

Научная статья
УДК 616-77:615.466
<https://doi.org/10.17816/2311-2905-2035>



Оценка биосовместимости новых костнопластических ксеноматериалов, содержащих золедроновую кислоту и ранелат стронция

М.В. Стогов, О.В. Дюрягина, Т.А. Силантьева, И.В. Шипицына, Е.А. Киреева, М.А. Степанов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган, Россия

Реферат

Актуальность. Улучшение функциональных характеристик имплантируемых изделий и материалов, используемых в травматологии и ортопедии, является актуальной проблемой.

Цель исследования — изучить биосовместимость модифицированных золедроновой кислотой и ранелатом стронция ксеноматериалов из костного матрикса крупного рогатого скота при их имплантации в полость костного дефекта.

Материал и методы. Исследование выполнено на 24 кроликах-самцах породы советская шиншилла. В полость дефектов бедренной кости имплантировали тестируемые блоки костного матрикса. Животным группы 1 ($n = 8$, группа контроля) имплантировали костный ксеногенный материал «Матрикс остеопластический “Bio-Ost”». Животным группы 2 ($n = 8$) имплантировали костный ксеногенный материал, импрегнированный золедроновой кислотой. Животным группы 3 ($n = 8$) имплантировали костный ксеногенный материал, импрегнированный ранелатом стронция. Для очистки материала и импрегнации в его объем золедроновой кислоты и стронция ранелата использовали технологию сверхкритической флюидной экстракции. Для оценки биосовместимости использовали рентгенологический, патоморфологический, гистологический и лабораторный (гематология и биохимия крови) методы исследования. Срок наблюдения составил 182 дня после имплантации.

Результаты. На 182-е сут. после имплантации площадь новообразованной костной ткани в области моделирования дефекта у животных группы 1 по медиане составила 79%, в группе 2 — 0%, в группе 3 — 67%. В группе 2 к данному сроку максимальную площадь занимала соединительная ткань — 77%. Относительная площадь фрагментов имплантированного материала у животных группы 1 составила 4% по медиане, в группе 2 — 23%, в группе 3 — 15%. У животных всех групп инфицирования и отторжения материала не отмечали. Признаков интоксикации, длительной системной воспалительной реакции не наблюдали. Лабораторные показатели в динамике существенно не изменялись. Во всех группах у одного из животных отмечали разовый рост уровня С-реактивного белка на фоне лейкоцитоза. В группе 1 у двух животных наблюдалась незначительная миграция имплантируемого материала под кожу, у одного развился артрит коленного сустава.

Заключение. Костнопластические материалы на основе ксеноматрикса из костей крупного рогатого скота, насыщенные золедроновой кислотой и стронция ранелатом, имеют приемлемые значения биосовместимости, включая показатели безопасности.

Ключевые слова: костнопластический ксеноматериал, золедроновая кислота, ранелат стронция, костный дефект, биосовместимость.

Для цитирования: Стогов М.В., Дюрягина О.В., Силантьева Т.А., Шипицына И.В., Киреева Е.А., Степанов М.А. Оценка биосовместимости новых костнопластических ксеноматериалов, содержащих золедроновую кислоту и ранелат стронция. *Травматология и ортопедия России*. 2023;29(2):57-73. <https://doi.org/10.17816/2311-2905-2035>.

✉ Стогов Максим Валерьевич; e-mail: stogo_off@list.ru

Рукопись получена: 20.12.2022. Рукопись одобрена: 09.03.2023. Статья опубликована онлайн: 10.04.2023.

© Стогов М.В., Дюрягина О.В., Силантьева Т.А., Шипицына И.В., Киреева Е.А., Степанов М.А., 2023



Evaluation of Biocompatibility of New Osteoplastic Xenomaterials Containing Zoledronic Acid and Strontium Ranelate

Maksim V. Stogov, Olga V. Dyuryagina, Tamara A. Silant'eva, Irina V. Shipitsyna, Elena A. Kireeva, Mikhail A. Stepanov

National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Orthopedics, Kurgan, Russia

Abstract

Background. The problem of improving the functional characteristics of implanted devices and materials used in traumatology and orthopedics is a topical issue.

Aim of the study — to study biocompatibility of bovine bone matrix xenomaterials modified by zoledronic acid and strontium ranelate when implanted into the bone defect cavity.

Methods. The study was performed on 24 male rabbits of the Soviet Chinchilla breed. Test blocks of bone matrix were implanted into the cavity of bone defects of the femur. Group 1 animals (n = 8, control group) were implanted with bone xenogenic material (Bio-Ost osteoplastic matrix). Group 2 animals (n = 8) were implanted with bone xenogenic material impregnated with zoledronic acid. Group 3 animals (n = 8) were implanted with bone xenogenic material impregnated with strontium ranelate. Supercritical fluid extraction technology was used to purify the material and impregnate it with zoledronic acid and strontium ranelate. Radiological, pathomorphological, histological and laboratory (hematology and blood biochemistry) diagnostic methods were used to assess biocompatibility. Follow-up period was 182 days after implantation.

Results. It was found out that on the 182nd day after implantation the median area of the newly-formed bone tissue in the defect modeling area in Group 1 was 79%, in Group 2 — 0%, in Group 3 — 67%. In Group 2 the maximum area by this period was filled with connective tissue — 77%. Median relative area of implanted material fragments in Group 1 was 4%, in Group 2 — 23%, in Group 3 — 15%. No infection or material rejection was observed in animals of all groups. There were no signs of intoxication or prolonged systemic inflammatory reaction. Laboratory parameters did not change significantly over time. One animal in each group experienced one-time increase in C-reactive protein level against the background of leukocytosis. Two animals in Group 1 had a slight migration of implanted material under the skin, one animal developed arthritis of the knee joint.

Conclusion. Osteoplastic materials based on bovine bone xenomatrix and filled with zoledronic acid and strontium ranelate have acceptable values of biocompatibility including their safety profile.

Keywords: osteoplastic material, xenograft, zoledronic acid, strontium ranelate, bone defect, biocompatibility.

Cite as: Stogov M.V., Dyuryagina O.V., Silant'eva T.A., Shipitsyna I.V., Kireeva E.A., Stepanov M.A. Evaluation of Biocompatibility of New Osteoplastic Xenomaterials Containing Zoledronic Acid and Strontium Ranelate. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2023;29(2):57-73. (In Russian). <https://doi.org/10.17816/2311-2905-2035>.

✉ Maksim V. Stogov; e-mail: stogo_off@list.ru

Submitted: 20.12.2022. Accepted: 09.03.2023. Published Online: 10.04.2023.

© Stogov M.V., Dyuryagina O.V., Silant'eva T.A., Shipitsyna I.V., Kireeva E.A., Stepanov M.A., 2023

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время задача улучшения биологических и функциональных характеристик имплантируемых изделий и материалов, используемых в травматологии и ортопедии, является достаточно актуальной проблемой [1, 2, 3, 4]. Основным направлением исследований в этом плане является использование материала/изделия не только как матрикса для образования костной ткани, но и как системы доставки дополнительных биологически активных веществ в зону имплантации [5, 6, 7]. При этом наиболее приемлемым носителем является сама костная ткань, причем как аллогенной, так и ксеногенной природы [8, 9, 10]. В этом плане основные направления модификации костного материала направлены на усиление остеоиндуктивного и остеогенного эффектов. Так, костный матрикс импрегнируют: клетками [11, 12], включая богатую тромбоцитами плазму [13]; факторами роста и цитокинами [14, 15, 16]; неколлагеновыми белками [17]; матричной РНК (мРНК) [18, 19]; лекарственными субстанциями, включая антибактериальные препараты [20, 21, 22, 23]. Для улучшения биологических свойств костного материала модифицируют технологии его физической обработки [24]. В последнее время к биорезорбируемым имплантатам стали предъявлять требование сохранять их механические свойства для обеспечения структурной поддержки кости до момента образования полноценного регенерата, что может быть достигнуто путем импрегнации в объем имплантатов веществ, модулирующих резорбтивную активность, в частности золедронатов и ранелата стронция [25, 26, 27]. Определенные перспективы, по нашему мнению, имеет импрегнация этих веществ в ксеногенную кость как наиболее доступную в плане сырья и возможностей ее модификации [28, 29, 30].

Цель исследования — изучить биосовместимость модифицированных золедроновой кислотой и ранелатом стронция ксеноматериалов из костного матрикса крупного рогатого скота при их имплантации в полость костного дефекта.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Исследование выполнено на 24 кроликах-самцах породы советская шиншилла (питомник ПАО «Синтез»), возраст животных от 8 до 16 мес., масса тела от 3,0 до 4,5 кг. Животным моделировали дефект костной ткани размером 4×4×6 мм. В полости дефектов имплантировали тестируемые блоки ксеноматериала (КМ) аналогичного размера.

Животным группы 1 ($n = 8$, группа контроля) имплантировали костный (немодифицированный) ксеногенный материал «Матрикс остеопластический “Bio-Ost”» (РЗН 2015/3086) (сырье — губ-

чатые кости крупного рогатого скота). Животным группы 2 ($n = 8$) имплантировали костный КМ, импрегнированный золедроновой кислотой. Животным группы 3 ($n = 8$) имплантировали костный КМ, импрегнированный ранелатом стронция. Для получения модифицированных КМ использовали костные блоки размером 20×15×5 мм (Bio-Ost), полилактид (Poly[D,L-lactide] IV дл/г, acid-terminated, молекулярная масса 30 кДа), моногидрат золедроновой кислоты (Zoledronic acid monohydrate, Sigma-Aldrich, США) и стронция ранелат (Strontium ranelate, Sigma-Aldrich, США).

