

УДК 576.5;57.053;57.054;57.085

## ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

<sup>1</sup>Шайхалиев А.И., <sup>1</sup>Стрецкий Г.М., <sup>2</sup>Краснов М.С., <sup>3</sup>Рыбакова Е.Ю., <sup>2</sup>Тихонов В.Е.,  
<sup>3</sup>Ямскава В.П., <sup>2</sup>Ямсков И.А.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России,  
Москва, e-mail: astemirsh@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт элементоорганических соединений  
им. А.Н. Несмеянова» РАН, Москва, e-mail: embrmsk@mail.ru;

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН,  
Москва, e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru

Изучали влияние на восстановление костной ткани при введении в искусственно вызванный дефект бедренной кости у крыс двух новых композиций: одна представляла собой синтетический гидроксиапатит (10–30 масс. %), хитозановый гель (70–90 масс. %), содержащий биорегулятор, выделенный из сыворотки крови крупного рогатого скота; другая – содержала хитозановый гель (90,0–99,9 масс. %) и сывороточный биорегулятор. В эксперименте изучали течение регенераторных процессов в костных дефектах под влиянием указанных материалов, характер взаимодействия композиции и регенерата в костной ране, воздействие композиции на регенераторный процесс в костной ране. Показано, что обе композиции обеспечивают повышенную способность стимулировать репаративные процессы костеобразования с восстановлением морфологически нормального костного матрикса, при этом отмечались восстановление плотной костной ткани, формирование костного мозга, а также остеонов на более ранних сроках, в отличие от контрольных групп, где в основном формируется губчатая кость.

**Ключевые слова:** рана, сыворотка крови, пептиды, кость

## THE INFLUENCE OF NEW COMPOSITIONS AT THE REPARATION OF BONE DEFECTS IN RATS IN THE EXPERIMENT

<sup>1</sup>Shaykhaliev A.I., <sup>1</sup>Stretskiy G.M., <sup>2</sup>Krasnov M.S., <sup>3</sup>Rybakova E.Y.,  
<sup>2</sup>Tikhonov V.E., <sup>3</sup>Yamskova V.P., <sup>2</sup>Yamskov I.A.

<sup>1</sup>I.M. Sechenov first Moscow state medical university, Moscow, e-mail: astemirsh@yandex.ru;

<sup>2</sup>A.N. Nesmeyanov Institute of organoelement compounds of Russian Academy  
of Sciences, Moscow, e-mail: embrmsk@mail.ru;

<sup>3</sup>Koltzov Institute of developmental biology of Russian Academy of Sciences, Moscow,  
e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru

Two new compositions were studied: one is a synthetic hydroxyapatite (10–30 wt.%) chitosan gel (70–90 wt. %) containing the bioregulator isolated from blood serum of cattle, the other – contained chitosan gel (90,0–99,9 masses. %) and serum bioregulator. These compositions were researched at artificial defect in the femur of rats in vivo. It was studied the regenerative processes in the bone defect under the influence of these materials, the nature of the interaction and composition of the regenerate bone in the wound, the effect of composition on the regenerative process in the bone wound. It is shown that both compositions provide an improved ability to stimulate reparative osteogenesis with recovery of morphologically normal bone matrix, noted restoring dense bone, bone marrow and osteones, unlike the control groups, where basically formed spongy bone.

**Keywords:** wound healing, serum, peptides, bone

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в настоящее время при применении остеоиндукторов и остеокондукторов для восстановления костных дефектов, разработка новых материалов продолжает оставаться актуальной задачей современной хирургии, в том числе челюстно-лицевой. Традиционным в биомедицинских исследованиях методом оценки влияния остеопластических материалов на заживление костных дефектов является создание искусственного костного дефекта с последующим изучением динамики его заживления. В данной работе были изучены две новые композиции, приготовленные на основе нового биорегулятора, выделенного из

сыворотки крови крупного рогатого скота, включенного в состав хитозанового геля: композиция Матрибон содержала синтетический гидроксиапатит; другая – Матрибон X – его не содержала.

