

<https://doi.org/10.35401/2500-0268-2021-21-1-47-55>© **А.Ш. Ананьева, Л.М. Бараева, И.М. Быков***,
Ю.В. Веревкина, А.Н. Курзанов

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОСТНЫХ СТРУКТУР В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА ЖИВОТНЫХ

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

✉ * И.М. Быков, Кубанский государственный медицинский университет, 350063, Краснодар, ул. М. Седина, 4,
ilya.bh@mail.ru

Поступила в редакцию 14 декабря 2020 г. Исправлена 2 февраля 2021 г. Принята к печати 4 февраля 2021 г.

В обзоре представлены преимущества и ограничения существующих моделей костных дефектов, которые используются для изучения новых технологий заживления поврежденных костных структур, а также тканеинженерных материалов и конструкций в экспериментах на животных. Рассматриваются требования к оптимальной животной модели, обсуждаются широко используемые модели повреждений кости *in vivo*. Приводятся краткие сведения о методах воспроизведения экспериментального повреждения длинных костей конечностей, свода черепа, челюстных костей различных животных и о способах стандартизации, позволяющих оценить процесс репаративного остеогенеза и трансформации имплантата, чтобы помочь исследователям в планировании и проведении научно обоснованных экспериментов с соблюдением существующих биоэтических требований.

Ключевые слова: регенеративная медицина, регенерация костной ткани, костный дефект, тканеинженерные конструкции, доклинические исследования, клиническая эффективность

Цитировать: Ананьева А.Ш., Бараева Л.М., Быков И.М., Веревкина Ю.В., Курзанов А.Н. Моделирование повреждений костных структур в экспериментах на животных. *Инновационная медицина Кубани*. 2021;(1):47–55. <https://doi.org/10.35401/2500-0268-2021-21-1-47-55>

© **Anna Sh. Ananeva, Liliya M. Baraeva, Iliya M. Bykov***,
Yulia V. Verevkina, Anatoliy N. Kurzanov

MODELING OF BONE INJURIES IN ANIMAL EXPERIMENTS

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

✉ * Iliya M. Bykov, Kuban State Medical University, ul. M. Sedina, 4, Krasnodar, 350063, ilya.bh@mail.ru

Received: 14 December 2020. Received in revised form: 2 February 2021. Accepted: 4 February 2021.

In this review, we discuss the advantages and disadvantages of the existing bone defect animal models and tissue engineering techniques applied in studying novel bone defect regenerative approaches. The paper suggests the requirements for an optimal animal model, as well as analyzes *in vivo* bone injury models widely used in testing. The authors briefly review the methods of experimentally produced lesions of long bones, calvarial bones, mandibular bones in different animals. This review also describes the standardization techniques allowing one to evaluate the process of osteogenesis and bone-implant interactions. That will help researchers thoroughly plan and conduct experiments according to the bioethical principles.

Keywords: regenerative medicine, bone regeneration, bone defect, tissue engineering construct, preclinical research, clinical efficacy

Cite this article as: Ananeva A.Sh., Baraeva L.M., Bykov I.M., Verevkina Yu.V., Kurzanov A.N. Modeling of bone injuries in animal experiments. *Innovative Medicine of Kuban*. 2021;(1):47–55. <https://doi.org/10.35401/2500-0268-2021-21-1-47-55>

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы, связанные с физиологией и патологией костной ткани, требуют использования широкого спектра новых модельных систем для развития регенеративной медицины. Разработка новых тактических подходов для восстановления костей должна производиться в условиях строгого соблюдения научной методологии. Модели на животных остаются золотым стандартом на доклинических этапах разработки.

Идеальная модель на животных имеет следующие характеристики: высокая воспроизводимость, возможность использования для оценки различных типов материалов и стратегий, актуальность для представляющей интерес клинической ситуации, возможность проведения нескольких типов анализа и обеспечение низкой заболеваемости и смертности животного до запланированной экспериментальной конечной точки. Другими практическими факторами



Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License.

оценки моделей являются время, необходимое для получения данных с соответствующей статистической мощностью, и связанные с этим затраты.