Схема импрегнации

Измельченный полилактид массой 1 г (для золедроната) и 0,5 г (для ранелата) растворяли в 20 мл этилового спирта, выдерживали 3 ч. при температуре 60°C. Далее 50 мг золедроновой кислоты растворяли в 10 мл 0,1н раствора NaOH. Ранелат стронция растворяли в 10 мл дистиллированной воды. Растворы субстанций (золедроновая кислота и стронция ранелат) смешивали с раствором полилактида. Далее в полученный раствор погружали блоки (10 штук). Затем раствор с погруженными в него блоками помещали в реактор установки для сверхкритической флюидной экстракции Waters, подавали углекислый газ и доводили параметры среды до $P = 250$ атм, $t = 32^\circ\text{C}$ [31]. После установки в реакторе статического режима блоки выдерживали 30 мин., после чего выключали подачу углекислого газа, давление сбрасывали в течение 30 мин. Вышедшие блоки лиофилизировали и проводили газовую стерилизацию в среде оксида этанола с последующим вакуумированием и аэрацией в течение 2 сут. Материалы получены на базе ООО «МедИнжБио» (Пенза, Россия).

Моделирование дефекта костной ткани дистального метафиза бедренной кости и проксимального метафиза большеберцовой кости

Оперативное вмешательство выполняли под общим обезболиванием (премедикация: р-р димедрола 1% (0,02 мг/кг), р-р атропина сульфата 0,1% (0,02 мг/кг), медитина 1% (0,35 мг/кг), для наркоза: тиопентал натрия 5% (10 мг/кг). Первоначально выполняли оперативный доступ к латеральной поверхности дистального метафиза бедренной кости. Далее стоматологическим бором выполняли выборку костной ткани метафиза, формируя несквозной дефект шириной и длиной по 4 мм и глубиной 6 мм. После этого в полость дефекта помещали имплантат, который устанавливали плотно при помощи легкого вколачивания. Далее послойно, наглухо ушивали операционную рану шовным материалом Vicril 4/0 (Ethicon, США). Оперативный доступ к проксимальному мета-

физику большеберцовой кости осуществляли на медиальной поверхности голени. Формирование дефекта, установку имплантата и ушивание операционной раны выполняли описанным выше способом. Для профилактики развития септических послеоперационных осложнений в день операции выполняли однократное введение антибактериальных препаратов из группы цефалоспоринов (цефазолин в дозе 200 мг) и нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (кетопрофен 0,05% 0,5 мл). Обработку операционного шва не проводили.

У каждого животного выполняли 4 имплантации: дистальный метафиз бедренной кости и проксимальный метафиз большеберцовой кости на обеих конечностях.

После окончания операции для профилактики осложнений послеоперационной гипотермии наркотического сна осуществляли обогрев кроликов под инфракрасной лампой в течение 1–3 ч. при температуре 25–28°C на поверхности тела до полного пробуждения животного. Срок плановой эвтаназии — 84-е и 182-е сут. после имплантации. При выборе сроков наблюдения за животными после имплантации руководствовались ГОСТ ISO 10993-6-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации.

Содержание животных

Животных содержали в виварии исследовательского центра по одному в индивидуальных клетках площадью 0,5 м² с постоянным доступом к корму и воде. В качестве подстилки использовали сено. Кормление осуществлялось по стандартному сбалансированному по питательным веществам рациону, включающему комбикорм для кроликов (ПЗК 90, Богдановичский комбикормовый завод), зерно овса, свежую морковь и сено. Чистая питьевая вода — без ограничений.

Перед поступлением в эксперимент животные проходили карантин в течение 15 дней. В период нахождения животных в карантинном блоке ежедневно контролировали общее состояние кроликов путем осмотра в клетке. Животные с неудовлетворительным общим состоянием были исключены из формирования групп. Животные распределялись по группам случайным отбором.

Каждое животное в группе идентифицировали индивидуальным трехзначным номером. Метод маркировки — татуировка индивидуального трехзначного номера на внутренней поверхности ушной раковины и бирка с аналогичным номером на клетке.

Для оценки биосовместимости, включая безопасность тестируемых материалов, применяли методы прижизненного наблюдения, рентгенологи-

ческий, патологоанатомический, гистологический и лабораторный методы исследования.

Прижизненные наблюдения

Ежедневно отмечали отклонения в общем состоянии кроликов, их поведение в клетке, наличие хромоты. Оценивали прием корма и воды, цвет шерсти и видимые слизистые оболочки. При осмотре зоны имплантации обращали внимание на состояние операционных ран, появление отеков, истечение экссудата, болезненность.

Рентгенологические исследования

Рентгенологические исследования выполняли в день операции, на 14-е, 28-е, 56-е, 84-е, 112-е, 140-е и 182-е сут. наблюдений. Выполняли рентгенографию зон имплантации в передней, аксиальной и латеро-медиальной проекциях на рентгенологическом аппарате TOSHIBA (Rotanode) Model E7239. N: 10G749 (Япония). Сила тока — 2,5–3,2 мА, напряжение — 43–44 кВ, фокусное расстояние 90 см, выдержка автоматическая.

Патологоанатомические исследования

Плановую эвтаназию животных проводили под премедикацией (димедрол 1% — 0,02 мг/кг), рометар 2% (5 мг/кг) путем передозировки барбитуратов. При аутопсии выполняли осмотр внутренних органов, мест имплантации, определяли относительную массу паренхиматозных органов. Проводили макроскопическое исследование зон имплантации.

Гистологические исследования

Метаэпифизы трубчатых костей, включающие область оперативного вмешательства, фиксировали в течение 3 сут. в 10% формалине для гистологии (Labiko, Россия) при pH 6,8–7,4. После кислотной декальцинации в растворе, содержащем 10% концентрированной соляной и 8% концентрированной муравьиной кислот, костные блоки обезжировали в ацетоне и обезвоживали в этиловом спирте восходящей концентрации от 70% до 100%. Декальцинированные образцы заливали в целлоидин-парафин и секционировали на санном микротоме HM-450 (Thermo Fisher, Великобритания). Полученные срезы толщиной до 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и трихромом по Массону. Гистологические препараты сканировали в микроскопе Pannoramic Midi II (3DHISTECH Ltd., Венгрия) с объективом план-апохромат ×40 Corr/NA 0,95. Морфологическое исследование цифровых гистологических препаратов, гистоморфометрию клеточных и тканевых компонентов производили с применением программного продукта Pannoramic Viewer (3DHISTECH Ltd., Венгрия).

Гистоморфометрическое исследование выполняли на цифровых препаратах, полученных

с использованием указанного выше аппаратно-программного комплекса для цифровых технологий. На цифровых изображениях гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, гистоморфометрически оценивали клеточный состав и васкуляризацию костного органа в области имплантации. Подсчет количества клеток и сосудов производили в поле зрения 0,01 мм² с цифровым объективом $\times 100$. На цифровых изображениях гистологических препаратов, окрашенных трихромом по Масону, с использованием цифрового объектива $\times 20$ определяли процентную долю площадей новообразованного губчатого костного вещества, соединительной ткани и остеопластического материала. Пластинчатую грубоволокнистую костную ткань и ксеногенный костный матрикс идентифицировали на основании особенностей фиброархитектоники, морфологии костных клеток (остеобластов и остеоцитов), признаков остеонекроза. В губчатом костном веществе ложа имплантата определяли процентную долю площади костной ткани трабекул. Анализировали не менее 30 полей зрения для каждого материала на каждом этапе эксперимента. На основе полученных количественных данных определяли степень раздражающего воздействия биodeградируемых материалов по ГОСТ ISO 10993-6-2011.

По четырехбалльной шкале отсутствие какого-либо типа клеток в поле зрения оценивали в 0 баллов, наличие 1–5 клеток (для многоядерных фагоцитов — 1–2) — в 1 балл, 5–10 (для многоядерных фагоцитов — 3–5) — в 2 балла, обильный инфильтрат — в 3 балла, плотное расположение — в 4 балла. Образец считали: нераздражающим (от $\leq 0,0$ до 2,9 баллов), легким раздражителем (от 3,0 до 8,9 баллов), умеренным раздражителем (от 9,0 до 15,0 баллов), тяжелым раздражителем (> 15).

Тканевую реакцию на имплантацию материалов также оценивали по четырехбалльной шкале. Степень неоваскуляризации определяли по количеству капилляров в поле зрения: 1–3, 4–7, широкая и обильная полоса с фибробластными структурами. Интенсивность фиброза оценивали по ширине соединительнотканной прослойки. Подобным образом определяли выраженность жировой инфильтрации, дифференцируя жировые прослойки в соединительной ткани с красным и желтым костным мозгом. Сумму всех показателей в баллах также использовали для расчета раздражающего действия имплантационных материалов.

Итоговым показателем являлся суммарный балл промежуточных результатов оценки клеточной и тканевой реакций на внутрикостную имплантацию образцов. Степень раздражения определяли по суммарной балльной оценке: раз-

дражающее действие (РД) = клеточная реакция (КР) + тканевая реакция (ТР) и по разнице показателей контрольной и опытных групп для соответствующего срока эксперимента (РД Гр1 — РД ГрN 1, 2, 3). При этом отрицательное значение соответствовало нулевой балльной оценке. Образец считали: не раздражающим (от $\leq 0,0$ до 2,9 баллов); легким раздражителем (от 3,0 до 8,9 баллов); умеренным раздражителем (от 9,0 до 15,0 баллов); тяжелым раздражителем (> 15).

