 8, 9), где использовали покрытие 5 %, представлена аналогичная картина, что и в I опытной группе, свидетельствующая об остеокондуктивности, остеоиндуктивности, регенерации и клеточной пролиферации за счет применения биокомпозита. Наличие большого количества остеонов, отличная васкуляризация и достаточное количество вставочных и генеральных пластинок свидетельствуют о законченном процессе консолидирования.

Заключение. Экспериментальный период проходил без использования антибактериальных препаратов, при этом септических осложнений, влияющих на макро- и микроорганизм, во всех опытных группах не наблюдали, что свидетельствует о бактерицидном действии разработанного покрытия. Также было установлено отсутствие воспалительных, апластических, аллергических и токсических реакций со стороны макро- и микроорганизма.

Спустя 37 суток, клинически (биологическая проба), рентгенологически и гистологически был определен физиологический процесс консолидации, при условии, что физиологическая скорость сращения до кинической консолидации у годовалых животных составляет 56–70 дней (ускорение на 43 %).

Объективных отличий между использованием 3,5 и 5 % покрытия имплантатов нет.



1. Динамика тканевых изменений при одно- и двухэтапном лечении хронического остеомиелита с использованием биорезорбируемого материала, импрегнированного ванкомицином (сравнительное экспериментально-морфологическое исследование) / В. А. Конев [и др.] // Гены и клетки. 2021. № 1. С. 29–36.
2. Дисперсный биокомпозит на основе волластонита/гидроксиапатита: остеопластический потенциал с точки зрения рентгенологии / В. И. Апанасевич [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. 2020. № 3. С. 88–89. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-3-88-89.
3. Изосимова А. Э. Сравнительная количественная оценка репаративного процесса в костной и параоссальных тканях при имплантации сплс с покрытием нитридами титана и гафния в эксперименте // Ветеринарный врач. 2016. № 1. С. 22–28.
4. Ирьянов Ю. М., Силантьева Т. А. Современные представления о гистологических аспектах репаративной регенерации костной ткани (обзор литературы). Клеточные источники репаративного остеогенеза. Гетерогенность клеточной популяции в области травматического повреждения кости // Гений ортопедии. 2007. № 2. С. 111–116.
5. Конев В. А., Лабути Д. В., Божкова С. А. Экспериментальное обоснование клинического применения стимуляторов остеогенеза в травматологии и ортопедии (обзор литературы) // Сибирское медицинское обозрение. 2021. № 4. С. 5–17. DOI:10.20333/250001.36-2021-4-5-17.
6. Морфологическая и рентгенологическая характеристика регенерации костной ткани в эксперименте / Э. А. Надыров [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. 2021. № 18(3). С. 94–104. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2021-18-3-12>.
7. Морфологическая характеристика регенерации костной ткани при использовании трансплантационной костной аутомески / Э. А. Надыров [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. 2019. № 4. С. 57–62.
8. Пахт А. В., Манизер Н. М. Особенности обработки костной ткани // Библиотека патологоанатома (науч.-практ. журнал). 2008. № 89. С. 6–11.
9. Смирнов А. В., Румянцев А. Ш. Строение и функции костной ткани в норме и при патологии // Нефрология. 2014. № 6. С. 9–25.
10. Смирнов А. В., Румянцев А. Ш. Строение и функции костной ткани в норме и при патологии // Нефрология. 2015. № 1. С. 8–17.
11. Сравнительный морфологический аспект изучения костей домашних и диких животных / И. В. Зирук [и др.] // Аграрная наука. 2022. № 5. С. 18–21.
12. De Margerie E. D., Robin J. P., Verrier D., Cubo J., Groscolas R., Castanet J. Assessing a relationship between bone microstructure and growth rate: a fluorescent labelling study in the king penguin chick (*Aptenodytes patagonicus*) // Journal of Experimental Biology. 2004. No. 207. P. 869–879. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.00841>.
13. Stout S. D., Crowder C. Bone remodeling, histomorphology, and histomorphometry. Bone Histology: An Anthropological Perspective, Boca Raton: CRC Press, 2011. P. 1–21. DOI: <https://doi.org/10.1201/b11393>.
14. Streeter M. Histological age-at-death estimation. Bone Histology: An Anthropological Perspective, Boca Raton: CRC Press, 2011. P. 135–152.