В настоящее время нет единой идеальной модели, позволяющей оценивать регенерацию костной ткани. Тем не менее наиболее эффективные модельные системы для исследования и развития костной регенерации должны соответствовать нескольким важным критериям: 1) обеспечивать среду, которая в максимально возможной степени соответствует клинической и биологической среде; 2) предоставлять объективные показатели для оценки успешности (количества и качества) и функциональных характеристик регенерированной костной ткани; 3) обнаруживать клинически значимые различия в биологических характеристиках методов (т. е. относительную частоту успеха).

Выбор модели зависит от цели эксперимента, опыта и предпочтений исследователей. Вместе с тем существуют этический, научный и экономический императивы, определяющие целесообразность стандартизации используемых моделей для уменьшения вариативности и, следовательно, уменьшения количества животных и необходимых ресурсов, а также увеличения достоверности полученных результатов. При выборе модели на животных следует учитывать несколько факторов: доступность и стоимость животного, простоту обращения и ухода, размер, приемлемость использования в экспериментах для общества, устойчивость к хирургическому вмешательству, инфекциям и болезням, сходство биологических свойств с человеческими, структуру и состав кости, характеристики моделирования и ремоделирования кости.

В регенеративной медицине существует множество подходов, обеспечивающих восстановление целостности структуры и/или костной массы. Во многих случаях репаративному формированию кости может способствовать использование тканеинженерных конструкций с четко определенными биологическими, структурными и механическими свойствами. Трансляция разработанных новых продуктов и технологий в клиническую практику требует проведения доклинических исследований с использованием экспериментальных моделей, имитирующих клинические проявления заболевания или состояния.

Исследования *in vivo* на животных моделях являются предпочтительной экспериментальной системой в биомедицинских исследованиях, связанных с костями, поскольку позволяют получать данные о физиологических и патологических состояниях, которые могут быть использованы для эффективного клинического применения. Биоэтические аспекты использования животных в экспериментах регламенти-

рованы обширным пулом национальных и международных документов.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ИЗУЧЕНИИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

Благодаря экспериментальным моделям на животных были разработаны и внедрены многие трансляционные подходы, направленные на регенерацию костной ткани. Исторические данные свидетельствуют о том, что мыши, крысы и кролики – наиболее часто используемые в экспериментальной остеологии виды животных. На эти три вида приходится приблизительно 80% всех животных, используемых для изучения восстановления костей. Ученые выяснили порядок относительной частоты использования различных видов животных в исследованиях восстановления переломов: крысы (38%), кролики (19), мыши (15), овцы (11), собаки (9), козы (4) и др. (4%) [1]. Эти данные свидетельствуют о важности использования грызунов в ортопедических исследованиях из-за высокой четкости моделей с биологической, генетической и иммунологической точек зрения, что позволяет достичь высокого уровня экспериментальной воспроизводимости.

У грызунов скелет продолжает расти и изменяться на протяжении всей жизни, содержание губчатой кости в костях ограничено, не происходит гаверсовского ремоделирования за счет туннелирования остеокластов. Эти факторы являются существенным недостатком при использовании грызунов как моделей изучения биологии костей человека. Однако процессы заживления переломов у них аналогичны сходным процессам у крупных млекопитающих. Мыши и крысы являются удобным видом для использования в экспериментальных исследованиях из-за наличия различных линий животных [2], в том числе с сильно ослабленным иммунитетом. Такие особи могут использоваться для приживления тканей человека. Дополнительными преимуществами использования грызунов являются небольшой размер, низкие затраты на приобретение и содержание, удобство в обращении и низкая общественная озабоченность этического плана. Однако с небольшим размером связана сложность хирургической техники.

Кролики – одни из наиболее часто используемых животных, применяются примерно в 35% научных исследований опорно-двигательного аппарата. Кролик удобен тем, что достигает скелетной зрелости после половой зрелости в возрасте около 6 месяцев. Кролики имеют относительно большую массу губчатой кости, которая демонстрирует гаверсовское ремоделирование. Однако состав костного мозга кро-

ликов по своим физическим свойствам существенно отличается от костного мозга человека, что делает этих животных нежелательными в качестве модели для трансплантации аутогенных костей и костного мозга. Кролики также чрезвычайно чувствительны к стимуляции глюкокортикоидами, что приводит к выраженной внутрикостной жировой гипертрофии и вторичному аваскулярному некрозу костей [3]. По сравнению с другими видами, такими как приматы и некоторые грызуны, у кролика отмечается значительное интракорткальное ремоделирование по Гаверсу [4]. Это может затруднить экстраполяцию результатов исследований, проведенных на кроликах, на вероятный клинический ответ у человека.