Лабораторные исследования

Лабораторные исследования (гематология и биохимия крови) проводили до операции, на 14-е, 30-е, 84-е, 182-е сут. после имплантации. Гематологическое исследование крови включало определение лейкоцитов на автоматическом гематологическом анализаторе ProCyte Dx (IDEXX Lab., США). Биохимическое исследование сыворотки крови включало определение концентраций общего белка, мочевины, С-реактивного белка (СРБ), креатинина, глюкозы, общего кальция, неорганического фосфата. Определяли активность щелочной (ЩФ) и тартратрезистентной (костной) кислот (ТрКФ) фосфатазы, аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ). Активность ферментов, а также концентрацию субстратов в сыворотке крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi/VM 902 (Япония), используя наборы реагентов фирмы Vital Diagnostic (Санкт-Петербург, Россия) и Вектор-Бест (Новосибирск, Россия).

Статистический анализ

Результаты количественных признаков представлены в таблицах в виде медианы, 1–3 квартилей (Me; Q1–Q3). Нормальность выборок определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Процедуру статистической оценки значимости отличий показателей внутри исследуемых групп (до/после имплантации) выполняли с применением W-критерия Вилкоксона. Для оценки статистической значимости показателей между группами использовали T-критерий Манна–Уитни. Минимальный уровень значимости (p) принимали равным 0,05. Для расчетов использовали программу анализа данных AtteStat 12.0.5.

Регулирующие стандарты

Исследование выполнено в соответствии с ГОСТ ISO 10993-1-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования; ГОСТ ISO 10993-6-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации; ГОСТ 33215-2014. Руководство

по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур; ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прижизненное наблюдение

Течение послеоперационного периода у животных всех экспериментальных групп проходило однотипно. После операции общее состояние животных было удовлетворительным. С 1-х по 3-и сут. у животных фиксировали субфебрильную температуру тела в пределах 39,5–39,7°C, аппетит был немного снижен, воду принимали. Слизистые оболочки конъюнктивы глаз и ротовой полости были розовые. В последующие дни температура тела возвращалась в пределы средних значений, аппетит восстанавливался. В течение первых 5–7 сут. в зоне имплантаций отмечали гиперемию кожи и незначительный отек подкожной клетчатки, болезненность при пальпации была умеренная. В дальнейшем признаков воспаления мягких тканей не наблюдали. Заживление операционных ран проходило по первичному натяжению. Животные пользовались конечностями на протяжении всего эксперимента, двигательная и опорная функции были сохранены полностью.

Рентгенологические исследования

Рентгенологически в день операции зоны имплантации у животных всех групп визуализировались хорошо (рис. 1).

На 84-е сут. эксперимента в группе 1 в 50% случаев границы между имплантируемым ма-

териалом и материнской костью были размыты. Ксеноматериал просматривался только в проксимальном метафизе большеберцовой кости. В группе 2 к этому сроку в 90% случаев имплантат хорошо визуализировался, контур дефекта материнской кости хорошо определялся. В группе 3 к этому сроку в 33% случаев материал полностью резорбировался, граница дефекта костной ткани материнской кости отсутствовала.

На 182-е сут. эксперимента в группе 1 были видны следы имплантируемого материала. В группе 2 к этому сроку эксперимента только появлялись первые рентгенологические признаки перестройки КМ. Отмечали уменьшение объема имплантируемого материала, размытие краевой линии костного дефекта, однако высокая плотность имплантата была сохранена. В группе 3 к этому сроку границы дефекта костей не просматривались (рис. 2).

Таким образом, можно отметить, что рентгенологические признаки замещения материала в группах 1 и 3 были сопоставимы и проявлялись к 182-м сут. после имплантации. В группе 2 полного замещения материала к последнему сроку наблюдения не отмечено.

Результаты патологоанатомических исследований

Все животные были подвержены плановой эвтаназии (84-е и 182-е сут. после имплантации). Гибели животных вне плана не зафиксировано. На сроках эвтаназии у животных всех групп при наружном осмотре повреждений кожного покрова и внутренних органов не отмечалось. Относительная масса органов у животных групп 2 и 3 статистически значимо относительно животных группы 1 не отличалась.

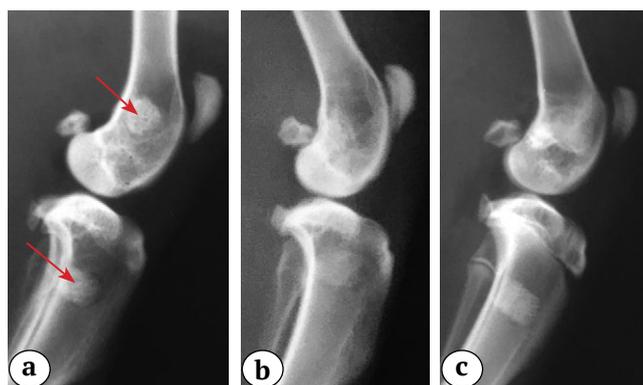


Рис. 1. Рентгенограммы области имплантации в день операции:

a — группа 1 (стрелками обозначена область имплантации); b — группа 2; c — группа 3

Fig. 1. X-rays of the implantation area on the day of the surgery:

a — Group 1 (arrows indicate the implantation area); b — Group 2; c — Group 3



Рис. 2. Рентгенограммы области имплантации, 182-е сут. после имплантации:

a — группа 1; b — группа 2; c — группа 3

Fig. 2. X-rays of the implantation area on the 182nd day after implantation:

a — Group 1; b — Group 2; c — Group 3

В группе 1 на 182-е сут. опыта область имплантации визуализировалась плохо. Граница с материнской костью была сглажена. Поверхность имплантата была покрыта прозрачной, блестящей плотной тканью, сквозь которую просматривалась неравномерная (губчатая) структура имплантата. Свищевых ходов в зоне контакта имплантат-кость не было отмечено.

В группе 2 на 182-е сут. у большинства животных (80%) граница с материнской костью была хорошо видна, поверхность имплантата была мелкобугристая. Имплантат был плотно соединен с материнской костью по всему периметру. На боковой поверхности метафиза бедренной кости наблюдались очаговые объемные хрящевые напластования.

В группе 3 на 182-е сут. у всех животных имплантат был плотно соединен с материнской костью, граница его определялась, поверхность имплантата была шероховатая, частично покрытая хрящевой тканью. Боковая поверхность метафиза бедренной кости была покрыта тонкими хрящевыми напластованиями разлитого характера.

Во всех группах животных область имплантации в метафизе большеберцовой кости была покрыта плотным слоем поверхностной фасции белого цвета. Свищевых ходов, нестабильности в зоне контакта с материнской костью не отмечалось.

Гистологические исследования

Через 84 сут. после имплантации у животных группы 1 активное костеобразование в области моделирования дефекта было отмечено как в пространствах между трабекулами КМ, так и на границе с губчатым костным веществом материнского ложа (рис. 3).

Ксеногенный имплантационный материал проявлял свойство остеокондуктивности, являясь основой для прикрепления остеогенных клеток и формирования ими костного матрикса. В некоторых полях зрения на поверхности костных структур обнаруживались 1–2 прикрепленных либо открепленных остеокласта. Резорбции подвергались как новообразованный костный матрикс, так и трабекулы КМ. Промежутки между фрагментами ксеноматрикса и костными трабекулами заполняла хорошо васкуляризованная рыхлая волокнистая соединительная ткань. В ее клеточном составе присутствовали фибробластоподобные клетки, моноциты, макрофаги. Элементы клеточного воспаления были представлены гранулоцитами эозинофильного ряда. Лимфоциты встречались в единичных полях зрения, плазматические клетки, нейтрофильные гранулоциты, некротизированные клетки практически отсутствовали. Губчатое костное вещество ложа имплантата было

представлено редкой сетью пластинчатых костных трабекул с жировым костным мозгом в межтрабекулярных промежутках. Поверхность трабекул покрывали покоящиеся клетки, резорбция остеокластами не наблюдалась.

В группе 2 фиброзная прослойка отделяла имплантат от границы костного дефекта. Трабекулы КМ определялись в окружении обширных полей слабо васкуляризованной рыхлой неоформленной соединительной ткани. В ее клеточном составе обнаруживались фибробластоподобные клетки, моноциты, большое количество эозинофильных гранулоцитов. Лимфоциты, плазматические клетки, нейтрофильные гранулоциты, некротизированные клеточные элементы были единичными. Остеогенез наблюдался лишь аппозиционно на поверхности трабекул материнского костного ложа. Резорбция остеопластического материала, как и трабекул губчатого костного вещества, зафиксирована не была.

В группе 3 активное костеобразование отмечалось по периферии костного дефекта и в губчатом костном веществе ложа трансплантата. В межтрабекулярных пространствах новообразованного костного вещества определялся красный костный мозг с включением адипоцитов. Трабекулы КМ окружали прослойки васкуляризованной рыхлой неоформленной соединительной ткани с высокой клеточной плотностью. В составе соединительной ткани преобладали фибробластоподобные клетки и элементы моноцитарно-макрофагального ряда. Лимфоциты, плазматические клетки, полиморфноядерные лейкоциты, включая эозинофилы, некротизированные клеточные элементы присутствовали в незначительном количестве. В центральной части имплантата обнаруживались отдельные новообразованные грубоволокнистые трабекулы, частично контактирующие с трабекулярной сетью имплантата. Имплантационный материал резорбировался остеокластами, в отдельных полях зрения наблюдали до 3–5 прикрепленных, но чаще открепленных многоядерных фагоцитов.

