

**Комплексный подход к изучению препарата, содержащего этидронаты ионов лантаноидов и кальция, *in vitro* и *in vivo***С.В. Бойчук<sup>1</sup>, Е.А. Житлова<sup>2</sup>, Ф.В. Шакирова<sup>2</sup>, Д.Э. Цыплаков<sup>1</sup>, И.Ф. Ахтямов<sup>1</sup>, Ф.В. Девятков<sup>3</sup>, Б.Р. Рамазанов<sup>1</sup>, Р.Х. Закиров<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины» Министерства науки и образования Российской Федерации,<sup>3</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и образования Российской Федерации**A comprehensive approach to the *in vitro* and *in vivo* study of a preparation containing etidronate of lanthanide and calcium ions**S.V. Boichuk<sup>1</sup>, E.A. Zhitlova<sup>2</sup>, F.V. Shakirova<sup>2</sup>, D.E. Tsyplakov<sup>1</sup>, I.F. Akhtiamov<sup>1</sup>, F.V. Deviatov<sup>3</sup>, B.R. Ramazanov<sup>1</sup>, R.H. Zakirov<sup>1</sup><sup>1</sup>Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,<sup>2</sup>Kazan State Academy of Veterinary Medicine of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation,<sup>3</sup>Kazan Federal University of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation

Поиск новых эффективных методов лечения переломов и дефектов костной ткани – насущная задача медицины. **Цель.** Изучение эффективности препарата, содержащего этидронаты ионов лантаноидов и кальция, в регенерации дефектов костной ткани. **Материалы и методы.** На первом этапе исследований были проведены эксперименты *in vitro* с использованием остеобластной (МС3Т3-Е1) и остеокластной (RAW 264.7) клеточных линий. Для изучения способности препарата влиять на скорость регенерации малых (2,5 мм в диаметре) костных дефектов у кроликов (n = 36) животным вводили исследуемый препарат в область дефекта на 3 и 5 сутки после оперативного вмешательства. Рентгенометрические и реактивные морфологические преобразования костной ткани в зоне перелома определяли в начале, середине и конце эксперимента. **Результаты.** Было обнаружено, что вышеуказанный препарат усиливает остеогенную дифференцировку и стимулирует накопление внутриклеточного кальция в клетках линии МС3Т3-Е1. В то же время, способность препарата ингибировать RANKL-индуцированную дифференцировку остеокластов *in vitro* не была обнаружена. Анализ гистологических изменений и результаты компьютерной томографии показали достоверно значимые различия между контрольной и экспериментальной группой животных (p < 0,01), подтвердив, тем самым, способность препарата усиливать регенерацию в области костных дефектов малого размера. **Заключение.** В результате проведенных исследований нами впервые была показана способность препарата, содержащего этидронаты ионов лантаноидов и кальция, стимулировать активность остеобластов *in vitro* и на ранних сроках способствовать заживлению небольших костных дефектов.

**Ключевые слова:** лантаноиды, этидронат, остеобласты, остеокласты, остеолит, регенерация дефектов костной ткани

The search for new more effective techniques to repair bone fractures and defects is an urgent task of healthcare. **Objective** To explore the efficacy of a preparation containing etidronates of lanthanide and calcium ions in regenerative repair of bone defects. **Material and methods** The osteoblastic MC3T3-E1 and the osteoclastic RAW 264.7 cell lines were used in *in vitro* experiments at the first stage of the research. The agent was postoperatively injected in a bone defect of 36 rabbits on days 3 and 5 to assess the preparation's effect on regenerative repair of small defects with diameter of 2.5 mm. Radiometric and reactive morphological characteristics of bone tissue were evaluated at the fracture site at the beginning, middle and end of experiment. **Results** The above preparation was found to enhance osteogenic differentiation and stimulate accumulation of intracellular calcium in MC3T3 E1 cells. However, the preparation was not shown to inhibit RANKL-induced osteoclast differentiation *in vitro*. Histological and computed tomography findings demonstrated statistically significant differences between control and experimental animals (p < 0.01) and indicated to the preparation's effect of promoting regenerative repair of small bone defects. **Conclusion** The series was the first to show the effect of the preparation containing etidronates of lanthanide and calcium ions as stimulating osteoblast activity *in vitro* and promoting early regenerative repair of small bone defects.

**Keywords:** lanthanide, etidronate, osteoblast, osteoclast, osteolysis, regeneration of bone defect

## ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых эффективных методов лечения переломов и дефектов костной ткани является, безусловно, актуальной задачей медицинской науки [1]. Конкретную значимость приобретает внедрение эффективных средств для активации процессов регенерации, что улучшает исход повреждения или заболевания. Лекарственные и иные препараты этого типа должны отвечать следующим требованиям: высокая биологическая активность и биосовместимость, способность к остеогенности, остеокондукции, остеиндукции; способ-

ность к биодеградации, которая должна соответствовать скорости регенерации костной ткани [2–6].

Для регулирования кальциевого метаболизма при остеопорозе, а также патологической оссификации через образование нерастворимых оксалатов и фосфатов кальция активно применяется 1-гидроксиэтан-1,1-дифосфоновая (этидроновая) кислота, которая является представителем дифосфонатов и используется в медицине в форме калиевых и натриевых солей (ксидифон, этидронат). Преимущественно ионный

тип связи, характерный для ионов кальция и лантаноидов, а также близость для них параметра Аренса ( $P \cdot \alpha = 2.6-2.8 \text{ эВ} \cdot \text{Å}^{5/2}$ ) [7–9] обосновывают то, что ионы лантаноидов, введенные в виде комплексов, встраиваются в структуру гидроксипатита, являющегося базовой минеральной составляющей костной ткани.

Ранние исследования показали, что лантаноиды подавляют развитие клеток (остеокластов), отвечающих за резорбцию костной ткани [10–13]. Перспективным направлением является совместное использование дифосфонатов и лантаноидов, что увеличивает синергетический эффект в интенсификации регенерации костной ткани. В пользу этой гипотезы свидетельствуют экспериментальные работы, установившие, что подобное

средство способствует ускорению регенерации костной ткани локально в области перелома или дефекта, а также сокращению времени восстановления нормальной физиологической функции поврежденной кости [14, 15].

Эти исследования явились основанием для синтеза нового лекарственного препарата на основе указанной композиции (с условным названием «ИНРОК»), а также этапного изучения его влияния на процессы дифференцировки остеобластов и остеокластов *in vitro* и его способности улучшать процессы регенерации костной ткани *in vivo*.