Подробные обзоры литературы, в которых сравниваются структура, состав и биология костей у собак, овец, коз и свиней, выявляют умеренные различия в плотности костной ткани и кортикальной кости в разных местах, различия в реакции на овариэктомию и ограничение содержания кальция в пище, величину полового диморфизма, возраст, в котором достигается пиковая костная масса, а также скорость и степень, в которой гаверсовское ремоделирование замещает плексиформную пластинчатую кость. Но ни один из видов животных не обладает скелетными или биомеханическими свойствами, идентичными человеческим.

При планировании экспериментальных исследований необходимо учитывать значительное количество факторов, влияющих на заживление поврежденных костных структур. Возраст, вес и пол животных влияют на минеральную плотность костной ткани, определяя потенциал заживления любого костного дефекта. Состав костных структур собаки, овцы, козы и свиньи во многом аналогичен костному составу человека [5]. Помимо практичности и других факторов, которые говорят в пользу использования крупных животных для изучения репаративной регенерации костей, есть и биологические причины. Примером этого являются различия в особенностях регенерации костей между мелкими и крупными животными. Это подтверждается тем, что каркасы из фосфата кальция редко демонстрируют остеоиндукцию на моделях грызунов, при этом успешно индуцируя рост костей у крупных животных [6].

Системные переменные факторы сильно влияют на результат восстановления и регенерации костей, определяя клиническую значимость и чувствительность используемой модели. Многие исследования продемонстрировали влияние на репаративный остеогенез эндокринных факторов, а также генотипических вариаций или лекарственных средств [7]. Следовательно, генетический фон и эндокринный статус становятся важными переменными при моделировании остеорепаративных процессов.

КОСТНЫЕ ДЕФЕКТЫ КРИТИЧЕСКОГО РАЗМЕРА

Существует множество вариантов моделей экспериментальных костных дефектов. Основными типами являются: дефект свода черепа, дефект длинной кости (сегментарный дефект), частичный кортикальный дефект и дефект губчатой кости.

При создании любой модели костного дефекта первостепенное значение имеет размер повреждения костной структуры. При небольших дефектах регенерация кости возможна на протяжении всего дефекта, поддерживаемая диффузией кислорода и питательных веществ с периферии. По мере увеличения размера дефекта диффузия быстро становится неэффективной. Достижение размера дефекта, при котором диффузия становится ограничивающим регенерацию кости обстоятельством, особенно важно при работе с имплантируемыми в дефект клетками, которые зависят от диффузии необходимых для выживания биоактивных факторов. В связи с этим при исследовании процессов репаративного остеогенеза особое внимание уделяется созданию дефектов критического размера (ДКР).

По классическому определению, ДКР – это дефект ткани наименьшего размера, который не полностью заживает в течение естественной жизни животного [8]. Поскольку заживление может включать образование фиброзной ткани, концепция ДКР была уточнена и теперь включает в себя любой дефект, регенерация которого составляет менее 10% в течение первого года заживления. Такой период считался показателем того, что сращения кости не ожидается в течение жизни животного, и этот дефект рассматривался как истинный ДКР [9]. Однако несколько исследователей показали, что исходное определение дефекта критического размера не вполне отражает суть его характеристик [10]. Поскольку продолжительность жизни животного в большинстве экспериментальных исследований ограничивается периодом исследования, в настоящее время предлагается рассматривать ДКР как наименьший размер дефекта, который не заживает спонтанно, если на него не воздействовать (не лечить) в течение определенного периода [11].

ДКР определяется не только размером, но и такими факторами, как возраст и вид животного, расположение дефекта, структура кости, наличие надкостницы, механическая нагрузка на кость, состояние метаболизма животного, применение фиксирующего устройства для обеспечения возможности скорейшего возвращения к подвижности. При этом дефекты критического размера следует противопоставлять дефектам, в которых патологический процесс, а не размер приводит к его несращению [12]. На сегодняшний день понимание ДКР в разных костях и у разных видов животных, используемых в эксперименте, остается неоднозначным.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕФЕКТОВ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ

Выбор конкретного вида животного для эксперимента имеет решающее значение и основан на биохимических и микроструктурных характеристиках костной ткани, а также на сходстве процессов заживления у животного и человека.