Через 182 сут. после имплантации в группе 1 отмечали органотипическое восстановление губчатого костного вещества в области моделирования дефекта с сохранением микроочагов фиброза и неоостеогенеза. В очагах фиброза отмечалось повышенное содержание эозинофилов. Имплантационный материал подвергался биодеградации, замещаясь губчатым веществом с редкой сетью пластинчатых костных трабекул и красным либо желтым костным мозгом межтрабекулярных пространств. Новообразованные костные трабекулы включали микрофрагменты КМ. Область имплантации окружал желтый костный мозг с редкими гипопластичными костными трабекулами без признаков ремоделирования.

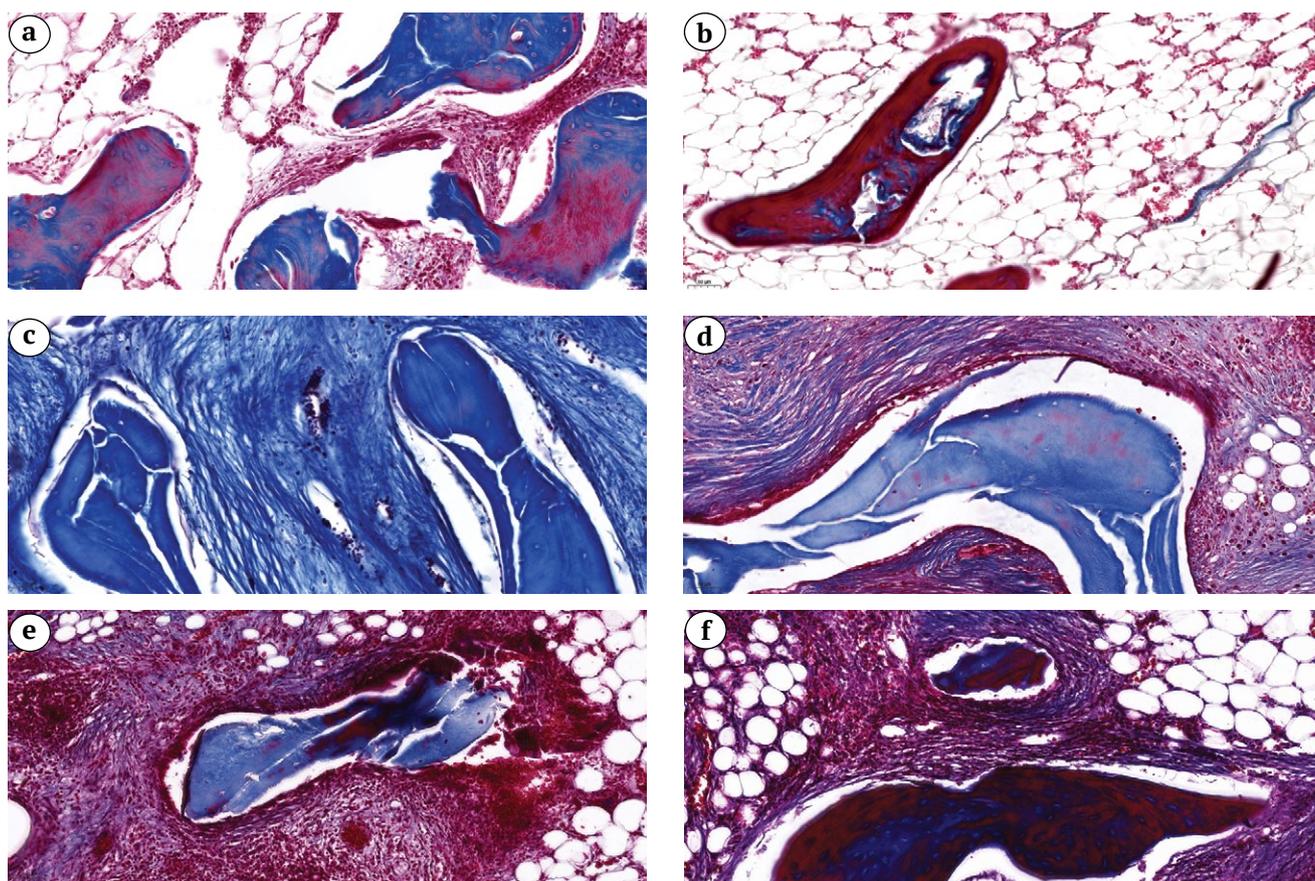


Рис. 3. Гистоструктура области имплантации ксеноматериалов на границе с костным ложем. Срок после имплантации 84-е сут. (столбец слева) и 182-е сут. (столбец справа). Группа 1 — ксеноматериал частично резорбирован, окружен узкой полосой фиброзной ткани (а) и губчатым костным веществом (б). Группа 2 — ксеноматериал инкапсулирован фиброзной тканью, признаки костеобразования и резорбции не выражены (с, д). Группа 3 — трабекулы ксеноматериала окружены широкими тяжами фиброзной ткани, на 84-е сут. преобладает слабая резорбтивная активность (е), на 182-е сут. — остеокондукция, неоостеогенез (ф). Парафиновые срезы, окраска трихромом по методу Массона. Ув. $\times 20$. Масштабный отрезок 50 мкм

Fig. 3. Histostructure of the area of xenomaterial implantation on the border with the bone bed. Day 84 (left column) and day 182 (right column) after implantation. Group 1 — xenomaterial is partially resorbed and surrounded by a narrow band of fibrous tissue (a) and cancellous bone substance (b). Group 2 — xenomaterial is encapsulated by fibrous tissue, signs of bone formation and resorption are not pronounced (c, d). Group 3 — xenomaterial trabeculae are surrounded by wide fibrous tissue bands, weak resorptive activity prevails on the 84th day (e), osteoconduction, neoosteogenesis — on the 182nd day (f). Paraffin sections. Masson's trichrome stain. Mag. $\times 20$. Scale bar = 50 μm

В группе 2 область имплантации была заполнена слабо васкуляризированной волокнистой соединительной тканью, полностью окружающей структурные элементы КМ, без признаков остеогенной активности. Резорбция КМ многоядерными фагоцитами не наблюдалась. Сохранялась интенсивная эозинофильная инфильтрация области дефекта. На границе с областью имплантации отмечали уплотнение трабекулярной сети костного ложа. В ее межтрабекулярных промежутках располагался желтый костный мозг с многочисленными очагами кроветворения. Остеокластно-остеобластное ремоделирование пластинчатых костных трабекул не было отмечено.

В группе 3 область моделирования костного дефекта заполняли губчатое костное вещество и тяжи хорошо васкуляризированной соединительной ткани, инкапсулирующие фрагменты КМ. В клеточном составе соединительной ткани преобладали фибробластоподобные клетки, моноциты, макрофаги. Клетки лейкоцитарного и лимфоидного ряда, некротизированные клетки практически не определялись. Наблюдали плотные контакты фрагментов КМ и отдельных костных трабекул без интеграции имплантационного материала в состав костного матрикса. На поверхности фрагментов КМ сохранялись многочисленные лакуны резорбции, однако прикрепленные остеокласты

были редкой находкой. Массивные новообразованные костные трабекулы на границе с губчатым веществом костного ложа были выстланы активными остеобластами. На их поверхности обнаруживались немногочисленные резорбционные лакуны и прикрепленные остеокласты.

Описанные явления были статистически подтверждены результатами гистоморфометрического исследования (табл. 1). Было выявлено достоверное преобладание остеобластов/остеоцитов и капилляров в зоне имплантации у животных группы 1 на 84-е сут. и группы 3 — на 182-е сут. эксперимента. Остеокласты преобладали в группе 3 на 84-е сут. эксперимента. Фибробласты/фиброциты и моноциты/макрофаги в значительной степени присутствовали в зоне имплантации у животных группы 3. Элементы клеточного воспаления были представлены исключительно эозинофильными гранулоцитами и стабильно присутствовали в тканях области имплантации животных группы 2. В группе 3 тканевая эозинофилия была полностью подавлена.

Анализ количественного соотношения площади тканевых компонентов и структурных элемен-

тов КМ в области имплантации также выявил статистически значимые различия между группами (табл. 2). Площадь новообразованной костной ткани в области моделирования дефекта у животных групп 1 и 3 существенно возрастала к 182-м сут. после имплантации (до 70%), тогда как в группе 2 к данному сроку максимальную площадь занимала соединительная ткань (значимо превышая аналогичные показатели группы 1 и 3). Относительная площадь фрагментов КМ на гистологических препаратах на 182-е сут. имплантации была максимальна у животных группы 2, минимальна — у животных группы 1.

Оценка плотности губчатого костного вещества ложа имплантата путем определения общей доли костной ткани трабекул показала, что импрегнация материалов как золедроновой кислоты, так и ранелата стронция многократно увеличивала значение данного показателя. Проявление данного эффекта было статистически значимым как на 84-е, так и на 182-е сут. эксперимента и более выраженным — в группе с применением золедроновой кислоты (табл. 3).