**Целью** нашего исследования явилось изучение остеиндукционных свойств препарата, содержащего этидронаты ионов лантаноидов и кальция, *in vitro* и оценка его действия на процесс репаративной регенерации *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реагенты.** Препарат ИНРОК формируется в соответствующих патентах (RU 2248210, RU 2521344, EP 2848250) пропорциях [16–18] и содержит этидроновую кислоту, хлорид кальция, нитрат гадолиния (III), хлорид диспрозия (III) в мольном соотношении 50:75:4:1 при pH  $7,4 \pm 0,1$ . Исследования показывали, что концентрация свободных (не связанных в растворимые и нерастворимые комплексы) форм этидроната,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ln}^{3+}(\text{Gd}^{3+} + \text{Dy}^{3+})$  в препарате ИНРОК составляет соответственно  $4 \cdot 10^{-4}$  (ксидифон при пероральном применении дает максимальную концентрацию в крови  $3 \cdot 10^{-4}$ ),  $2 \cdot 10^{-4}$  (в крови  $\sim 10^{-2}$ ) и  $\sim 10^{-15}$  моль/л. Вместе с тем, подавляющая часть компонентов связана в осадковые, малорастворимые формы, т.е. препарат является суспензией с размером частиц около 6 микрон (прибор "Malvern" Zetasizer Nano ZS). Таким образом, нерастворимые субстанции являются своего рода "резервуаром", обеспечивающим, согласно принципу Ле Шателье, постоянную низкую (не превышающую порог выраженной токсичности), концентрацию активных форм (этидроната и  $\text{Ln}^{3+}$ ) в растворе по мере потребления их в ходе тех или иных процессов. Кроме того, в растворе содержатся свободные ионы натрия, хлорид- и нитрат-ионы в количестве  $5 \cdot 10^{-2}$ ,  $3 \cdot 10^{-2}$  и  $2,5 \cdot 10^{-3}$  моль/л соответственно.

**Клеточные линии и их культивирование.** Макрофагальная клеточная линия RAW 264.7 (ATCC, TIB-71) и линия предшественников остеобластов MC3T3-E1 (ATCC, CRL-2593) были получены из Банка клеточных культур США (American Tissue Culture Collection – ATCC, США). Клетки линии RAW 264.7 культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 1 % антибиотиков (пенициллин-стрептомицин) во влажной камере при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> (LamSystems, Россия). Клетки линии MC3T3-E1 культивировали во флаконах T-75 (Corning, США) в специальной среде Alpha Minimum Essential Medium, с добавлением рибо- и дезоксирибонуклеотидов, 2 mM глутамина, 1 mM пирувата натрия (Gibco, США), 10 % ЭТС и 1 % антибиотиков во влажной камере при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> (см. выше).

В качестве положительного контроля при определении способности препарата ИНРОК ингибировать дифференцировку остеокластов (TRAP-тест) был использован препарат генестин (Sigma-Aldrich, США).

**Анализ цитотоксичности при помощи MTS-теста.** Названные клеточные линии культивировали в течение суток после засева в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning, США) и инкубировали с соединением ИНРОК (1–20 μM) в течение последующих трёх дней. Для оценки жизнеспособности клеток в

культуру вносили MTS-реагент (Promega, США). Клетки инкубировали в течение часа. Анализ жизнеспособности клеток проводили с помощью планшетного ридера MultiScan (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 492 нм. Следующим этапом рассчитывали половинную ингибирующую концентрацию ( $\text{IC}_{50}$ ) соединения, подавлявшего жизнеспособность клеток на 50 % в течение 48–72 часов культивирования. Полученные данные нормализовывали по сравнению с клетками, культивированными с растворителем (контроль).

**Окрашивание на тартрат-резистентную кислотную фосфатазу (качественная реакция на наличие зрелых остеокластов).** Использование клеточной линии RAW264.7 позволило провести качественную оценку способности препарата индуцировать дифференцировку остеокластов. Показателем являлась степень продукции тартрат-резистентной кислотной фосфатазы (TRAP) с использованием набора Leukocyte Acid Phosphatase assay kit (Sigma-Aldrich, США). С этой целью клетки линии RAW264.7 рассевались в 12-луночные плоскодонные планшеты (Corning, США) по  $3 \times 10^4$  клеток в лунку и культивировались в полной культуральной среде DMEM с добавлением L-глутамина, антибиотиков (все реагенты ПАНЭКО, Россия) и 10 % ЭТС (HyClone, США). На следующий день культивирования проводили замену среды на иную, содержащую 50 ng/mL RANKL (R&D Systems, США), а также соединения ИНРОК или генестин (Sigma-Aldrich, США), использованный в качестве положительного контроля.

Все эксперименты проводили в трехкратных повторностях с заменой культуральной среды каждый второй день культивирования. На пятый день культивирования среду удаляли, клеточный монослой отмывали ледяным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и фиксировали 3,5 % формальдегидом в течение 10 минут при комнатной температуре. После этого клетки трёхкратно отмывали дистиллированной водой и инкубировали в течение часа при 37 °C с реакционной смесью вышеуказанного набора согласно рекомендациям производителя. Наличие зрелых остеокластов визуализировали световой микроскопией по наличию многоядерных (содержащих три и более ядер) TRAP-положительных клеток в 7 случайных полях зрения у каждой экспериментальной группы (контроль, культивирование с генестинем и ИНРОКом)

**Количественное определение TRAP-активности.** После завершения дифференцировки клеток линии RAW 264.7 в зрелые остеокласты (5-ый день культивирования) среду для культивирования, содержащую RANKL, удаляли и клеточный монослой дважды от-

мывали ледяным ФСБ. Далее клетки фиксировали в течение 10 мин. с помощью 3,5 % формальдегида и в дальнейшем проводили фиксацию этиловым спиртом и ацетоном (соотношение 1:1) в течение 60 секунд. Образцы высушивали и инкубировали в реакционной смеси, содержащей 50-мМ цитратный буфер (рН 4,5) с добавлением тартата натрия (10 мМ) и р-нитрофенилфосфата (6 мМ). После часовой инкубации образцы переносили в 96-луночные планшеты, содержащие равный объем NaOH (0,1 N). Количественную оценку активности тартрат-резистентной кислой фосфатазы проводили с помощью планшетного ридера MultiScan (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 405 нМ. TRAP-активность измеряли по отношению к контрольным (растворитель) образцам.

**Определение остеобластной активности *in vitro* (качественная и количественная реакция с использованием ализаринового красного).** Способность соединения ИНРОК индуцировать накопления кальция в остеобластах оценивали с помощью окрашивания ализариновым красным. С этой целью мышинные предшественники остеобластов линии MC3T3-E1 помещали в 6-луночные планшеты для культивирования ( $1 \times 10^5$  клеток/луночка) и культивировали при 5 %  $\text{CO}_2$  и 37 °С в течение 72 часов. После этого среду для культивирования заменяли на среду Osteogenesis Induction #1 и культивировали в течение последующих 6 дней (обновление среды производили каждые 2–3 дня). После 6-дневного периода культивирования клеток линии MC 3T3-E1 осуществляли замену культуральной среды в лунках на среду № 1 для индукции остеогенеза (состав: Alpha Minimum Essential Medium, 10 % FBS, 0,2 mM ascorbic acid 2-phosphate solution, 10 mM glycerol Acid 2-Phosphate Solution), замену которой осуществляли каждые 3 дня. Спустя 6 дней проводили замену среды на среду № 2 для индукции остеогенеза, содержащую мелатонин (положительный контроль). Клетки культивировали с препаратом ИНРОК и его растворителем (контроль) в среде # 1. По истечении 6-дневного срока культивирования оценивали минерализацию по результату окрашивания ализариновым красным. Для этого клетки линии MC3T3-E1 отмывали дважды ФСБ, фиксировали 4 % раствором формальдегида и проводили окрашивание 2 % раствором ализаринового красного (рН 4,2). Далее клетки отмывали раствором ФСБ, визуализацию окрашивания проводили методом световой микроскопии (Olympus BX 63, Япония). Количественную оценку проводили на планшетном ридере MultiScan (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 560 нМ. Для этого проводили

экстракцию красителя из клеточных образцов 10 % уксусной кислотой в течение 30 минут и последующего переноса супернатантов в 96-луночные планшеты.