Биорегулятор, выделенный из сыворотки крови крупного рогатого скота, представляет собой пептидно-белковый комплекс, стимулирует адгезию, миграцию и пролиферацию соединительно-тканых элементов, обеспечивает поддержание жизнеспособности клеток и репарацию ткани с сохранением всех морфологических единиц [1, 4, 2, 6]. Была показана эффективность данного биорегулятора в составе хитозанового геля при заживлении кожных

ран и ожогов в эксперименте на животных *in vivo* [6, 4]. Сывороточный биорегулятор способствовал восстановлению хрящевой ткани в эксперименте [3, 5].

**Целью настоящего исследования** явилось изучение влияния двух композиций на восстановление костной ткани при введении в искусственно вызванный костный дефект. Были изучены течение регенераторных процессов в костных дефектах, характер взаимодействия композиции и регенерата в костной ране.

#### Материалы и методы исследования

Исследование было проведено на самцах крыс Wistar, весом 180–220 г, которые содержались в стандартных условиях вивария ИБР им. Н.К. Кольцова РАН. Всем животным под наркозом в один проводили операцию по нанесению стандартного дефекта в дистальном эпифизе бедра (2×2 мм), разделяли на группы по 24 крыс в каждой: 1-я – контрольная, в костные дефекты ничего не вносили; 2-я – контрольная, в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля и гидроксиапатита (ГАП); 3-я – в костные дефекты вводили композицию *Матрибон X*; 4-я группа – в костные дефекты вводили композицию *Матрибон*.

Композиция *Матрибон* представляла собой синтетический гидроксиапатит (10-30 масс.%) (Гидроксиапол ГАП-99г-0,5; производство ЗАО «НПО Полистом»), хитозановый гель (70–90 масс.%), содержащий биорегулятор, который получали из сыворотки крови крупного рогатого скота по ранее разработанной методике [7]. Композиция *Матрибон X* представляла собой хитозановый гель (90,0–99,9 масс.%), содержащий сывороточный биорегулятор. Для предотвращения выпадения материалов из входного отверстия его закрывали стерильной тонкой коллагеновой пленкой. Сроки выведения животных из опытов – 14, 30, 90, 300-е сутки. В каждом сроке изучали гистологические срезы 6 крыс из группы. Животных выводили из эксперимента путем декапитации после эфирного наркоза, затем иссекали поврежденную конечность, включая большой вертел. Забранный материал фиксировали в 4%-м растворе формалина, затем проводили вырезку сегмента бедра, содержащего зону повреждения с захватом окружающих здоровых тканей на расстоянии 2–3 мм от раны. Фрагменты костной ткани декальцинировали в растворе ЭДТА и подвергали стандартной гистологической обработке с заливкой в парафин и окраской парафиновых срезов гематоксилином и эозином. При получении гистосрезов блоки ориентировали таким образом, чтобы нож проходил параллельно к направлению канала раны (поперечные срезы кости).

#### Результаты исследования и их обсуждение

На 14-е сутки во всех 4-х группах экспериментальных животных наблюдали образование обширных участков соединительной ткани, сохранение сетчатой структуры, расстояния между Гаверсовыми каналами были незначительными. При этом в контроле (1-я группа) и в 3-й группе на этом сроке

наблюдали обширные участки костно-мозговой ткани, а во 2-й группе были видны обширные участки окруженных соединительной тканью частиц ГАП. В 4-й группе расстояния между Гаверсовыми каналами несколько увеличивались, вокруг частиц ГАП в соединительной ткани наблюдали выраженную клеточную реакцию, представленную лимфо-макрофагальными элементами (рис. 1).

На 30-е сутки во всех группах наблюдали так же сохранение обширных участков, представленных соединительной тканью и сетчатой структурой. В 1-й группе расстояния между Гаверсовыми каналами продолжали оставаться незначительными, костный дефект на значительных территориях был заполнен клеточно-волоконистой соединительной тканью (ретикулофиброзная костная ткань), формировалась губчатая кость. Во 2-й и 3-й группе можно отметить увеличение расстояния между Гаверсовыми каналами. Во 2-й группе наблюдается формирование незрелой костной ткани. В 3-й, а также 4-й группах, наблюдали обширные участки костно-мозговой ткани. Кроме того, в 4-й группе участки, представленные соединительной тканью, резко уменьшены, а расстояния между Гаверсовыми каналами увеличены (рис. 2).