Таблица 1

Численность клеток и сосудов в области имплантации (площадь поля зрения 0,01 мм²), медиана (Q1–Q3)

Параметр оценки	84-е сут. имплантации			182-е сут. имплантации		
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Остеобласты/остеоциты	6 (4–8)	0 (0–0)	0 (0–1)	1 (0–1)*	0 (0–0)	2 (1–3)*
Фибробласты/фиброциты	23 (19–31)	23 (19–26)	41 (34–52)	15 (14–16)*	20 (18–22)*	29 (27–31)*
Остеокласты	0 (0–1)	0 (0–0)	1 (0–1)	0 (0–0)*	0 (0–0)	0 (0–0)*
Моноциты/макрофаги	12 (9–14)	8 (7–9)	21 (17–24)	5 (4–6)*	5 (4–6)*	13 (12–14)*
Эозинофилы	7 (6–10)	11 (9–12)	0 (0–0)	7 (5–9)	11 (9–13)	0 (0–0)
Капилляры	2 (2,0–2,5)	1 (0–1)	1 (1–2)	2 (1–2)*	2 (1–2)	5 (4–6)*

* — статистически значимые различия по сравнению со сроком 84-е сут. при $p < 0,05$.

Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия с группой 1 при $p < 0,05$.

Таблица 2

Доля площади тканевых компонентов и ксеноматериала в области моделирования дефекта, медиана (Q1–Q3), %

Компонент	84-е сут. имплантации			182-е сут. имплантации		
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Губчатое костное вещество	14 (14–14)	0 (0–0)	27 (25–31)	79 (56–73)*	0 (0–0)	67 (57–65)*
Соединительная ткань	73 (72–74)	73 (71–75)	53 (48–63)	17 (15–19)*	77 (75–78)*	23 (19–28)*
Ксеноматериал	13 (12–14)	27 (24–29)	15 (12–20)	4 (2–5)*	23 (22–25)*	15 (12–17)

* — статистически значимые различия по сравнению со сроком 84-е сут. при $p < 0,05$.

Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия с группой 1 при $p < 0,05$.

Таблица 3

Доля площади костной ткани трабекул в губчатом костном веществе ложа имплантата, медиана (Q1–Q3), %

84-е сут. имплантации			182-е сут. имплантации		
Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3
5 (3–14)	36 (38–44)	17 (8–25)	3 (0–14)	26 (14–33)*	15 (7–28)

* – статистически значимые различия по сравнению со сроком 84-е сут. при $p < 0,05$.
 Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия с группой 1 при $p < 0,05$.

Показатель клеточной реакции в группе 2 на 182-е сут. после имплантации был значимо выше относительно значений групп 1 и 3 (табл. 4). Показатель тканевой реакции был наиболее высоким в группе 2 на всем протяжении эксперимента. Анализ суммарной балльной оценки раздражающего действия изученных материалов показал, что на 84-е сут. после имплантации КМ проявлял свойства умеренного раздражителя,

однако его действие ослабевало к 182-м сут. эксперимента для всех групп. При этом импрегнация золедроновой кислотой значимо усиливала раздражающее действие КМ на всем протяжении эксперимента. Комбинация с ранелатом стронция, напротив, значимо снижала раздражающее действие КМ, переводя его в категорию легких раздражителей к 182-м сут. эксперимента.

Таблица 4

Оценка раздражающего воздействия имплантационного материала, медиана (Q1–Q3), баллы по ГОСТ ISO 10993-6-2011

Параметр	84-е сут. имплантации			182-е сут. имплантации		
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3
<i>Реакция клеток</i>						
Эозинофилы	2 (2–2)	3 (2–3)	0 (0–0)	2 (2–2)	3 (2–3)	0 (0–0)
Лимфоциты	1 (0–1)	1 (0–1)	1 (0–1)	1 (0–1)	1 (0–1)	1 (0–1)
Прочие лейкоциты (полиморфноядерные гранулоциты, плазматические клетки)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–1)
Моноциты/макрофаги	3 (2–3)	2 (2–2)	3 (2–3)	1 (1–2)	2 (2–2)	3 (2–3)
Многоядерные фагоциты	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–1)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (1–0)
Некроз	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)
<i>Реакция тканей</i>						
Неоваскуляризация	1 (1–1)	1 (0–1)	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)	1 (1–1)
Фиброз	2 (2–2)	4 (4–4)	1 (1–1)	1 (0–1)	3 (3–3)	0 (1–0)
Жировой инфильтрат	0 (1–0)	0 (0–0)	0 (1–0)	0 (1–0)	0 (0–0)	0 (1–0)
<i>Показатели раздражающего действия</i>						
Клеточная реакция ($\Sigma \times 2$)	12 (12–14)	12 (10–12)	8 (6–8)	8 (8–8)*	12 (10–12)	8 (6–8)*
Тканевая реакция	3 (2–3)	5 (5–5)	2 (2–3)	2 (1–2)*	4 (4–4)	1 (1–1)*
Раздражающее действие (клеточная реакция + тканевая реакция)	15 (15–17)	17 (15–17)	10 (9–10)	10 (9–10)*	16 (14–16)	9 (7–9)*
РД Гр1-РД ГрN 1, 2, 3	0	2	-5	0	6	-1

* – статистически значимые различия по сравнению со сроком 84-е сут. при $p < 0,05$.
 Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия с группой 1 при $p < 0,05$.

Лабораторные исследования

Статистически значимое повышение уровня лейкоцитов относительно дооперационных значений отмечалось на 14-е сут. эксперимента у животных группы 3 (табл. 5).

Снижение уровня эритроцитов относительно дооперационных значений на 14-е сут. эксперимента отмечалось у животных всех групп. У животных группы 2 отмечен значимый рост уровня СРБ на 30-е сут. эксперимента. Обнаружено снижение активности ЩФ на отдельных сроках эксперимента у животных группы 2 относительно дооперационных значений и показателей группы 1. Активность ТрКФ на отдельных сроках эксперимента у кроликов группы 2 была ниже, чем в группе контроля. Статистически значимых изменений концентраций общего кальция, неорганического фосфата, общего белка, креатинина и мочевины, а также активности трансаминаз в сыворотке крови животных всех групп на сроках эксперимента не отмечалось.

Таким образом, в лабораторных показателях крови кроликов в ходе исследования не было выявлено значимых сдвигов, характер которых бы указывал на длительное неблагоприятное воздействие препаратов, используемых для насыщения костных блоков.

Сводные данные о нежелательных явлениях, отмеченных в ходе эксперимента, представлены в таблице 6. У двух животных группы 1 наблюдалась незначительная миграция под кожу в области имплантации в метафиз бедра по одному образцу имплантируемого материала. Миграция произошла из-за того, что имплантат был изготовлен меньшего размера, чем сформированный дефект, что не позволило ему плотно зафиксироваться в кости. У одного кролика развился артрит коленного сустава. Во всех группах у одного из животных отмечали рост СРБ на фоне лейкоцитоза на 14–30-е сут. после имплантации.

Таблица 5

Лабораторные показатели кроликов на разных сроках после имплантации, медиана (Q1–Q3)

Показатель	Группа	До операции	14 сут.	30 сут.	84 сут.	182 сут.
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	1	7,7 (7,1–8,0)	7,8 (7,4–7,9)	7,4 (6,8–7,8)	7,6 (6,9–9,3)	7,1 (6,6–7,4)
	2	7,6 (7,2–9,3)	8,2 (7,9–8,3)	7,0 (6,6–7,4)	8,2 (8,1–9,5)	7,0 (5,8–8,1)
	3	7,6 (6,6–8,4)	10,6* (9,9–12,9)	8,9 (8,2–11,6)	8,8 (8,0–10,4)	7,0 (6,9–8,0)
Эритроциты, 10 ¹² /л	1	6,4 (6,1–6,9)	5,7* (5,3–6,0)	6,6 (6,1–6,7)	6,6 (6,3–7,0)	6,8 (6,4–6,9)
	2	6,4 (5,6–6,8)	5,6* (4,7–6,0)	6,0 (5,9–6,3)	6,5 (5,4–6,9)	6,4 (6,1–7,1)
	3	6,1 (4,8–6,9)	5,4* (5,9–6,3)	6,9 (6,1–7,0)	6,3 (6,0–6,9)	6,7 (6,3–7,0)
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	1	379 (303–465)	509 (476–542)	446 (425–497)	438 (392–461)	387(370–448)
	2	397 (326–466)	464 (388–490)	464 (388–490)	308 (290–410)	369 (346–471)
	3	343 (330–393)	410 (389–435)	464 (408–490)	390 (360–470)	359 (316–400)
СРБ, мг/л	1	0,0 (0,0–0,9)	0,0 (0,0–2,4)	0,4 (0,0–2,5)	0,0 (0,0–1,9)	0,0 (0,0–1,0)
	2	0,0 (0,0–0,2)	0,9 (0,0–5,8)	3,6 (2,1–4,6)*	0,0 (0,0–0,2)	0,0 (0,0–0,0)
	3	0,0 (0,0–0,8)	0,0 (0,0–0,3)	0,0 (0,0–0,8)	0,0 (0,0–1,0)	0,0 (0,0–0,0)
ЩФ, Е/л	1	55 (43–67)	55 (50–57)	40 (37–49)	41 (33–48)	53 (50–57)
	2	57 (49–68)	36 (22–48)*	24 (20–34)*	31 (23–39)*	65 (55–71)
	3	62 (50–68)	67 (55–75)	57 (41–68)	50 (39–58)	59 (53–62)
ТрКФ, Е/л	1	26 (23–27)	23 (22–25)	23 (21–25)	20 (17–25)	18 (16–19)*
	2	26 (22–28)	14 (11–18)*	12 (9–14)*	13 (11–19)*	14 (11–17)*
	3	27 (24–30)	27 (24–29)	27 (22–29)	25,8±3,6	21 (20–21)*

* — статистически значимые различия по сравнению с дооперационным уровнем при $p < 0,05$. Полу жирным шрифтом выделены статистически значимые различия с группой 1 при $p < 0,05$.