**Эксперименты *in vivo*.** В рамках доклинического испытания, согласно ГОСТ ИСО 10993 (Р) и на основании одобрения Локальным этическим комитетом КГМУ (протокол заседания № 9 от 25 ноября 2014), на кафедре ветеринарной хирургии КГАВМ эксперименты проведены на 36 беспородных кроликах. Локальное повреждение в проксимальном отделе большеберцовой кости с медиальной поверхности осуществляли рассверливанием одной кортикальной пластины в виде несквозного цилиндрического дефекта диаметром три мм [19]. Животные были разделены на две группы. Кроликам группы сравнения препарат ИНРОК в зону травмы не вводился; в опытной группе локально в область дефекта кортикальной пластины в дозе 0,2 мл вводился препарат ИНРОК на третьи и пятые сутки после операции. Продолжительность экспериментальных исследований – 56 суток.

Гистологические исследования края костного дефекта и регенерата проводили на 7, 14, 28 и 56 сутки опыта. Морфометрируемыми параметрами регенерата, заполнявшего перфоративное отверстие, при этом явились площади таких структурных компонентов как грануляционная, соединительная и хрящевая ткани; ретикулофиброзная и пластинчатая кость; лейкоцитарно-некротические массы. Забранный материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине, декальцинировали, обезвоживали и заливали в парафин. Гистологические препараты (микротомные срезы толщиной 5–7 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизон. Для количественной оценки площадей изучаемых структур применялся морфометрический метод [20–21]. Расчет производился в процентах от общей площади гистологического среза.

Компьютерную томографию проводили на 7, 28 и 56 сутки после операции на мультиспиральном компьютерном томографе Brilliance 64 (Philips) в режиме поперечного сканирования. Для количественной оценки плотности кортикальной пластинки в зоне дефекта осуществляли обработку сагиттальных срезов регенерата в режиме мультипланарной реконструкции (MPR) [22]. На полученных изображениях в интерактивном режиме выделяли область дефекта и высчитывали ее плотность в единицах Хаунсфилда (HU).

Полученные цифровые результаты были обработаны с помощью пакетов прикладных программ SPSS v.13.0 с применением t-критерия Стьюдента с поправкой Bonferroni. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### **ИНРОК не ингибирует дифференцировку остеокластов клеточной линии RAW 264.7**

Известен факт, что RANKL/RANK-опосредованный сигнальный путь играет важную роль в регуляции функциональной активности остеокластов *in vitro*. Нами использована RANK-экспрессирующая макрофагальная мышечная клеточная линия RAW 264.7 для определения влияния исследуемого препарата на функциональную активность и дифференцировку остеокластов. С этой целью клетки линии RAW 264.7 культивировали в специальной среде для дифференцировки остеокластов (см. подробнее раздел «Материалы и методы») с добавлением ЭТС и RANKL (50 ng/mL). В последующем использовали общепринятый TRAP-

тест для визуализации зрелых многоядерных остеокластов. Учитывая, что в ранее проведенных тестах была получена выраженная ингибирующая активность генестеина в отношении способности остеокластов к дифференцировке [23–24], он использован нами в качестве контроля на данном этапе исследований.

Зафиксировано, что внесение RANKL в культуру клеток линии RAW 264.7 приводило к дифференцировке остеокластов (рис. 1, а, б). Генестеин в значительной степени снижал количество многоядерных клеток, что подтверждало его способность ингибировать остеокластную дифференцировку клеток линии RAW 264.7 при проведении качественного и количественного теста (рис. 1, в, г, ж). Эффект препарата был дозозависим-

мым. В эксперименте удалось показать, что препарат ИНРОК не ингибирует дифференцировку остеокластов линии RAW 264.7 (рис. 1, д, е, ж).

Важно, что в использованных нами концентрациях (100–1000 мкМ) этот препарат не вызывал гибели клеток линии RAW 264.7 и не ингибировал скорость их деления в течение всего периода их культивирования, о чем свидетельствовали результаты цитотоксического MTS-теста.

**ИНРОК стимулирует образование остеобластов из клеток линии MC3T3-E1 in vitro**

Следующим этапом было изучение способности препарата ИНРОК индуцировать процессы минерализации с помощью качественного и количественного методов, основанных на окрашивании Alizarin Red. В качестве положительного контроля использовались клетки, инкубированные с мелатонином. Мы выявили значительное увеличение количества ализарин-положительных клеток в образцах, инкубированных с мелатонином и препаратом ИНРОК, по сравнению с контрольными образцами, культивированными в специальной среде для стимуляции остеогенеза (рис. 2). Важно отметить, что ИНРОК в концентрации 0,5 и 1 мМ обладал более выраженным минерализующим эффектом по сравнению с мелатонином. Полученные данные были в дальнейшем подтверждены результатами количественного анализа по определению calcium deposition (рис. 2, е). Как и ожидалось, препарат ИНРОК в концентрациях 100–1000 мкМ не вызывал гибели клеток линии MC3T3

и не ингибировал скорость их деления в течение всего периода культивирования, о чем свидетельствовали результаты цитотоксического MTS-теста.

**ИНРОК стимулирует заживление костных дефектов in vivo**

Результаты наблюдений за подопытными животными выявили, что общее состояние, пищевая возбудимость их практически не изменялись на протяжении всего эксперимента. Кролики хорошо переносили нейролептаналгезию и оперативное вмешательство. Двигательная активность восстанавливалась через 30–35 минут, пищевая возбудимость через 3–5 часов.

Гистологические исследования костной ткани показали, что на 7 сутки наблюдений происходило снижение воспалительной реакции у животных опытной группы по сравнению с группой сравнения (5,5 ± 0,8 % и 14,6 ± 1,4 %), и достоверно уменьшалась площадь перфоративного отверстия (27,6 ± 2,1 % и 15,9 ± 1,4 %) – почти в два раза. В большинстве наблюдений процесс регенерации начинался с пролиферации кровеносных сосудов и миграции фибробластов. Расположенные между сосудистыми петлями мезенхимальные элементы свидетельствовали о формировании грануляционной ткани, объем которой в опытной группе возрастал на 16 % (70,6 ± 1,1 % и 53,6 ± 3,1 % (p < 0,05) соответственно). У животных группы сравнения отмечались признаки некроза и кальцификация костной ткани по краю дефекта (рис. 3). Случаи репарации в группе сравнения на этом сроке отсутствовали.