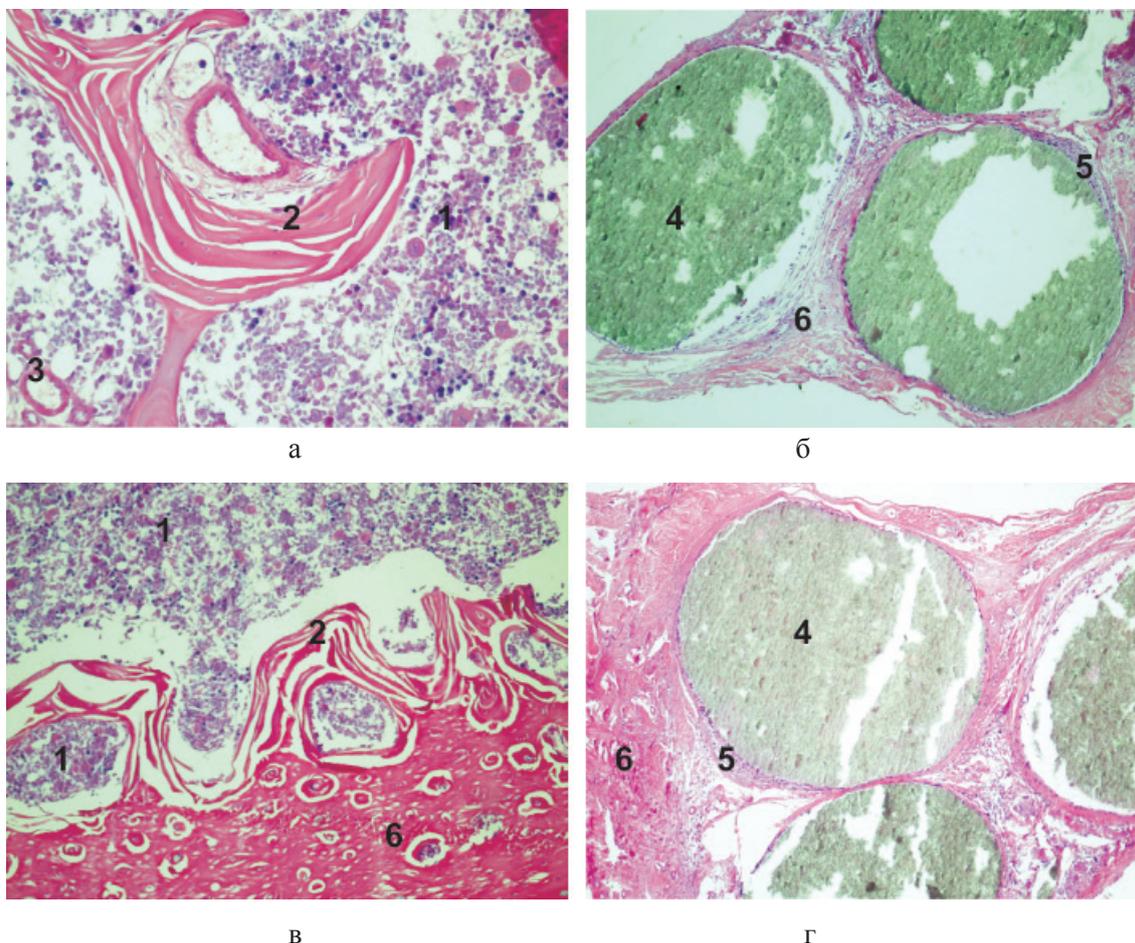
На 90-е сутки во всех группах наблюдали так же сохранение обширных участков, представленных соединительной тканью и сетчатой структурой, прослеживались обширные участки костно-мозговой ткани. Во 2-й группе уменьшается количество ГАП, включенного в соединительную ткань. В 3-й в 4-й группах отмечалось явное увеличение плотности костной ткани, существенное сужение Гаверсовых каналов в 4-й группе (рис. 3).