Таблица 6

Нежелательные явления у кроликов всех групп, число наблюдений

Нежелательное явление	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 8)	Группа 3 (n = 8)
Миграция имплантата под кожу	2 2/32*	0	0
Артрит коленного сустава	1	0	0
Рост СРБ и лейкоцитоз	1	1	1
Всего	4 (50%)	1 (13%)	1 (13%)

* — относительно числа имплантаций.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполненных нами исследований по оценке биосовместимости костнопластических КМ, содержащих в своем объеме фармакологические субстанции, включая рентгенологические, патологоанатомические, гистологические и лабораторные исследования, обнаружено, что биосовместимость всех тестируемых материалов можно оценить как приемлемую: не наблюдалось иммунологического отторжения ксеногенного материала с участием лимфоцитов, а также цитотоксических эффектов. При этом материалы, содержащие золедроновую кислоту и ранелат стронция, показали лучшую фиксацию в дефекте; для них, в отличие от контроля, не было зафиксировано миграции имплантата. Аналогичная особенность отмечена ранее и для алломатериалов, содержащих золедроновую кислоту [32].

Тканевой и клеточный состав области имплантации ксеногенного костного матрикса, импрегнированного антирезорбтивными препаратами, был различным и значимо отличался от контроля. Имплантат костной ткани не был полностью иммунологически нейтральным, оказывая местное умеренно раздражающее действие, выражающееся в слабой эозинофилии и моноцитарно-макрофагальной инфильтрации соединительной ткани в межтрабекулярных промежутках остеопластического материала. Данная реакция обусловлена типичным иммунологическим ответом на ксено-трансплантацию и является залогом как выработки толерантности, так и успешного приживления инородного материала [33].

Импрегнация золедроновой кислотой оказывала пролонгированное антирезорбтивное воздействие как на сам ксеногенный костный матрикс, так и на губчатое костное вещество ложа трансплантата, что привело к увеличению их трабекулярной плотности в сравнении с контролем. Аналогичный эффект обнаруживали ранее при обработке костных аллотрансплантатов и титановых имплантатов золедроновой кислотой. Вместе с тем способность золедроновой кислоты влиять

на остеогенный потенциал в области имплантации, по всей видимости, является дозозависимой и на сегодняшний день дискуссионной [34, 35].

Золедроновая кислота также усиливала местное раздражающее действие ксеногенного матрикса, выражающееся в повышенной эозинофилии и фиброзировании области трансплантации. Согласно полученным ранее данным, подобный эффект мог быть следствием приобретения макрофагами фенотипа М1 под влиянием золедроновой кислоты [36], что привело к дисбалансу поляризации макрофагов между провоспалительным (М1) и противовоспалительным (М2) фенотипами, а в результате — к активизации регуляторной функции эозинофилов и локальному фиброзу.

Известно, что отличительным свойством ранелата стронция при системном и локальном применении является не только ингибирование костной резорбции, но и стимуляция остеогенеза [37]. Поэтому импрегнация ксеногенного костного матрикса ранелатом стронция ожидаемо повышала долю новообразованной костной ткани в области трансплантации и плотность трабекулярной сети костного ложа. Снижение значений показателя раздражающего действия имплантационного материала в данной группе экспериментов можно связать с изученным ранее влиянием ранелата стронция на поляризацию макрофагов в направлении противовоспалительного фенотипа М2. Однако присутствие ранелата стронция в области трансплантации также приводило к дисбалансу фенотипов макрофагов М1 и М2, что могло индуцировать умеренный фиброз в области имплантации [38].

Вследствие указанных причин восстановление органотипического строения костного дефекта с деградацией и перестройкой имплантированного в него материала с полным замещением дефекта происходило в разных группах с различной скоростью. Как золедроновая кислота, так и ранелат стронция проявили способность повышать плотность губчатого костного вещества материнского ложа трансплантата, более выраженную при

использовании золедроновой кислоты. Однако костный матрикс, импрегнированный ранелатом стронция, на момент окончания эксперимента не показал статистически значимого изменения скорости резорбции относительно контрольного материала (чистый матрикс), а материал с золедроновой кислотой продемонстрировал замедление резорбции трансплантата и замещение его костной тканью.

Последнее наблюдение нужно оценивать в контексте описанного опыта клинического применения костнопластических материалов. Так, в работе Y. Fillingham и J. Jacobs указывается, что непосредственный контакт трансплантата с принимающей костью, а также наличие механической нагрузки на него являются необходимым условием для успешного функционирования костных трансплантатов [39]. Поэтому требования к костным имплантатам в части сохранения биомеханических свойств в целях структурной поддержки кости является важной его характеристикой, но являющейся обратной стороной требованиям к скорости его биорезорбируемости. В этом плане некоторые исследования показывают, например, что в клинической практике неудачи при использовании алломатериалов вызваны быстрой и полной деградацией материала [40]. В этом направлении имеется целая серия исследований, в которых золедронаты используются в качестве модификаторов, препятствующих избыточной резорбции костнопластического материала, содержащего стимуляторы остеогенеза (как правило, это факторы роста) [41, 42].

В целом же экспериментальные исследования показывают, что антиостеорезорбтивные свойства золедронатов могут найти свое применение для улучшения остеоинтеграции имплантируемых изделий и материалов (как металлических, так и природных) [43, 44]. Область клинического применения костнопластических материалов, содержащих золедронаты, обозначены в ранней работе M. Sørensen с соавторами, в которой отмечено, что такой материал может быть полезным для обеспечения ранней стабильности эндопротезов при ревизионном эндопротезировании без какого-либо неблагоприятного влияния на формирование кости [34]. Кроме того, повышенная устойчивость костнопластических материалов к резорбции может быть использована в случаях замещения крупных дефектов, когда требуется сохранение биомеханических характеристик имплантируемого матрикса трансплантата более длительное время [45].

Дополнительным моментом при анализе времени резорбции материалов может быть и тот факт, что, как показывает опыт клинического при-

менения алломатериалов, аллотрансплантаты могут сохраняться и полностью не резорбироваться спустя много лет после трансплантации [46].

Безопасность и переносимость изученных материалов, согласно полученным нами данным, также можно оценить как приемлемую. В частности, обнаружено, что имплантация всех материалов не вызвала у животных признаков отторжения, интоксикации (как локальной, так и системной), длительной системной воспалительной реакций в течение всего срока наблюдения, хотя отдельный раздражающий местный эффект наблюдался до 182-х сут. после имплантации материала, импрегнированного золедроновой кислотой. Также не наблюдалось инфицирования материала и иных серьезных нежелательных реакций на тестируемые материалы. Данное наблюдение говорит о положительном моменте, т.к. в других исследованиях применимость КМ ограничена повышенным иммунным ответом на его имплантацию [47].

В целом же, как показывает наше исследование и имеющийся литературный материал, перспективы применения модифицированного золедроната костнопластического ксеногенного материала присутствуют. Такое расширение свойств костнопластических материалов может быть вполне оправдано, т.к. увеличивает возможности выбора материала хирургом [48].

Импрегнирование стронция ранелата в материал не вызвало значимых отличий по сравнению с контролем, что можно связать с его низкой биодоступностью из ксеноматрикса. В этом плане, возможно, нам удалось бы обнаружить эффекты применения стронция ранелата в случае более длительного срока наблюдения после имплантации. Однако имеющиеся литературные данные демонстрируют, что приемлемая биодоступность стронция ранелата достигается при его имплантации в матрицу из искусственных материалов [25, 49].

В целом КМ, импрегнированные ранелатом стронция и золедроновой кислотой, можно рекомендовать к замещению костных дефектов, расположенных вне полости суставов. Ввиду более длительной перестройки их можно также использовать для замещения дефектов костной ткани сегментов, несущих высокую опорную нагрузку.

Ограничения исследования

Ограничением данного исследования является размер выборок экспериментальных животных, однако полученные результаты могут быть использованы в части выработки показаний к применению костнопластических материалов, импрегнированных изученными субстанциями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Костнопластические материалы на основе ксеноматрикса из костей крупного рогатого скота, насыщенные золедроновой кислотой и стронцием ранелатом, имеют приемлемые значения биосовместимости, включая показатели безопасности.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Заявленный вклад авторов

Стогов М.В. — концепция или дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста статьи.

Дюрягина О.В. — концепция или дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация результатов исследования.

Силантьева Т.А. — концепция или дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация результатов исследования, критическое редактирование текста статьи.

Шипицына И.В. — концепция или дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация результатов исследования, критическое редактирование текста статьи.

Киреева Е.А. — концепция или дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация результатов исследования, критическое редактирование текста статьи.

Степанов М.А. — концепция или дизайн исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация результатов исследования, критическое редактирование текста статьи.

Все авторы прочли и одобрили финальную версию рукописи статьи. Все авторы согласны нести ответственность за все аспекты работы, чтобы обеспечить надлежащее рассмотрение и решение всех возможных вопросов, связанных с корректностью и надежностью любой части работы.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания по науке исследовательского центра.