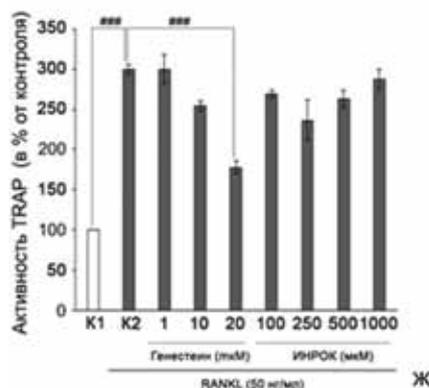
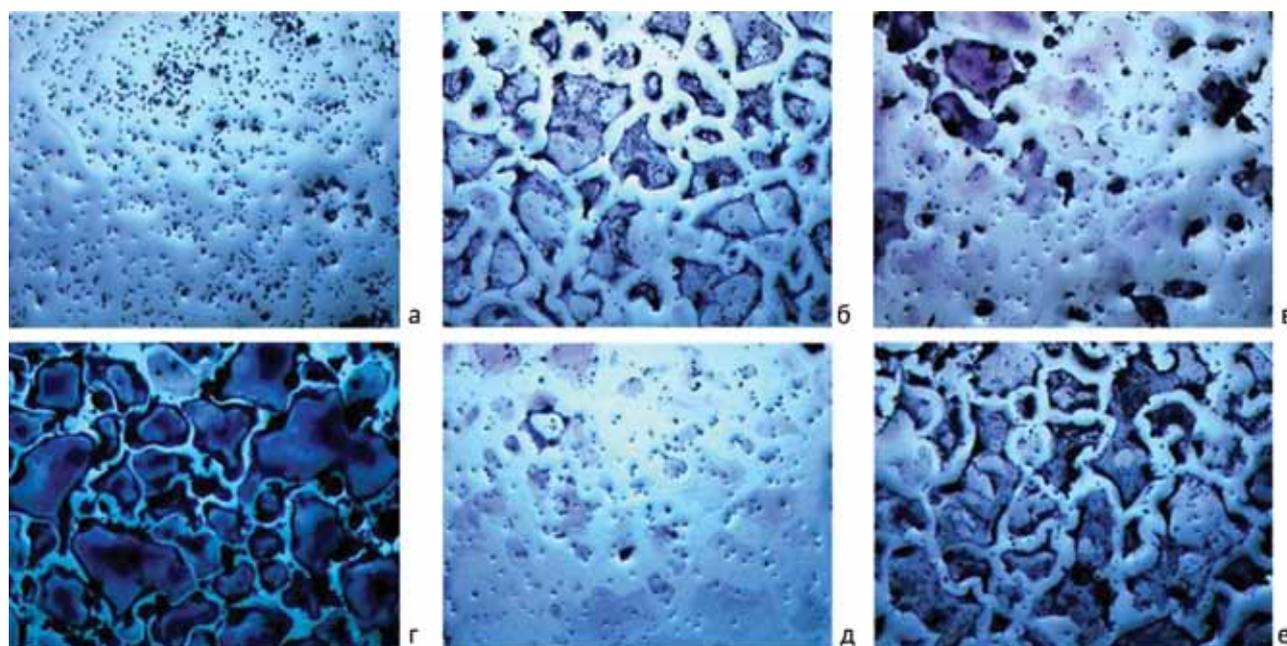


Рис. 1. ИНРОК не влияет на дифференцировку остеокластов и не ингибирует активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRAP). Для стимуляции остеокластной активности клетки линии RAW 264,7 инкубировали с RANK лиганда (50 нг/мл) в течение 5 дней в отсутствии (б) или в присутствии ИНРОКа (д, е). Клетки, культивированные без ИНРОКа и RANK лиганда (а), использовали в качестве негативного контроля, а клетки, культивированные с генестеином в присутствии RANK лиганда (в, г), в качестве положительного контроля. Спустя 5 дней проводили окрашивание на предмет выявления многоядерных TRAP-положительных остеокластов; ж – количественное измерение TRAP-активности). K1 – контроль без воздействия исследуемых соединений; K2 – после воздействия RANK лиганда (положительный контроль) (### p < 0,001)