На 300-е сутки во всех группах наблюдали обширные участки костно-мозговой ткани. В 1-й и 2-й группах плотность костной ткани несколько повышена, по сравнению с предыдущим сроком. Во 2-й группе ГАП резорбировался и практически не визуализировался. В 3-й, и особенно 4-й группе следует отметить сужение Гаверсовых каналов за счет существенного увеличения плотности костной ткани (рис. 4).

Из полученных данных можно заключить, что уже на 14-е сутки эксперимента наблюдались признаки различной степени выраженности костеобразовательной активности. В сроки от 30 до 90 суток происходило замещение костных дефектов новообразованной костной тканью. При этом проявляла себя способность к остеointеграции, которая особенно ярко проявлялась на поздних сроках в опытных

3-й и 4-й группах, когда наблюдалось замуровывание фрагментов подсаженного материала в новообразованное костное вещество. Особо следует указать на довольно раннее появление признаков репаративного остеогенеза, что свидетельствует о доволь-

но высокой остеопотентности композиций, содержащих сывороточный биорегулятор. При незначительном содержании ГАП восстановление происходило за счет новообразующихся костных элементов, легко замещающих хитозановую основу композиции.



*Рис. 1. Состояние дефектов бедренных костей у крыс на 14-е сутки после нанесения травмы: а – в костные дефекты ничего не вносили (1-я контрольная группа); б – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля и гидроксиапатита (ГАП) (2-я группа); в – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля (90,0–99,9 масс. %) и сывороточного биорегулятора (3-я группа); г – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из гидроксиапатита (10–30 масс. %), хитозанового геля (70–90 масс. %) и биорегулятора, выделенного из сыворотки крови крупного рогатого скота (4-я группа). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение ок.  $\times 10$ . об.  $\times 20$ . Цифрами отмечены: 1 – костный мозг; 2 – пластинчатая костная ткань; 3 – сосуд; 4 – гранулы ГАП; 5 – фиброзная капсула; 6 – формирование плотной костной ткани*

### Заклучение

Проведенное исследование выявляет значительную роль сывороточного биорегулятора в процессах остеоиндукции и остеокондукции, то есть в процессе ранозаживления кости. Именно при применении композиций Матрибон и МатрибонХ отмечалась активная репарация кости, выражающаяся в восстановлении плотной костной

ткани, формировании костного мозга, восстановлении остеонов на более ранних сроках, в отличие от контрольных групп, где в основном формируется губчатая кость. Это позволяет рекомендовать применение композиций Матрибон и МатрибонХ для лечения различных переломов костей опорно-двигательной системы и в челюстно-лицевой хирургии.

Обе композиции обеспечивают повышенную способность стимулировать репаративные процессы костеобразования с восстановлением морфологически нормального костного матрикса. Матрибон рекомендуется для заполнения крупных дефектов костной ткани, а композиция

МатрибонХ, которая обеспечивает повышенную способность стимулировать пролиферацию фибробластов, остеобластов, может использоваться для восполнения дефектов мягких тканей, а также хрящевой и костной тканей за счет активации внутреннего клеточного резерва.