У грызунов из-за небольшого размера скелета используется в основном моделирование дефектов большеберцовой и бедренной костей. Принято считать, что размер дефекта должен быть в 2–2,5 раза больше диаметра диафиза длинной кости [13].

В большинстве моделей дефектов костных структур у мышей переломы большеберцовой или бедренной кости создаются с использованием устройства для трехточечного сгибания (закрытые модели) [14] или путем остеотомии с применением открытого хирургического доступа (открытые модели) [15]. Закрытый диафизарный перелом воспроизводят с использованием системы, включающей тупую гильотину с грузом 500 г [16]. В моделях открытого перелома бедренная кость повреждается под визуальным контролем [17]: после хирургического доступа к диафизу [18] перелом бедренной кости воспроизводится путем остеотомии или вручную после ослабления кости несколькими просверленными отверстиями [19].

Для исследования регенерации костной ткани после пластики различными материалами были представлены новые модели экспериментального дефекта кости на голени крысы [20]. Техника создания первой модели пустого монокортикального дефекта типа «полость»: после выполнения разреза кожи длиной 2,5 см по передней поверхности в средней трети голени непосредственно по краниальному краю большеберцовой кости рассекали фасцию, тупо отводили мышцы, распатором выделяли наружную поверхность большеберцовой кости на протяжении около 2 см. В средней трети большеберцовой кости просверливали два отверстия диаметром 1,5 мм в наружном кортикальном слое на расстоянии между ними около 9,5 мм. Отверстия соединяли между собой полотном осциллирующей пилы и получали монокортикальный дефект типа «полость» размером (11–12)×1,5×1,5 мм со вскрытым костномозговым каналом. Модель большого монокортикального дефекта большеберцовой кости крысы технически проста в исполнении, стабильно воспроизводится в серии, малотравматична и хорошо переносится животным, не нарушает нормальной опорно-двигательной функции конечности. Данную модель можно применять одномоментно на правой и левой большеберцовых костях у одного животного. При создании второй модели сегментарного дефекта использовали сетчатую титановую пластину «Конмет». По передней поверхности голени делали разрез кожи в средней трети длиной около 2,5–3 см.

Затем по краниальному краю большеберцовой кости рассекали фасцию, тупо отводили мышцы, распатором выделяли большеберцовую кость почти на всем протяжении диафиза. Надевали пластину на кость, при необходимости подгоняя ее по форме изгиба. Затем сверлом делали отверстия под винты через оба кортикальных слоя в средней и нижней трети голени через крайние отверстия пластины. В пределах центральной ячейки сетчатой пластины отмечали на кости границы предполагаемого дефекта, снимали пластину, после чего осциллирующей пилой резецировали намеченный сегмент большеберцовой кости длиной 2,5–5 мм. После резекции пластину надевали на прежнее место и фиксировали титановыми винтами. Преимущество данной модели состоит в малой травматичности, быстроте операционного доступа, простоте ухода за животным после операции [20].

Для оценки влияния А-PRP-терапии на репаративную регенерацию костной ткани была предложена модель оскольчатого перелома в средней трети голени кролика [21]. Дефект большеберцовой кости создавали при помощи проволочной витой пилы и долота, выполняя остеотомию в области диафиза большеберцовой кости.

Для изучения особенностей регенерации костной ткани в условиях применения клеточно-инженерной конструкции с целью восстановления костного дефекта у кролика исследователи моделировали дефект проксимальной метадиафизарной области большеберцовой кости, на которой фрезой формировали дефект надкостницы, кортикального слоя и губчатого вещества размерами 8,0×4,0 мм и глубиной 4,0 мм [22].

Была предложена модель сегментарного дефекта лучевой или локтевой кости предплечья кролика без фиксации проксимального и дистального отломков [23]. Эта модель была также использована одновременно на обеих передних конечностях животных в качестве опыта и контроля [24].

Несколько участков длинных костей овец были использованы для демонстрации сегментарных дефектов кости, включая проксимальную треть большеберцовой кости, шейку бедренной кости и плюсневую кость [25]. По результатам большинства исследований на овцах, ДКР большеберцовой кости в 2–2,5 раза превышает диаметр кости [26], но есть сообщения об использовании дефектов, трехкратно превышающих диаметр кости. Однако во многих исследованиях часто указывается длина дефекта, а не размер самой кости, поэтому неясно, действительно ли индуцированный дефект является ДКР.