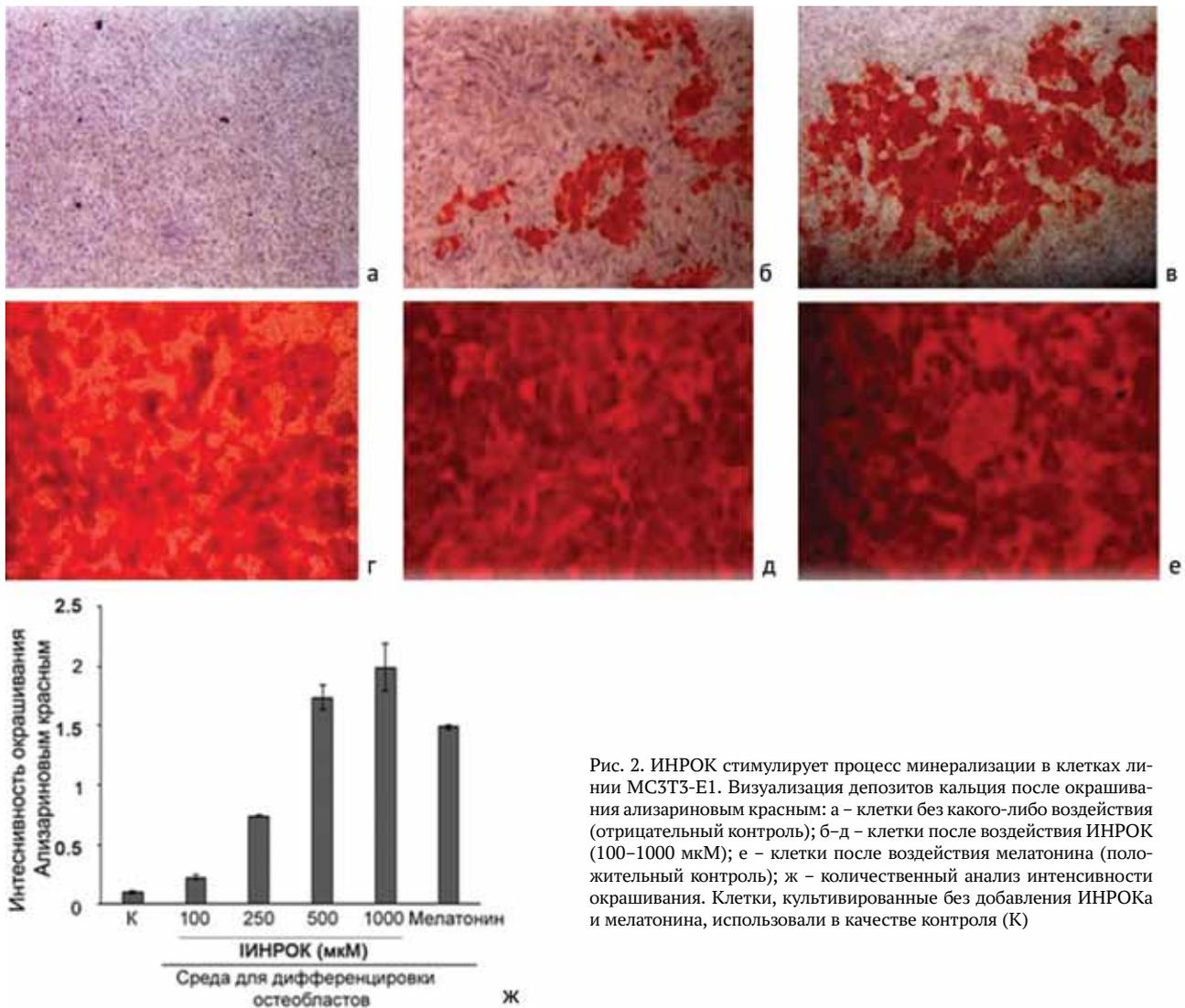


Рис. 2. ИНРОК стимулирует процесс минерализации в клетках линии MC3T3-E1. Визуализация депозитов кальция после окрашивания ализариновым красным: а – клетки без какого-либо воздействия (отрицательный контроль); б–д – клетки после воздействия ИНРОК (100–1000 мкМ); е – клетки после воздействия мелатонина (положительный контроль); ж – количественный анализ интенсивности окрашивания. Клетки, культивированные без добавления ИНРОКа и мелатонина, использовали в качестве контроля (К)

На 14 сутки после оперативного вмешательства в группе сравнения происходил процесс трансформации грануляционной и соединительной ткани в хрящевую. Площадь соединительной ткани в опытной группе составляла  $68,0 \pm 2,5 \%$ , что в 1,5 раза превышало таковую в группе сравнения ( $48,2 \pm 0,6 \%$ ,  $p < 0,05$ ). В этой группе уже наблюдались случаи формирования ретикулофиброзной ткани, балки которой были связаны с краями перфоративного отверстия. Площадь ретикулофиброзной кости в опытной группе была в три раза больше ( $18,2 \pm 0,6 \%$ ,  $p < 0,05$ ), чем в группе сравнения –  $6,0 \pm 1,0 \%$ . В большинстве случаев дефект был закрыт полностью. В единичных случаях наблюдали энхондральный остеогенез. Проявления воспалительной реакции на фоне репаративных процессов были незначительными или отсутствовали (рис. 3, в, г).

Через 28 дней наблюдений перфоративное отверстие было замещено ретикулофиброзной тканью с диффузной кальцификацией балок. Хрящевая ткань практически отсутствовала, что составило  $4,0 \pm 0,9 \%$  в группе сравнения и  $0,6 \pm 0,1 \%$  в опытной, а костный мозг был насыщен гемопоэтическими элементами,

располагавшимися среди сформированных костных трабекул (рис. 3, д, е).

На 56 сутки эксперимента у всех животных наступило полное неосложненное заживление. На месте перфоративного отверстия в опытной группе на 99 % визуализировалась пластинчатая кость ( $98,8 \pm 0,2 \%$ ) с развитой системой сосудистых каналов, восстановленным костным мозгом и окружающими мягкими тканями (рис. 3, ж, з). В то же время, в группе сравнения отмечались участки некроза и деструкции хрящевой ткани, а сформированная пластинчатая кость занимала 88 % от площади среза ( $88,7 \pm 0,6 \%$ ).

#### Данные компьютерной денситометрии

По результатам компьютерной томографии у животных опытной группы на 7 сутки эксперимента наблюдали достоверное ( $p = 0,001$ ) возрастание денситометрических показателей регенерата, что превышало в 2,5 раза таковые значения в группе сравнения ( $916,6 \pm 26,5$  HU и  $366,6 \pm 33,6$  HU соответственно) (рис. 4).

На завершающих сроках исследования плотность регенерата у животных опытной группы составляла  $1120,6 \pm 27,1$  HU, что на 4 % больше чем у животных группы сравнения ( $1078,2 \pm 57,4$  HU).

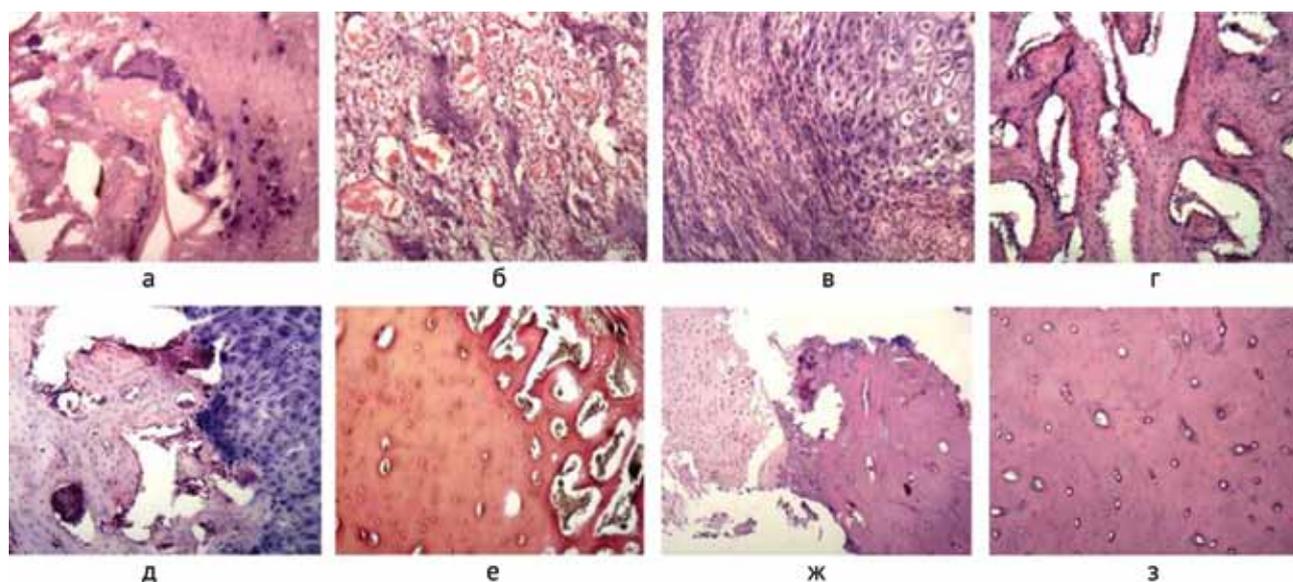


Рис. 3. Гистологическая картина костной ткани у животных группы сравнения (слева) и получавших ИНПРОК (справа). Окраска гистологических препаратов гематоксилином и эозином: а, б – некроз и обызвествление костной ткани по краю перфоративного отверстия (а), грануляционная ткань (б) – 7 сутки эксперимента; в, г – трансформация грануляционной и соединительной ткани в хрящевую (в), грубоволокнистая кость с балочным строением, заполняющая перфоративное отверстие (г) – 14 сутки эксперимента; д, е – трансформация хрящевой ткани в грубоволокнистую кость (д), перестройка грубоволокнистой кости в пластинчатую (е) – 28 сутки эксперимента; ж, з – пластинчатая кость с наличием фрагмента хрящевой ткани и очагами некроза (ж) со сформированной системой гаверсовых каналов (з) – 56 сутки эксперимента