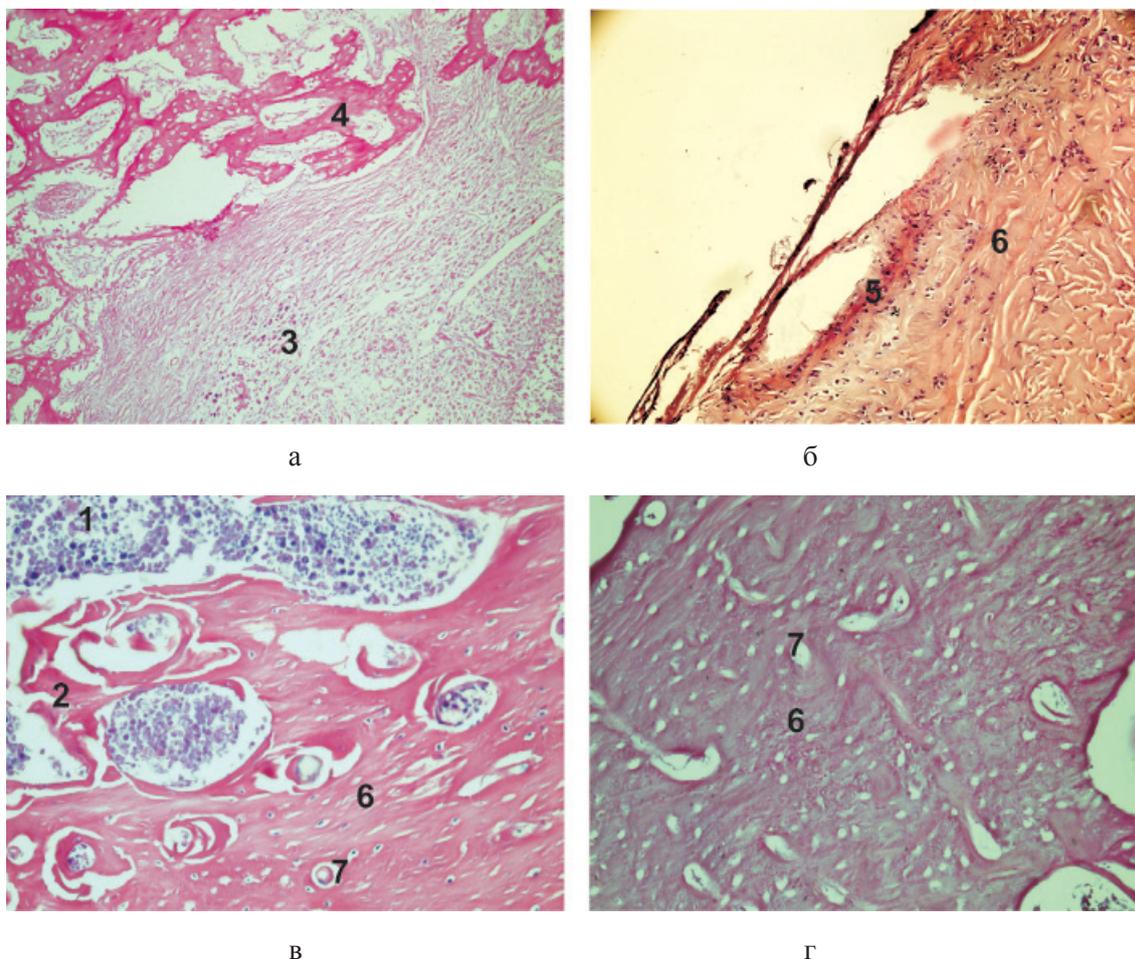
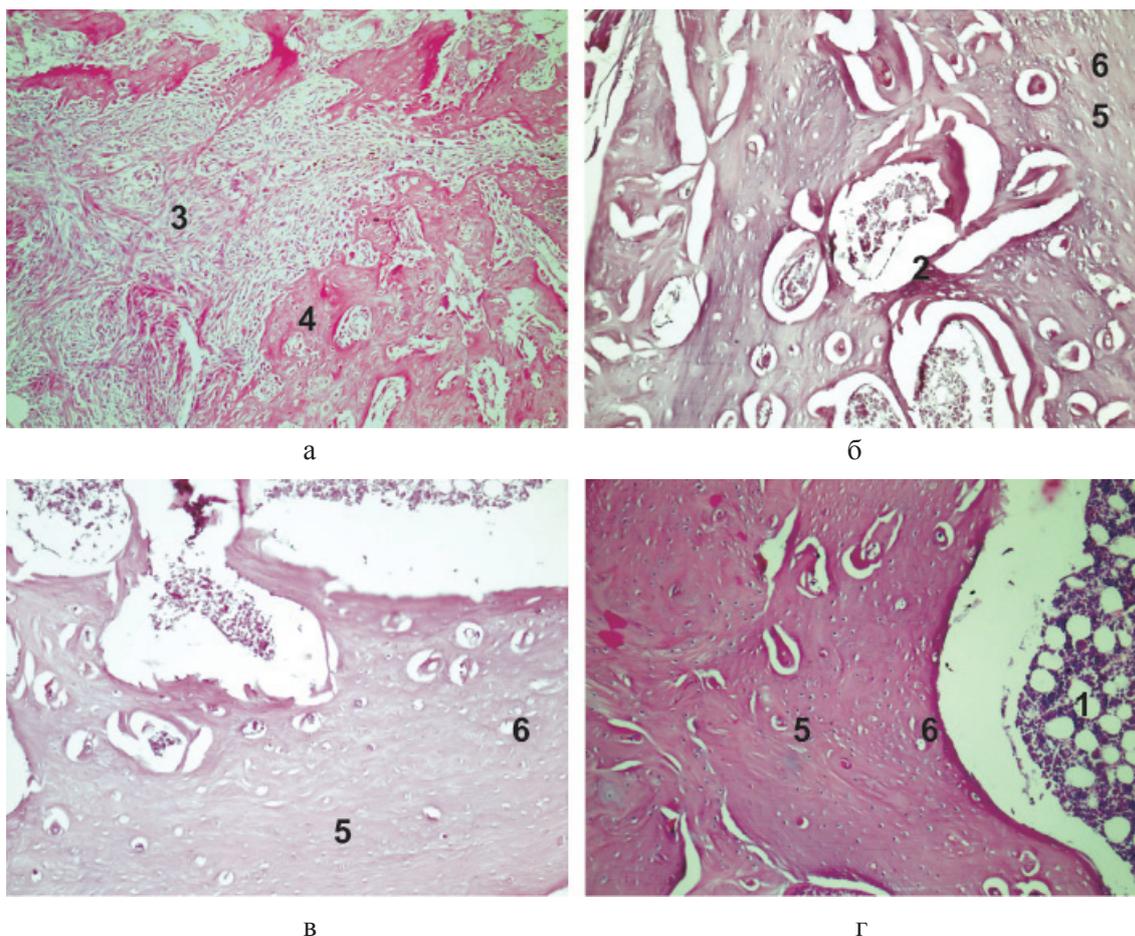