Следует принять во внимание особенности цилиндрических дефектов в длинных костях. После закрытия отверстие дефекта перекрывается вышележащими мышцами или жиром. Основанием дефекта может быть костный мозг, кортикальная кость, мыш-

ца или жировая ткань. Из-за особенностей диффузии веществ и врастания сосудов, которые обычно ориентированы от периферии к центру дефекта, цилиндрические дефекты особенно хорошо подходят для ориентированных на время исследований скорости врастания кости или инвазии сосудов в имплант. Модель множественного дефекта бедренной кости собаки является одним из примеров усовершенствованной модели цилиндрического дефекта у крупного животного [27]. В отличие от большинства моделей на собаках данная модель предусматривает формирование четырех цилиндрических дефектов диаметром 10 мм и длиной 15 мм в проксимальном отделе левой бедренной кости, что позволяет сравнивать материалы и терапевтические стратегии.

Качество тканей внутри дефекта будет сильно зависеть от анатомического участка, вида и возраста животного. С возрастом у людей и животных увеличивается соотношение жирового и кровеносного костного мозга. Продемонстрировано, что скорость роста костей в дефектах бедренной и проксимальной большеберцовой кости диаметром 8, 11 и 14 мм выше у скелетно незрелых (18-месячных) овец по сравнению со скелетно зрелыми (5-летними) [28]. Однако исследователи часто отдают предпочтение молодым животным из-за их стоимости. Это может привести к недооценке эффективности стратегий тканевой инженерии, которые, скорее всего, будут применяться к пожилому населению после того, как будут переведены в клинические условия.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕФЕКТОВ ЧЕЛЮСТНЫХ КОСТЕЙ

Для оценки ДКР в несущей нагрузке кости, такой как нижняя челюсть, и ее заживления решающее значение имеют правильная фиксация и стабильность сегментарных дефектов.

Перед клиническими испытаниями материалы часто тестируются на приемлемую эффективность на более крупных доклинических моделях животных с сопоставимыми с людьми размером нижней челюсти и зубными рядами. Это позволяет быть более уверенными в том, что результаты могут быть транслированы в клинику.

Чтобы обеспечить строгую доклиническую оценку нового биоматериала для улучшения регенерации кости, его свойства тестируются на стандартизированной модели дефекта кости нижней челюсти критического размера. Эта модель представляет собой создание дефекта в области переднего зуба. Кроме того, доступный объем кости в области переднего зуба выше, чем у заднего зуба и в областях восходящей ветви. Обнаружено, что дефекты размером 6×2 и 8×2 мм соответствуют требованиям исследований регенерации кости. Это исследование представило

пошаговую стандартизированную модель дефекта кости с минимальным повреждением ткани у мелких животных [29].

Модели дефекта «частичной толщины» кости нижней челюсти кролика биомеханически стабильны, но недостаточно строги и не имеют прямого физиологического значения. В этих моделях регенерация кости индуцируется в областях, которые обычно содержат костный мозг [30].

Разработаны две доступные и воспроизводимые модели дефектов альвеолярной кости нижней челюсти кролика [31]. Первый тип дефекта в области премоляра/моляра «полной толщины» включал удаление кортикальной пластинки, промежуточной губчатой кости и корней зубов. Второй вариант дефекта «частичной толщины» предусматривал удаление только латеральной коры костной ткани, губчатой кости и корней зубов. Результаты показали, что ДКР может быть создан с помощью бикортикальной цилиндрической остэктомии диаметром 10 мм в области премоляров/моляров нижней челюсти кролика.

Показано, что бикортикальный дефект нижней челюсти диаметром 10 мм на всю толщину с удалением первого премоляра может соответствовать требованиям ДКР нижней челюсти у кроликов. Кроме того, регенерации кости и биомеханической стабильности нижней челюсти может способствовать удаление зубов, расположенных на стороне дефекта [32].