REFERENCES

1. Dynamics of tissue changes in one- and two-stage treatment of chronic osteomyelitis using a bioresorbable material impregnated with vancomycin (comparative experimental morphological study) / V. A. Konev et al. *Genes and cells*. 2021;(1):29–36. (In Russ.).
2. Dispersed biocomposite based on wollastonite / hydroxyapatite: osteoplastic potential from the point of view of radiology / V. I. Apanasevich et al. *Pacific Medical Journal*. 2020;3:88–89. DOI: 10.34215/1609 1175 2020-3-88-89. (In Russ.).
3. Izosimova A. E. Comparative quantitative assessment of the reparative process in bone and paraosseous tissues during implantation of spokes coated with titanium and hafnium nitrides in the experiment. *Veterinary doctor*. 2016;(1): 22–28. (In Russ.).
4. Iryanov Yu. M., Silantieva T. A. Modern ideas about the histological aspects of reparative regeneration of bone tissue (literature review). Cellular sources of reparative osteogenesis. Heterogeneity of the cell population in the area of traumatic bone injury. *The Genius of Orthopedics*. 2007;(2): 111–116. (In Russ.).
5. Konev V. A., Labutin D. V., Bozhkova S. A. Experimental substantiation of the clinical use of osteogenesis stimulators in traumatology and orthopedics (literature review). *Siberian Medical Review*. 2021;(4):5–17. DOI:10.20333/250001.36-2021-4-5-17. (In Russ.).
6. Morphological and radiological characteristics of bone tissue regeneration in experiment / E. A. Nadyrov et al. *Problems of health and ecology*. 2021;18(3):94–104. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2021-18-3-12>. (In Russ.).
7. Morphological characteristics of bone tissue regeneration using transplantation bone automixture / E. A. Nadyrov et al. *Problems of health and ecology*. 2019;(4):57–62. (In Russ.).
8. Pakht A. V., Manizer N. M. Features of bone tissue processing. *Library of the pathologist (scientific and practical journal)*. 2008;(89):6–11. (In Russ.).
9. Smirnov A. V., Rummyantsev A. Sh. The structure and function of bone tissue in normal and pathological conditions. *Message. Nephrology*. 2014;(6): 9–25. (In Russ.).
10. Smirnov A. V., Rummyantsev A. Sh. The structure and function of bone tissue in normal and pathological conditions. *Nephrology*. 2015;(1):8–17. (In Russ.).
11. De Margerie E. D., Robin J. P., Verrier D., Cubo J., Groscolas R., Castanet J. Assessing a relationship between bone microstructure and growth rate: a fluorescent labeling study in the king penguin chick (*Aptenodytes patagonicus*). *Journal of Experimental Biology*. 2004;207:869–879. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.00841>. (In Russ.).
12. Comparative morphological aspect of the study of bones of domestic and wild animals / I. V. Ziruk et al. *Agrarian science*. 2022;(5):18–21.
13. Stout S. D., Crowder C. Bone remodeling, histomorphology, and histomorphometry. Bone Histology: An Anthropological Perspective, Boca Raton: CRC Press, 2011. P. 1–21. DOI: <https://doi.org/10.1201/b11393>.
14. Streeter M. Histological age-at-death estimation. Bone Histology: An Anthropological Perspective, Boca Raton: CRC Press, 2011. P. 135–152.

Статья поступила в редакцию 16.06.2023; одобрена после рецензирования 23.06.2023; принята к публикации 10.06.2023.
The article was 16.06.2023; approved after 23.06.2023; accepted for publication 10.06.2023.