Рис. 2. Заживление костных дефектов крыс на 30-е сутки после нанесения травмы: а – в костные дефекты ничего не вносили (1-я контрольная группа); б – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля и гидроксиапатита (ГАП) (2-я группа); в – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля (90,0–99,9 масс. %) и сывороточного биорегулятора (3-я группа); г – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из гидроксиапатита (10–30 масс. %), хитозанового геля (70–90 масс. %) и биорегулятора, выделенного из сыворотки крови крупного рогатого скота (4-я группа).

Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение ок.  $\times 10$ . об.  $\times 20$ . Цифрами отмечены:  
 1 – костный мозг; 2 – пластинчатая костная ткань; 3 – ретикулофиброзная костная ткань;  
 4 – губчатая костная ткань; 5 – незрелая костная ткань;  
 6 – формирование плотной костной ткани; 7 – Гаверсовы каналы



**Рис. 3.** Заживление костных дефектов крыс на 90-е сутки после нанесения травмы: а – в костные дефекты ничего не вносили (1-я контрольная группа); б – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля и гидроксиапатита (ГАП) (2-я группа); в – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля (90,0–99,9 масс. %) и сывороточного биорегулятора (3-я группа); г – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из гидроксиапатита (10–30 масс. %), хитозанового геля (70–90 масс. %) и биорегулятора, выделенного из сыворотки крови крупного рогатого скота (4-я группа). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение ок.  $\times 10$ . об.  $\times 20$ . Цифрами отмечены: 1 – костный мозг; 2 – пластинчатая костная ткань; 3 – ретикулофиброзная костная ткань; 4 – губчатая костная ткань; 5 – плотная костная ткань; 6 – Гаверсовы каналы