Возможный конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическая экспертиза. Исследование выполнено при соблюдении принципов гуманного обращения с лабораторными животными в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. На проведение исследования получено одобрение локального комитета по этике ФГБУ «НМИЦ ТО им. акад. Г.А. Илизарова» (протокол № 2 (57) от 17.05.2018).

Информированное согласие на публикацию. Не требуется.

Учитывая обнаруженные биологические характеристики разработанных материалов, считаем возможным их дальнейшее применение в случаях замещения крупных дефектов кости и ревизионного эндопротезирования.

DISCLAIMERS

Author contribution

Stogov M.V. — concept or design of the study, collection and processing of a material, the interpretation of the data, the drafting of the manuscript.

Dyuryagina O.V. — concept or design of the study, collection and processing of a material, the interpretation of the data.

Silant'eva T.A. — concept or design of the study, collection and processing of a material, the interpretation of the data, the drafting of the manuscript.

Shipitsyna I.V. — concept or design of the study, collection and processing of a material, the interpretation of the data, critical revision of the manuscript.

Kireeva E.A. — concept or design of the study, collection and processing of a material, the interpretation of the data, critical revision of the manuscript.

Stepanov M.A. — concept or design of the study, collection and processing of a material, the interpretation of the data, critical revision of the manuscript.

All authors have read and approved the final version of the manuscript of the article. All authors agree to bear responsibility for all aspects of the study to ensure proper consideration and resolution of all possible issues related to the correctness and reliability of any part of the work.

Funding source. State budgetary funding.

Disclosure competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval. The study was conducted in compliance with the principles of humane treatment of laboratory animals in accordance with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experiments and other Scientific Purposes and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. The study was approved by the local ethics committee of National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Orthopaedic, protocol No 2 (57), 17.05.2018.

Consent for publication. Not required.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Хлусов И.А., Порохова Е.Д., Комарова Е.Г., Казанцева Е.А., Шаркеев Ю.П., Юрова К.А. и др. Сcafфолды – носители лекарственных средств и биологических молекул для биоинженерии костной ткани. *Цитология*. 2022;64(3):183-207. doi: 10.31857/S0041377122030051. Khlusov I.A., Porokhova E.D., Komarova E.G., Kazantseva E.A., Sharkeev Yu.P., Yurova K.A. et al. Scaffolds as carriers of drugs and biomolecules for bone tissue bioengineering. *Tsitologiya*. 2022;64(3):183-207. (In Russian). doi: 10.31857/S0041377122030051.
2. Ghimire A., Song J. Anti-periprosthetic infection strategies: from implant surface topographical engineering to smart drug-releasing coatings. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13(18):20921-20937. doi: 10.1021/acsmami.1c01389.
3. He M., Huang Y., Xu H., Feng G., Liu L., Li Y. et al. Modification of polyetheretherketone implants: From enhancing bone integration to enabling multi-modal therapeutics. *Acta Biomater*. 2021;129:18-32. doi: 10.1016/j.actbio.2021.05.009.
4. Lohberger B., Eck N., Glaenger D., Kaltenegger H., Leithner A. Surface modifications of titanium aluminium vanadium improve biocompatibility and osteogenic differentiation potential. *Materials (Basel)*. 2021;14(6):1574. doi: 10.3390/ma14061574.
5. Borchering K., Schmidmaier G., Hofmann G.O., Wildemann B. The rationale behind implant coatings to promote osteointegration, bone healing or regeneration. *Injury*. 2021;52 Suppl 2:S106-S111. doi: 10.1016/j.injury.2020.11.050.
6. Hasan A., Byambaa B., Morshed M., Cheikh M.I., Shakoor R.A., Mustafy T. et al. Advances in osteobiologic materials for bone substitutes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(6):1448-1468. doi: 10.1002/term.2677.
7. Martin V., Bettencourt A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;82:363-371. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.038.
8. Стогов М.В., Смоленцев Д.В., Киреева Е.А. Костные ксеноматериалы в травматологии и ортопедии (аналитический обзор литературы). *Травматология и ортопедия России*. 2020;26(1):181-189. doi: 10.21823/2311-2905-2020-26-1-181-189. Stogov M.V., Smolentsev D.V., Kireeva E.A. Xenografts in Trauma and Orthopaedics (Analytical Review). *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2020;26(1):181-189. (In Russian). doi: 10.21823/2311-2905-2020-26-1-181-189.
9. Amirazad H., Dadashpour M., Zarghami N. Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering. *J Biol Eng*. 2022;16(1):1. doi: 10.1186/s13036-021-00282-5.
10. Zhang H., Yang L., Yang X.G., Wang F., Feng J.T., Hua K.C. et al. Demineralized bone matrix carriers and their clinical applications: an overview. *Orthop Surg*. 2019;11(5):725-737. doi: 10.1111/os.12509.
11. Liu K.F., Chen R.F., Li Y.T., Lin Y.N., Hsieh D.J., Periasamy S. et al. Supercritical carbon dioxide decellularized bone matrix seeded with adipose-derived mesenchymal stem cells accelerated bone regeneration. *Biomedicines*. 2021;9(12):1825. doi: 10.3390/biomedicines9121825.
12. Mattioli-Belmonte M., Montemurro F., Licini C., Iezzi I., Dicarolo M., Cerqueni G. et al. Cell-Free demineralized bone matrix for mesenchymal stem cells survival and colonization. *Materials (Basel)*. 2019;12(9):1360. doi: 10.3390/ma12091360.
13. Nie W., Wang Z., Cao J., Wang W., Guo Y., Zhang C. et al. Preliminary outcomes of the combination of demineralized bone matrix and platelet Rich plasma in the treatment of long bone non-unions. *BMC Musculoskelet Disord*. 2021;22(1):951. doi: 10.1186/s12891-021-04840-2.
14. Jin Y.Z., Zheng G.B., Lee J.H., Han S.H. Comparison of demineralized bone matrix and hydroxyapatite as carriers of Escherichia coli recombinant human BMP-2. *Biomater Res*. 2021;25(1):25. doi: 10.1186/s40824-021-00225-7.
15. He L.H., Zhang Z.Y., Zhang X., Xiao E., Liu M., Zhang Y. Osteoclasts may contribute bone substitute materials remodeling and bone formation in bone augmentation. *Med Hypotheses*. 2020;135:109438. doi: 10.1016/j.mehy.2019.109438.
16. Zhu H., Blahnová V.H., Perale G., Xiao J., Betge F., Boniolo F. et al. Xeno-Hybrid bone graft releasing biomimetic proteins promotes osteogenic differentiation of hMSCs. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:619111. doi: 10.3389/fcell.2020.619111.
17. Carvalho M.S., Cabral J.M.S., da Silva C.L., Vashishth D. Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: creating new bone by mimicking the extracellular matrix. *Polymers (Basel)*. 2021;13(7):1095. doi: 10.3390/polym13071095.
18. Leng Q., Liang Z., Lv Y. Demineralized bone matrix scaffold modified with mRNA derived from osteogenically pre-differentiated MSCs improves bone repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;119:111601. doi: 10.1016/j.msec.2020.111601.
19. Rajendran A.K., Amirthalingam S., Hwang N.S. A brief review of mRNA therapeutics and delivery for bone tissue engineering. *RSC Adv*. 2022;12(15):8889-8900. doi: 10.1039/d2ra00713d.
20. Стогов М.В., Дюрягина О.В., Силантьева Т.А., Киреева Е.А., Шипицына И.В., Степанов М.А. Доклиническая оценка эффективности и безопасности нового костнопластического материала ксеногенного происхождения, содержащего в своем объеме ванкомицин и меропенем. *Гений ортопедии*. 2022;28(4):565-573. doi: 10.18019/1028-4427-2022-28-4-565-573. Stogov M.V., Dyuryagina O.V., Silanteva T.A., Kireeva E.A., Shipitsina I.V., Stepanov M.A. Preclinical evaluation of the efficacy and safety of a new osteoplastic material of xenogenic origin containing vancomycin or meropenem. *Orthopaedic Genius*. 2022;28(4):565-573. (In Russian). doi: 10.18019/1028-4427-2022-28-4-565-573.
21. Cho H., Bucciarelli A., Kim W., Jeong Y., Kim N., Jung J. et al. Natural sources and applications of demineralized bone matrix in the field of bone and cartilage tissue engineering. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1249:3-14. doi: 10.1007/978-981-15-3258-0_1.
22. Govoni M., Lamparelli E.P., Ciardulli M.C., Santoro A., Oliviero A., Palazzo I. et al. Demineralized bone matrix paste formulated with biomimetic PLGA microcarriers for the vancomycin hydrochloride controlled delivery: Release profile, cytotoxicity and efficacy against S. aureus. *Int J Pharm*. 2020;582:119322. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119322.