Для эффективного внедрения результатов в клиническую практику провели экспериментальное исследование с целью определить размер костного дефекта в нижней части тела нижней челюсти, а затем установить, функционирует ли трехстенный зубчатый дефект как ДКР при прижигании краев кости. Дефект размером 12×5 мм зажил спонтанно в течение 6 недель, затем было применено прижигание краев дефекта. Прижигание краев дефекта приводит к задержке роста кости и очевидному увеличению остатков ткани на краях дефекта. Оно ограничивает инфильтрацию сосудов от краев костей и задерживает привлечение популяций стволовых клеток к месту дефекта [33]. Однако даже после ингибирования роста костей регенерированная кость увеличивалась с 6 до 12 недель, достигая уровня, аналогичного уровню не подвергнутой прижиганию кости через 6 недель. Оценка регенерации кости в месте дефекта показала, что значительная регенерация кости произошла в течение 6 недель в дефекте размером в 180 мм³, когда края дефекта не прижигали, и в течение 12 недель, когда края дефекта прижигали. Таким образом, в отличие от других сообщений о дефектах 180 мм³, считающихся критическими [34], этот размер дефекта не соответствовал необходимым критериям для использования в качестве ДКР в нижней челюсти кролика. Вопреки многочисленным литературным сообщени-

ям, в дальнейшем обнаружилось, что дефект размером 12×5 мм является биомеханически стабильным и не может считаться ДКР даже при прижигании. Потенциальным применением этой модели может быть оценка терапевтических средств регенерации костей, которые ускоряют повторный рост кости, а не просто успех или неудачу терапии.

Собаки широко использовались для изучения заживления костной ткани при дефектах нижней челюсти. Был проведен систематический обзор общих характеристик ДКР среди исследований, проводимых на экспериментальной модели собак [35]. Во всех исследованиях проанализировано формирование объема кости в изученных гистологических срезах, охарактеризована разница по сравнению с контрольными участками, а также степень полного заживления дефектов. По результатам систематического обзора констатируется, что данные по ДКР в нижней челюсти собаки неоднородны и в будущие исследования на животных следует включать группу отрицательного контроля для объективного сравнения.

Из-за растущего нежелания использовать животных-компаньонов для доклинических исследований и резких различий между жевательной биомеханикой овец/коз и людей предпочтение отдается моделям ДКР нижней челюсти у свиней. Преимущество свиных состоит в том, что ее нижняя челюсть похожа на нижнюю челюсть человека [36]. Свиная кость демонстрирует сходство с человеческой костью по составу и минеральной плотности, характеристикам ремоделирования и заживления. В ряде исследований в качестве ДКР был выбран дефект размером 5 см³ для оценки потенциала заживления кости при различных методах лечения [37]. Однако в другом исследовании допускается, что дефект объемом 5 см³ может быть недостаточным, чтобы его можно было определить как ДКР. Показано, что резецирование костного блока (~10,1 см³) в передней альвеолярной области с сохранением надкостницы демонстрирует спонтанную регенерацию дефекта посредством нормальной физиологической реакции, и констатируется, что 2–3 дефекта стенки от 2 до 10 см³ со слизисто-надкостничным покрытием на переднем альвеолярном гребне необязательно критичны [38].

Исследовано заживление хирургически созданного дефекта нижней челюсти объемом 6 см³ с прилегающей надкостницей у миниатюрных свиней [39]. Авторы предположили, что эта модель имитирует аналогичную травму нижней челюсти человека и не заживет самопроизвольно.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕФЕКТОВ КОСТЕЙ СВОДА ЧЕРЕПА

Модель дефекта свода черепа является популярной в основном по следующим причинам: структура

кости свода черепа позволяет создать однородный, воспроизводимый и стандартизованный дефект, который легко оценить с помощью рентгенологического и гистологического анализа; твердая мозговая оболочка и покрывающая ее кожа создают адекватную опору для имплантированных материалов без необходимости фиксации; эта модель позволяет точно сравнивать имплантированные вещества и конструкции.

Одним из недостатков модели дефекта черепа является невозможность оценить биологический ответ на имплантированный материал и эффективность тканеинженерных конструкций при физиологических биомеханических нагрузках, что важно для клинических перспектив их применения с целью регенерации несущих нагрузку костей [40].

Цилиндрические дефекты в лобной или теменной кости мыши [41], крысы [42] и кролика во многих случаях были основными инструментами скрининга для оценки многих биоматериалов. Моделирование дефектов кости в области черепных швов обычно избегают. Это позволяет с высокой степенью воспроизводимости позиционировать имплант, который точно соответствует дефекту, обычно без внутренней фиксации. При создании дефекта без трансплантата твердая мозговая оболочка и вышележащие мягкие ткани будут вторгаться в дефект и нарушать регенерацию кости, что делает эту модель чувствительной к характеристикам материалов каркаса, даже если они просто обеспечивают механическую целостность. Модель ДКР свода черепа у крыс [43] и кроликов [44] обычно используется для оценки безопасности терапии перед оценкой эффективности терапии на более крупных моделях животных, например собаках [45] или свиньях [39].