**Список литературы**

1. Применение адгелона в лечении проникающих ранений роговицы в эксперименте / Р.А. Гундорова, И.П. Хорошилова-Маслова, Е.В. Ченцова и др. // Вестник офтальмологии. – 1997. – Т.113, № 2. – С. 12–15.  
 2. Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов, выделенных из тканей глаза и сыворотки крови быка, на модели экспериментальной травмы роговицы у кроликов in vivo / А.А. Константиновский, М.С. Краснов, В.П. Ямскова и др. // БЭБМ. – 2012. – № 2. – С. 177–182.  
 3. Исследование действия биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и ткани кости млекопитающих, на регенерацию конечностей амфибий in vivo и in vitro / М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова, Д. Агильон и др. // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине: тезисы V Международного конгресса (Санкт-Петербург, 29 июня – 3 июля 2009 г.). – СПб., 2009. – С. 110.  
 4. Противоожоговое действие композиции, содержащей хитозановый гель и биорегулятор сыворотки крови /

М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова, В.Е. Тихонов и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 2. – С. 79–83.  
 5. Изучение влияния регуляторного белка, выделенного из сыворотки крови быка, на состояние регенератов хвостов тритонов *P1. Waltil* при роллерном культивировании in vitro / Е.Ю. Рыбакова, М.С. Краснов, В.П. Ямскова и др. // Актуальные проблемы биологии развития: тезисы стендовых докладов молодых ученых на XV Школе. – Звенигород, 2008. – С. 86–88.  
 6. Исследование влияния композиции на основе хитозанового геля и биорегулятора сыворотки крови на заживление гнойных ран у мышей / Г.М. Стречкий, М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 4. – С. 211–214.  
 7. Низкомолекулярный гликопротеин из сыворотки крови крупного рогатого скота: структура и свойства / И.А. Ямсков, А.А. Виноградов, А.Н. Даниленко и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 36–42.