23. Zwolak P., Farei-Campagna J., Jentsch T., von Rechenberg B., Werner C.M. Local effect of zoledronic acid on new bone formation in posterolateral spinal fusion with demineralized bone matrix in a murine model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2018;138(1):13-18. doi: 10.1007/s00402-017-2818-4.
24. Parmaksiz M., Lalegül-Ülker Ö., Vurat M.T., Elçin A.E., Elçin Y.M. Magneto-sensitive decellularized bone matrix with or without low frequency-pulsed electromagnetic field exposure for the healing of a critical-size bone defect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;124:112065. doi: 10.1016/j.msec.2021.112065.
25. Ferrández-Montero A., Eguiluz A., Vazquez E., Guerrero J.D., Gonzalez Z., Sanchez-Herencia A.J. et al. Controlled SrR Delivery by the Incorporation of Mg Particles on Biodegradable PLA-Based Composites. *Polymers (Basel).* 2021;13(7):1061. doi: 10.3390/polym13071061.
26. Küçükürkmen B., Öz U.C., Toptaş M., Devrim B., Saka O.M., Bilgili H. et al. Development of zoledronic acid containing biomaterials for enhanced guided bone regeneration. *J Pharm Sci.* 2021;110(9):3200-3207. doi: 10.1016/j.xphs.2021.05.002.
27. Raina D.B., Qayoom I., Larsson D., Zheng M.H., Kumar A., Isaksson H. et al. Guided tissue engineering for healing of cancellous and cortical bone using a combination of biomaterial based scaffolding and local bone active molecule delivery. *Biomaterials.* 2019;188:38-49. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.10.004.
28. Патшина М.В., Ворошилин Р.А., Осинцев А.М. Анализ мирового рынка биоматериалов с целью определения потенциальных возможностей сырья животного происхождения. *Техника и технология пищевых производств.* 2021;51(2):270-289. doi: 10.21603/2074-9414-2021-2-270-289. Patshina M.V., Voroshilin R.A., Osintsev A.M. Global biomaterials market: potential opportunities for raw materials of animal origin. *Food processing: techniques and technology.* 2021;51(2):270-289. (In Russian). doi: 10.21603/2074-9414-2021-2-270-289.
29. Bracey D.N., Jinnah A.H., Willey J.S., Seyler T.M., Hutchinson I.D., Whitlock P.W. et al. Investigating the osteoinductive potential of a decellularized xenograft bone substitute. *Cells Tissues Organs.* 2019;207(2):97-113. doi: 10.1159/000503280.
30. Jinnah A.H., Whitlock P., Willey J.S., Danelson K., Kerr B.A., Hassan O.A. et al. Improved osseointegration using porcine xenograft compared to demineralized bone matrix for the treatment of critical defects in a small animal model. *Xenotransplantation.* 2021;28(2):e12662. doi: 10.1111/xen.12662.
31. Эрхова Л.В., Панов Ю.М., Гаврюшенко Н.С., Зайцев В.В., Лукина Ю.С., Смоленцев Д.В. и др. Сверхкритическая обработка ксеногенного костного матрикса в процессе изготовления имплантатов для остеосинтеза. *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* 2019;14(4):42-48. doi: 10.34984/SCFTP.2019.14.4.006. Erkhova L.V., Panov Yu.M., Gavryushenko N.S., Zaitsev V.V., Lukina Yu.S., Smolentsev D.V. et al. Supercritical Treatment of Xenogenic Bone Matrix in the Process of Manufacture of Implants for Osteosynthesis. *Supercritical Fluids: Theory and Practice.* 2019;14(4):42-48. (In Russian). doi: 10.34984/SCFTP.2019.14.4.006.
32. Baas J., Vestermark M., Jensen T., Bechtold J., Soballe K., Jakobsen T. Topical bisphosphonate augments fixation of bone-grafted hydroxyapatite coated implants, BMP-2 causes resorption-based decrease in bone. *Bone.* 2017;97:76-82. doi: 10.1016/j.bone.2017.01.007.
33. Onyema O.O., Guo Y., Hata A., Kreisel D., Gelman A.E., Jacobsen E.A. et al. Deciphering the role of eosinophils in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2020;20(4):924-930. doi: 10.1111/ajt.15660.
34. Sørensen M., Barckman J., Bechtold J.E., Søballe K., Baas J. Preclinical evaluation of zoledronate to maintain bone allograft and improve implant fixation in revision joint replacement. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(20):1862-1868. doi: 10.2106/JBJS.L.00641.
35. Quarterman J.C., Phruttiwanichakun P., Fredericks D.C., Salem A.K. Zoledronic Acid Implant Coating Results in Local Medullary Bone Growth. *Mol Pharm.* 2022;19(12):4654-4664. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00644.
36. Weber M., Homm A., Müller S., Frey S., Amann K., Ries J. et al. Zoledronate causes a systemic shift of macrophage polarization towards M1 in vivo. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1323. doi: 10.3390/ijms22031323.
37. Borciani G., Ciapetti G., Vitale-Brovarone C., Baldini N. Strontium functionalization of biomaterials for bone tissue engineering purposes: a biological point of view. *Materials (Basel).* 2022;15(5):1724. doi: 10.3390/ma15051724.
38. You J., Zhang Y., Zhou Y. Strontium functionalized in biomaterials for bone tissue engineering: a prominent role in osteoimmunomodulation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:928799. doi: 10.3389/fbioe.2022.928799.
39. Fillingham Y., Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J.* 2016;98-B(1 Suppl A):6-9. doi: 10.1302/0301-620X.98B.36350.
40. Rolvien T., Barbeck M., Wenisch S., Amling M., Krause M. Cellular mechanisms responsible for success and failure of bone substitute materials. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):2893. doi: 10.3390/ijms19102893.
41. Cleemann R., Sorensen M., Bechtold J.E., Soballe K., Baas J. Healing in peri-implant gap with BMP-2 and systemic bisphosphonate is dependent on BMP-2 dose-A canine study. *J Orthop Res.* 2018;36(5):1406-1414. doi: 10.1002/jor.23766.
42. Cleemann R., Sorensen M., West A., Soballe K., Bechtold J.E., Baas J. Augmentation of implant surfaces with BMP-2 in a revision setting: effects of local and systemic bisphosphonate. *Bone Joint Res.* 2021;10(8):488-497. doi: 10.1302/2046-3758.108.BJR-2020-0280.R1.
43. AbuMoussa S., Ruppert D.S., Lindsay C., Dahners L., Weinhold P. Local delivery of a zoledronate solution improves osseointegration of titanium implants in a rat distal femur model. *J Orthop Res.* 2018;36(12):3294-3298. doi: 10.1002/jor.24125.
44. Kellesarian S.V., Subhi A.L., Harthi S., Saleh Binshabaib M., Javed F. Effect of local zoledronate delivery on osseointegration: a systematic review of preclinical studies. *Acta Odontol Scand.* 2017;75(7):530-541. doi: 10.1080/00016357.2017.1350994.
45. Butscheidt S., Moritz M., Gehrke T., Puschel K., Amling M., Hahn M. et al. Incorporation and remodeling of structural allografts in acetabular reconstruction: Multiscale, micro-morphological analysis of 13 pelvic explants. *J Bone Joint Surg Am.* 2018;100(16):1406-1415. doi: 10.2106/JBJS.17.01636.
46. Wang W., Yeung K.W.K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017;2(4):224-247. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.

47. Sun J., Wang X., Fu C., Wang D., Bi Z. A crucial role of IL-17 in bone resorption during rejection of fresh bone xenotransplantation in rats. *Cell Biochem Biophys.* 2015;71(2):1043-1049. doi: 10.1007/s12013-014-0307-8.
48. Marmor M.T., Matz J., McClellan R.T., Medam R., Miclau T. Use of osteobiologics for fracture management: the when, what, and how. *Injury.* 2021;52 Suppl 2: S35-S43. doi: 10.1016/j.injury.2021.01.030.
49. Chiang C.W., Chen C.H., Manga Y.B., Huang S.C., Chao K.M., Jheng P.R. et al. Facilitated and controlled strontium ranelate delivery using GCS-HA nanocarriers embedded into PEGDA coupled with decortication driven spinal regeneration. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:4209-4224. doi: 10.2147/IJN.S274461.

Сведения об авторах

✉ **Стогов Максим Валерьевич** — д-р биол. наук, доцент
 Адрес: Россия, 640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, д. 6
<https://orcid.org/0000-0001-8516-8571>
 e-mail: stogo_off@list.ru

Дюрягина Ольга Владимировна — канд. вет. наук
<https://orcid.org/0000-0001-9974-2204>
 e-mail: diuriagina@mail.ru

Силантьева Тамара Алексеевна — канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0001-6405-8365>
 e-mail: tsyl@mail.ru

Шипицына Ирина Владимировна — канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0003-2012-3115>
 e-mail: ivschimik@mail.ru

Киреева Елена Анатольевна — канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-1006-5217>
 e-mail: ea_tkachuk@mail.ru

Степанов Михаил Александрович — канд. вет. наук
<https://orcid.org/0000-0003-1331-8897>
 e-mail: m-stepanov@mail.ru

Authors' information

✉ **Maksim V. Stogov** — Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor
 Address: 6, M. Ulyanova st., Kurgan, 640014, Russia
<https://orcid.org/0000-0001-8516-8571>
 e-mail: stogo_off@list.ru

Olga V. Dyuryagina — Cand. Sci. (Vet.)
<https://orcid.org/0000-0001-9974-2204>
 e-mail: diuriagina@mail.ru

Tamara A. Silant'eva — Cand. Sci. (Biol.)
<https://orcid.org/0000-0001-6405-8365>
 e-mail: tsyl@mail.ru

Irina V. Shipitsyna — Cand. Sci. (Biol.)
<https://orcid.org/0000-0003-2012-3115>
 e-mail: ivschimik@mail.ru

Elena A. Kireeva — Cand. Sci. (Biol.)
<https://orcid.org/0000-0002-1006-5217>
 e-mail: ea_tkachuk@mail.ru

Mikhail A. Stepanov — Cand. Sci. (Vet.)
<https://orcid.org/0000-0003-1331-8897>
 e-mail: m-stepanov@mail.ru