Хорошо известно, что твердая мозговая оболочка играет важную роль в заживлении дефектов свода черепа. Она, по-видимому, является основным источником остеогенных клеток и остеоиндуктивных факторов. Хирургические методы с использованием трепана могут легко повредить или разрушить твердую мозговую оболочку, лежащую в основе дефекта. Следовательно, на заживление дефекта свода черепа может повлиять не только размер дефекта, но и способ его создания.

МЕТОДЫ ВЕРИФИКАЦИИ СОСТОЯНИЯ ПРОЦЕССА РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОСТНЫХ СТРУКТУР

Основываясь на физических свойствах кости, во многих исследованиях оценивают результирующие эффекты репаративной регенерации костной ткани путем измерения объема кости, образования и плотности минерализованной ткани с использованием рентгеновского анализа или компьютерной томографии. Однако кость – это больше чем просто минера-

лизованная ткань. Оценка других параметров необходима для получения полного описания качества кости. Гистологические методы также обычно используются для исследования репаративного остеогенеза и минерализации ткани, идентификации клеточных компонентов, интеграции имплантата с реципиентом, а также воспалительного ответа на имплантированную тканеинженерную конструкцию. Вместе эти методы могут обеспечить всестороннюю оценку тканеинженерной кости и эффективности ее использования в восстановлении целостности костной структуры.

Иммуногистохимия и гибридизация *in situ* могут дополнительно уточнить характеристики клеточных фенотипов на основе локального матрикса, маркеров клеточной поверхности, внутриклеточных маркеров и экспрессии генов.

Механические характеристики во многих случаях являются окончательным критерием успеха инженерии костной ткани. Механическая интеграция новой костной ткани с прилегающей костью и мягкими тканями или с имплантатом важна для многих клинических применений [46]. В целом анализ заживления кости включает различные методы визуализации, а также гистологические, иммуногистохимические, биомеханические и молекулярные методы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя ни один вид животных не отвечает идеальным требованиям моделирования дефектов костных структур для изучения репаративного остеогенеза, понимание различий в макро-, микроскопических и ремоделирующих характеристиках костной ткани улучшает выбор видов животных и интерпретацию результатов этих исследований.

Более крупные животные используются для изучения тканевой инженерии кости, восстановления дефектов критического размера и биомеханических испытаний; модели на мелких животных предпочтительны для фундаментальных исследований и скрининговых экспериментов. Более того, когда анализируют перспективы экстраполяции результатов экспериментов для возможного клинического применения, модели на грызунах не позволяют убедиться в эффективности тканеинженерных подходов из-за существенно различающихся физиологических характеристик нагрузки на скелет грызунов и человека.

Каждая экспериментальная модель дефектов костных структур обладает уникальными преимуществами и недостатками. Результативность доклинического моделирования дефектов костных структур зависит от воспроизводимости, чувствительности, специфичности используемых моделей, их биомеханической и биологической значимости. Ни в одной модели дефектов костных структур на животных не могут быть получены данные, идентичные характеристикам про-

цессов при аналогичных повреждениях у человека.

Завышенная оценка клинической эффективности также является предсказуемым явлением. В настоящее время доступно несколько различных технологических стратегий, которые позволяют достичь практически 100%-го успеха в доклинических исследованиях, но демонстрируют значительную частоту неудач при попытках их трансляции в клинику.