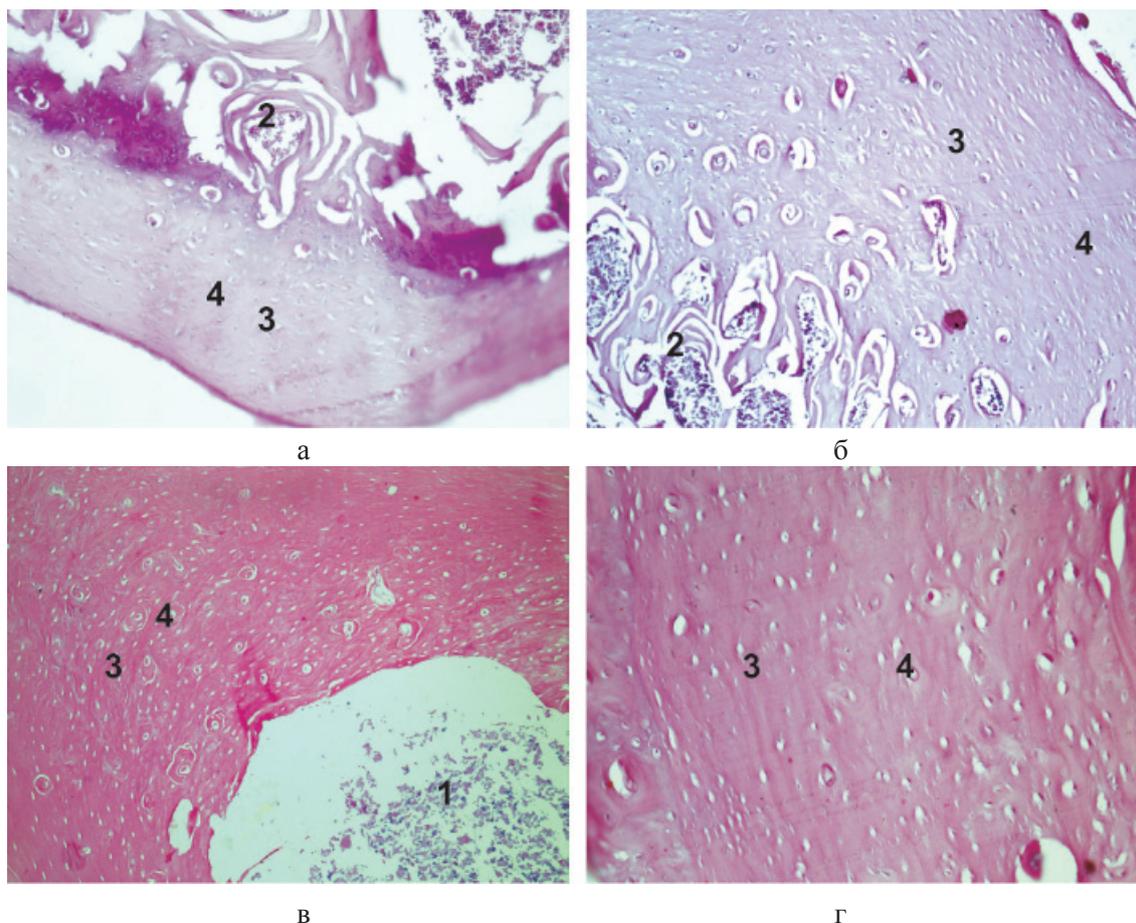


Рис. 4. Заживление костных дефектов крыс на 300-е сутки после нанесения травмы: а – в костные дефекты ничего не вносили (1-я контрольная группа); б – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля и гидроксиапатита (ГАП) (2-я группа); в – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из хитозанового геля (90,0–99,9 масс. %) и сывороточного биорегулятора (3-я группа); г – в костные дефекты вводили композицию, состоящую из гидроксиапатита (10–30 масс. %), хитозанового геля (70–90 масс. %) и биорегулятора, выделенного из сыворотки крови крупного рогатого скота (4-я группа). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение ок.  $\times 10$ . об.  $\times 20$ . Цифрами отмечены: 1 – костный мозг; 2 – пластинчатая костная ткань; 3 – плотная костная ткань; 4 – Гаверсовы каналы

## References

1. Gundorova R.A., Khoroshilova-Maslova I.P., Chentsova E.V., Ilatovskaya L.V., Yamskova V.P., Romanova I.Yu., *Annals of Ophthalmology*, 1997, Vol. 113. no. 2, pp. 12–15.
2. Konstantinovskiy A.A., Krasnov M.S., Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Yamskov I.A., *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, no. 2, pp. 177–182.
3. Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Aguilon D.R.G., Burlakova O.V., Yamskova V.P., Yamskov I.A., *Tezisy V Mezhdunarodnogo kongressa «Slabye b sverkhslabye polya I izlucheniya v biologii I meditsine»* [Abstracts V Int. Congress «Low and superlow fields and radiations in biology and medicine»]. Saint-Petersburg, 2009, 29 June – 3 July, p. 110.
4. Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Tikhonov V.E., Stretskiy G.M., Avdeenko O.E., Shaykhaliev A.I., Yamskova V.P., Yamskov I.A., *Cell Technologies in Biology and Medicine*, 2012, no. 2, pp. 79–83.
5. Rybakova E.Yu., Krasnov M.S., Yamskova V.P., Yamskov I.A., *Tezisy stendovykh dokladov molodykh uchennykh na XV shkole «Aktualnye problemy biologii razvitiya»* [Abstracts XVth

school of young researches «Actual problem of developmental biology»]. Zvenigorod, 2008. pp. 86–88.

6. Stretskiy G.M., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Avdeenko O.E., Tikhonov V.E., Shaykhaliev A.I., Yamskova V.P., Yamskov I.A., *Cell Technologies in Biology and Medicine*, 2011, no. 4, pp. 211–214.

7. Yamskov I.A., Vinogradov A.A., Danilenko A.N., Maslova L.A., Rybakova E.Yu., Yamskova V.P., *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, Vol. 37, no. 1, pp. 36–42.

## Рецензенты:

Домарацкая Е.И., д.б.н., ведущий научный сотрудник, и.о. зав. лабораторией гистогенеза ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва;  
Григорян Э.Н., д.б.н., зав. лабораторией проблем регенерации ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 14.08.2013.