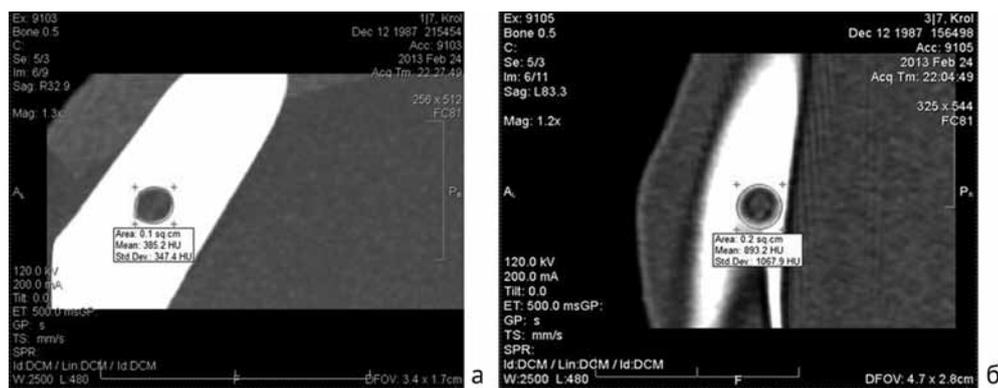


Рис. 4. Томограмма тазовой конечности кролика. 7-е сутки эксперимента: определение плотности большеберцовой кости по данным MPR: а – группа сравнения; б – опытная группа

## ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональная активность остеобластов является ключевой в формировании костной ткани как при физиологической, так и при репаративной регенерации. Развитие патологических процессов различного генеза (остеопороз, травма и др.) оказывает существенное влияние на скорость заживления костных дефектов.

На сегодня определен достаточно широкий спектр факторов, являющихся регуляторами остеогенной дифференцировки. К ним относятся статины, метформин, костные морфогенетические белки -2 и -7, паратиреоидный гормон и др. [25–29]. Несмотря на значительные различия в молекулярном механизме действия вышеуказанных факторов, все они обладают общим “слабым звеном” – для достижения выраженного остеогенного эффекта необходима их относительно длительная персистенция в местах дефектов костной ткани.

Результаты наших исследований по изучению активности фосфатазы и окрашивания ализариновым

красным впервые показали, что препарат в значительной степени стимулирует дифференцировку остеобластов *in vitro* и процессы внутриклеточной минерализации в остеобластах линии MC3T3-E1. В то же время, препарат ИНПРОК не влияет на активность остеокластов клеточной линии RAW264.7, при этом в значительной степени ускоряет скорость заживления костных дефектов *in vivo*.

Нами установлено, что препарат на основе этидроната ионов лантаноидов и кальция способен существенно ускорять процессы заживления небольших костных дефектов *in vivo*. Данный эффект может быть обусловлен способностью соединения стимулировать остеогенную дифференцировку и минерализацию остеобластов *in vitro*, что было нами показано с использованием соответствующей клеточной линии MC3T3-E1. В то же время, ИНПРОК не оказывал влияния на процессы дифференцировки остеокластов клеточной линии RAW 264.7.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Результаты настоящего исследования позволили представить научное обоснование возможности активации репаративного остеогенеза посредством использования препарата на основе этидроната ионов лантаноидов и кальция, который оказывает подавляющий эффект на фазу резорбции в ремоделировании микроархитектоники костной ткани в условиях индуцированной травмы. Препарат обладает способностью значительно стимулировать активность остеобластов и не оказывать при этом влияния на активность остеокластов *in vitro*.

2. Методом компьютерной томографии установлено, что достоверно значимые денситометрические отличия кортикальной пластины у животных опытной группы проявились уже на 7-е сутки эксперимента. Животные с локальным введением препарата опережали в 2,5 раза животных группы сравнения по темпам перестройки костной ткани в зоне остеорепаляции.

3. Результаты морфологического исследования зоны регенерации показали отличия между исследуемыми группами животных. На 7-е сутки эксперимента

площадь незаращенного перфоративного отверстия у животных опытной группы была достоверно меньше, чем у животных группы сравнения. К 14 суткам перфоративное отверстие у животных опытной группы было заполнено регенератом, в котором костеобразование протекало по энхондральному типу, в то время как у животных группы сравнения за счет перихондрального остеогенеза.

4. Таким образом, результаты нашего исследования впервые показали, что препарат, содержащий этидронаты ионов лантаноидов и кальция (ИНРОК), обладает выраженной способностью индуцировать остеогенную дифференцировку остеобластов и является перспективным при заживлении локальных дефектов кости.

5. Предварительный анализ свидетельствует о выраженной остеобластной активности композиции лантаноидов и этидроната, что позволяет рассматривать рецензируемый препарат в качестве перспективного соединения в клинической практике для усиления процессов регенерации, как минимум, малых костных дефектов.

*Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шастов А.Л., Кононович Н.А., Горбач Е.Н. Проблема замещения посттравматических дефектов длинных костей в отечественной травматолого-ортопедической практике (обзор литературы) // Гений ортопедии. 2018. Т. 24, № 2. С. 252-257.
2. Duncan C.P., Masri B.A. Fractures of the femur after hip replacement // Instr. Course Lect. 1995. Vol. 44. P. 293-304.
3. Кононович Н.А., Попков А.В. Анализ прижизненной оценки безопасности использования имплантатов с биоактивным напылением // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. № 3 (43). С.126-132.
4. Robey P.G. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function // Connect. Tissue Res. 1996. Vol. 35, No 1-4. P. 131-136.
5. Morphological Studies of Local Influence of Implants with Coatings Based on Superhard Compounds on Bone Tissue under Conditions of Induced Trauma / G. Kabirov, F. Shakirova, J. Manirambona, I. Akhtyamov, E. Gatina, D. Tsiplakov // J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ. 2015. Vol. 41, No 2. P. 177-184.
6. Ahrens L.H. Shielding efficiency of cations // Nature. 1954. Vol. 174. P. 644-645.
7. Brooker M.H., Bredig M.A. Significance of both polarizability and polarizing power of cations in nitrate vibrational spectra // J. Chem. Phys. 1973. Vol. 58. P. 5319-5327. DOI: 10.1063/1.1679146.
8. Mikenda W. IR study of cation effects on the O-D stretching frequencies of isotopically dilute HDO in aqueous salt solutions // Chemical Monthly. 1986. Vol. 117, No 8-9. P. 977-984.
9. Histomorphometric and densitometric changes in bone volume and structure after avascular bone grafting in the extremely atrophic maxilla / S. Schultze-Mosgau, M. Kewelow, I. Wiltfang, P. Kessler, F.W. Neukam // Br. J. Oral Maxillofac. Surg. 2001. Vol. 39, No 6. P. 439-447. DOI: 10.1054/bjom.2001.0617.
10. Lanthanide containing compounds for therapeutic care in bone resorption disorders / C.A. Barta, K. Sachs-Barrable, J. Jia, K.H. Thompson, K.M. Wasan, C. Orvig // Dalton Trans. 2007. No 43, P. 5019-5030. DOI: 10.1039/b705123a.
11. In vitro studies of lanthanide complexes for the treatment of osteoporosis / Y. Mawani, J.F. Cawthray, S. Chang, K. Sachs-Barrable, D.M. Weekes, K.M. Wasan, C. Orvig // Dalton Trans. 2013. Vol. 42, No 17. P. 5999-6011. DOI: 10.1039/c2dt32373g.
12. Fricker S.P. The therapeutic application of lanthanides // Chem. Soc. Rev. 2006. Vol. 35, No 6. P. 524-533.
13. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research / J. Aerssens, S. Boonen, G. Lowet, J. Dequeker // Endocrinology. 1998. Vol. 139, No 2. P. 663-670.
14. Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process / J.P. Issa, M.V. Bentley, M.M. Iyomasa, W. Sebald, R.F. de Albuquerque // Anat. Histol. Embryol. 2008. Vol. 37, No 3. P. 181-187.
15. The bone induction principle / M.R. Urist, B.F. Silverman, K. Büring, F.L. Dubuc, J.M. Rosenberg // Clin. Orthop. Relat. Res. 1967. Vol. 53. P. 243-283.
16. Способ регенерации костной ткани в эксперименте : пат. 2248210 Рос. Федерация / Ф.В. Девятков, Е.Г. Холмогорцев ; патентообладатель: Ф.В. Девятков. № 2005120705/14 ; заявл. 07.07.2005 ; опубл. 20.03.2005, Бюл. № 8. 5 с.
17. Способ регенерации костной ткани в эксперименте : заявка 2012119192/14 Рос. Федерация / Ф.В. Девятков ; заявитель: Ф.В. Девятков ; заявл. 10.05.2012 ; опубл. 27.06.2014, Бюл. № 18. 12 с.
18. Method for regenerating bone tissue : EP2848250 / F.V. Devyatov; - applied on 10.05.2012; European Patent Bulletin 36 | 2016 ; 07.09.2016. P.723.
19. Биосовместимость кальций-фосфатных материалов биогенного происхождения при имплантации в область дефектов костей собак / И.А. Талашова, Т.А. Силантьева, Н.А. Кононович, С.Н. Лунева // Гений ортопедии. 2016. № 4. С. 95-103.
20. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
21. Коржевский Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. СПб: Кроф, 2005. 48 с.
22. Computertomographie zur quantitative Bewertung der reparativen Knochenneubildung / G.V. Djachkova, R.V. Stepanov, M.A. Korabelnikov, S.P. Bojchuk, L.V. Suchodolova, N.F. Obanina // Chirurgische Allgemeine. 2007. No 1. P. 35-37.
23. Lee S.H., Kim J.K., Jang H.D. Genistein inhibits osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells via regulation of ROS production and scavenging // Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15, No 6. P. 10605-10621. DOI: 10.3390/ijms150610605.
24. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells / T. Maeda, A. Matsunuma, I. Kurahashi, T. Yanagawa, H. Yoshida, N. Horiuchi // J. Cell Biochem. 2004. Vol. 92, No 3. P. 458-471.
25. Brief bonemorphogenetic protein 2 treatment of glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblasts rescues commitment-associated cell cycle and mineralization without alteration of Runx2 / C.A. Luppen, N. Leclerc, T. Noh, A. Barski, A. Khokhar, A.L. Boskey, E. Smith, B. Frenkel // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, No 45. P. 44995-45003.
26. Effects of osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific / I.W. Li, S. Cheifetz, C.A. McCulloch, K.T. Sampath, J. Sodek // J. Cell Physiol. 1996. Vol. 169, No 1. P. 115-125. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199610)169:1<115::AID-JCP12>3.0.CO;2-C.
27. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture / A.M. Cortizo, C. Sedlinsky, A.D. McCarthy, A. Blanco, L. Schurman // Eur. J. Pharmacol. 2006. Vol. 536, No 1-2. P. 38-46. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.02.030.
28. Anabolic or catabolic responses of MC3T3-E1 osteoblastic cells to parathyroid hormone depend on time and duration of treatment / P.C. Schiller, G. D'Ippolito, B.A. Roos, G.A. Howard // J. Bone Miner. Res. 1999. Vol. 14, No 9. P. 1504-1512. DOI: 10.1359/jbmr.1999.14.9.1504.
29. Effect of lanthanides on red blood cell deformability and response to mechanical stress: role of lanthanide ionic radius / T. Alexy, O.K. Baskurt, N. Nemeth, M. Uyuklu, R.B. Wenby, H.J. Meiselman // Biorheology. 2011. Vol. 48, No 3-4. P. 173-183.

REFERENCES

1. Shastov A.L., Kononovich N.A., Gorbach E.N. Problema zameshcheniia posttraumaticheskikh defektov dlinnykh kostei v otechestvennoi travmatologo-ortopedicheskoi praktike (obzor literatury) [Management of posttraumatic long bone defects in the national orthopedic practice (literature review)]. *Genij Ortopedii*, 2018, vol. 4, no. 2, pp. 252-257. (in Russian)
2. Duncan C.P., Masri B.A. Fractures of the femur after hip replacement. *Instr. Course Lect.* 1995. Vol. 44. P. 293-304.
3. Kononovich N.A., Popkov A.V. Analiz prizhiznennoi otsenki bezopasnosti ispolzovaniia implantatov s bioaktivnym napyleniem [Analysis of intravital safety assessment of using implants with bioactive spraying]. *Vestnik Ulianovskoi Gosudarstvennoi Selskokhoziaistvennoi Akademii*, 2018, no. 3 (43), pp. 126-132. (in Russian)
4. Robey P.G. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect. Tissue Res.*, 1996, vol. 35, no. 1-4, pp. 131-136.
5. Kabirov G., Shakirova F., Manirambona J., Akhtyamov I., Gatina E., Tsiplakov D. Morphological Studies of Local Influence of Implants with Coatings Based on Superhard Compounds on Bone Tissue under Conditions of Induced Trauma. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ.*, 2015, vol. 41, no. 2, pp. 177-184.
6. Ahrens L.H. Shielding efficiency of cations. *Nature*, 1954, vol. 174, pp. 644-645.
7. Brooker M.H., Bredig M.A. Significance of both polarizability and polarizing power of cations in nitrate vibrational spectra. *J. Chem. Phys.*, 1973, vol. 58, pp. 5319-5327. DOI: 10.1063/1.1679146.
8. Mikenda W. IR study of cation effects on the O-D stretching frequencies of isotopically dilute HDO in aqueous salt solutions. *Chemical Monthly*, 1986, vol. 117, no. 8-9, pp. 977-984.
9. Schultze-Mosgau S., Keweloh M., Wiltfang I., Kessler P., Neukam F.W. Histomorphometric and densitometric changes in bone volume and structure after avascular bone grafting in the extremely atrophic maxilla. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2001, vol. 39, no. 6, pp. 439-447. DOI: 10.1054/bjom.2001.0617.
10. Barta C.A., Sachs-Barrable K., Jia J., Thompson K.H., Wasan K.M., Orvig C. Lanthanide containing compounds for therapeutic care in bone resorption disorders. *Dalton Trans.*, 2007, no. 43, pp. 5019-5030. DOI: 10.1039/b705123a.
11. Mawani Y., Cawthray J.F., Chang S., Sachs-Barrable K., Weekes D.M., Wasan K.M., Orvig C. In vitro studies of lanthanide complexes for the treatment of osteoporosis. *Dalton Trans.*, 2013, vol. 42, no. 17, pp. 5999-6011. DOI: 10.1039/c2dt32373g.
12. Fricker S.P. The therapeutic application of lanthanides. *Chem. Soc. Rev.*, 2006, vol. 35, no. 6, pp. 524-533.
13. Aerssens J., Boonen S., Lowet G., Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*, 1998, vol. 139, no. 2, pp. 663-670.
14. Issa J.P., Bentley M.V., Iyomasa M.M., Sebald W., De Albuquerque R.F. Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process. *Anat. Histol. Embryol.*, 2008, vol. 37, no. 3, pp. 181-187.
15. Urist M.R., Silverman B.F., Büring K., Dubuc F.L., Rosenberg J.M. The bone induction principle. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1967, vol. 53, pp. 243-283.
16. Deviatov F.V., Kholmogortsev E.G. *Sposob regeneratsii kostnoi tkani v eksperimente* [The way for regenerating bone tissue experimentally]. Patent RF, no. 2248210, 2003. (in Russian)
17. Deviatov F.V. *Sposob regeneratsii kostnoi tkani v eksperimente* [The way for regenerating bone tissue experimentally]. Patent Application RF, 2012119192/14, 2012. (in Russian)
18. Deviatov F.V. *Method for regenerating bone tissue*. EP2848250, 2012. European Patent Bulletin, 2016, 36, pp. 723.
19. Talashova I.A., Silanteva T.A., Kononovich N.A., Luneva S.N. Biosovmestimost kaltsii-fosfatnykh materialov biogennogo proiskhozhdeniia pri implantatsii v oblast defektov kostei sobak [Biogenic calcium phosphate materials implanted into canine bone defects and their biocompatibility]. *Genij Ortopedii*, 2016, no. 4, pp. 95-103. (in Russian)
20. Avtandilov G.G. *Meditsinskaia Morfometriia* [Medical morphometry]. M., Meditsina, 1990, 384 p. (in Russian)
21. Korzhhevskii D.E. *Kratkoe izlozhenie osnov gistologicheskoi tekhniki dlia vrachei I laborantov-gistologov* [Summary of the basics of histological technique for physicians and laboratory assistants-histologists]. SPb., Krof, 2005, 48 p. (in Russian)
22. Djachkova G.V., Stepanov R.V., Korabelnikov M.A., Bojchuk S.P., Suchodolova L.V., Obanina N.F. Computertomographie zur quantitative Bewertung der reparativen Knochenneubildung. *Chirurgische Allgemeine*, 2007, no. 1, pp. 35-37.
23. Lee S.H., Kim J.K., Jang H.D. Genistein inhibits osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells via regulation of ROS production and scavenging. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, vol. 15, no. 6, pp. 10605-10621. DOI: 10.3390/ijms150610605.
24. Maeda T., Matsunuma A., Kurahashi I., Yanagawa T., Yoshida H., Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J. Cell Biochem.*, 2004, vol. 92, no. 3, pp. 458-471.
25. Luppen C.A., Leclerc N., Noh T., Barski A., Khokhar A., Boskey A.L., Smith E., Frenkel B. Brief bonemorphogenetic protein 2 treatment of glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblasts rescues commitment-associated cell cycle and mineralization without alteration of Runx2. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 45, pp. 44995-45003.
26. Li I.W., Cheifetz S., McCulloch C.A., Sampath K.T., Sodek J. Effects of osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. *J. Cell Physiol.*, 1996, vol. 169, no. 1, pp. 115-125. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199610)169:1<115::AID-JCP12>3.0.CO;2-C.
27. Cortizo A.M., Sedlinsky C., McCarthy A.D., Blanco A., Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, vol. 536, no. 1-2, pp. 38-46. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.02.050.
28. Schiller P.C., D'Ippolito G., Roos B.A., Howard G.A. Anabolic or catabolic responses of MC3T3-E1 osteoblastic cells to parathyroid hormone depend on time and duration of treatment. *J. Bone Miner. Res.*, 1999, vol. 14, no. 9, pp. 1504-1512. DOI: 10.1359/jbmr.1999.14.9.1504.
29. Alexy T., Baskurt O.K., Nemeth N., Uyklu M., Wenby R.B., Meiselman H.J. Effect of lanthanides on red blood cell deformability and response to mechanical stress: role of lanthanide ionic radius. *Biorheology*, 2011, vol. 48, no. 3-4, pp. 173-183.

Рукопись поступила 06.05.2019

Сведения об авторах:

1. Бойчук Сергей Васильевич, д. м. н., профессор, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия, Email: boichuksergei@mail.ru
2. Житлова Елена Анатольевна, ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, г. Казань, Россия, Email: zhitlowa.elena@yandex.ru
3. Шакирова Фаина Владимировна, д. в. н., профессор, ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, г. Казань, Россия, Email: shakirova-fv@yandex.ru
4. Цыплаков Дмитрий Эдуардович, д. м. н., профессор, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия, Email: dr-allakazan@ya.ru
5. Ахтямов Ильдар Фуатович, д. м. н., профессор, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия, Email: yalta60@mail.ru
6. Девятков Федор Владимирович, д. х. н., профессор, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия, Email: feddev54@gmail.com
7. Рамазанов Булат Рашитович, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия, Email: bulatramazan@mail.ru
8. Закиров Рустем Хайдарович, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Email: Metsur@yandex.ru

Information about the authors:

1. Sergei V. Boichuk, M.D., Ph.D., Professor, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation, Email: boichuksergei@mail.ru
2. Elena A. Zhitlova, Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russian Federation, Email: zhitlowa.elena@yandex.ru
3. Faina V. Shakirova, Ph.D. of Veterinarian Sciences, Professor, Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russian Federation, Email: shakirova-fv@yandex.ru
4. Dmitrii E. Tsyplakov, M.D., Ph.D., Professor, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation, Email: dr-allakazan@ya.ru
5. Ildar F. Akhtyamov, M.D., Ph.D., Professor, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation, Email: yalta60@mail.ru
6. Fedor V. Deviatov, Ph.D. of Chemical Sciences, Professor, Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation, Email: feddev54@gmail.com
7. Bulat R. Ramazanov, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation, Email: bulatramazan@mail.ru
8. Rustem Kh. Zakirov, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation, Email: Metsur@yandex.ru