Несмотря на множество исследований, окончательный консенсус по стандартизации моделей костных дефектов на животных пока не достигнут. Стандартизация доклинических модельных исследований может стать ключом к систематическому продвижению новых методов оптимизации репаративного остеогенеза в будущем.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(suppl 1):79–84. PMID: 18292361. <https://doi.org/10.2106/JBJS.G.01585>
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420(6915):520–562. PMID: 12466850. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Kabata T, Kubo T, Matsumoto T, et al. Onset of steroid-induced osteonecrosis in rabbits and its relationship to hyperlipaemia and increased free fatty acids. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(10):1233–1237. PMID: 15972352. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh721>
- Castañeda S, Largo R, Calvo E, et al. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol*. 2006;35(1):34–41. PMID: 16247642. <https://doi.org/10.1007/s00256-005-0022-z>
- Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*. 1995;16(suppl 4):277S–284S. PMID: 7626315. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(95\)80121-9](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(95)80121-9)
- Barradas AMC, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater*. 2011;21:407–429; discussion 429. PMID: 21604242. <https://doi.org/10.22203/ecm.v021a31>
- Reinwald S, Burr D. Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. *J Bone Miner Res*. 2008;23(9):1353–1368. PMID: 18505374. PMID: PMC2683153. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080516>
- Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg*. 1982;196(1):100–109. PMID: 7092346. PMID: PMC1352505. <https://doi.org/10.1097/0000658-198207000-00020>
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990;1(1):60–68. PMID: 19655154. <https://doi.org/10.1097/00001665-199001000-00011>
- Gosain AK, Song L, Yu P, et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(2):360–371; discussion 372. PMID: 10946935. <https://doi.org/10.1097/00006534-200008000-00018>
- Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the “critical size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect

- (CSD). *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(6):1685–1692. PMID: 20517092. PMCID: PMC2946111. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3>
12. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;367:S59–S67. PMID: 10546636. <https://doi.org/10.1097/00003086-199910001-00007>
 13. Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res.* 2006;24(7):1438–1453. PMID: 16732617. <https://doi.org/10.1002/jor.20154>
 14. Cottrell JA, O'Connor JP. Pharmacological inhibition of 5-lipoxygenase accelerates and enhances fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(11):2653–2665. PMID: 19884440. <https://doi.org/10.2106/jbjs.h.01844>
 15. Claes L, Blakytyn R, Göckelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res.* 2009;27(1):22–27. PMID: 18634011. <https://doi.org/10.1002/jor.20712>
 16. Barkhausen T, Probst C, Hildebrand F, Pape HC, Krettek C, van Griensven M. Insulin therapy induces changes in the inflammatory response in a murine 2-hit model. *Injury.* 2009;40(8):806–814. PMID: 19167710. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.07.018>
 17. Holstein JH, Garcia P, Histing T, et al. Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma.* 2009;23(suppl 5):S31–S38. PMID: 19390374. <https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e31819f27e5>
 18. Hanratty BM, Ryaby JT, Pan XH, Li G. Thrombin related peptide TP508 promoted fracture repair in a mouse high energy fracture model. *J Orthop Surg Res.* 2009;4:1. PMID: 19175943. PMCID: PMC2649908. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-4-1>
 19. Garcia P, Holstein JH, Histing T, et al. A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing. *J Biomech.* 2008;41(8):1689–1696. PMID: 18462739. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.03.010>
 20. Мигулева И.Ю., Савотченко А.М., Петухова М.Н. и др. Две новые модели экспериментального дефекта кости на голени крысы для исследования регенерации костной ткани после пластики различными материалами. *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии.* 2015;2(53):34–45.
Miguleva IYu, Savotchenko AM, Petukhova MN, et al. Two original rat tibial bone defect models for the purpose of bone formation and healing process investigations after any graft or bone substitute material implanted. *Voprosy rekonstruktivnoy i plasticheskoy khirurgii = Issues of Reconstructive and Plastic Surgery.* 2015;2(53):34–45. (In Russ.).
 21. Блаженко А.Н., Родин И.А., Понкина О.Н. и др. Влияние А-PRP-терапии на репаративную регенерацию костной ткани при свежих переломах костей конечностей. *Инновационная медицина Кубани.* 2019;3(15):32–38. <https://doi.org/10.35401/2500-0268-2019-15-3-32-38>
Blazhenko AN, Rodin IA, Ponkina ON, et al. The effect of A-PRP-therapy on reparative regeneration of bone tissue with acute bone fractures of the limbs. *Innovatsionnaya meditsina Kubani = Innovative Medicine of Kuban.* 2019;3(15):32–38. (In Russ.). <https://doi.org/10.35401/2500-0268-2019-15-3-32-38>
 22. Живцов О.П., Алейник Д.Я., Орлинская Н.Ю., Митрофанов В.Н. Особенности регенерации костной ткани в условиях применения клеточно-инженерной конструкции для восстановления костного дефекта у кролика. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2019;11:54–59. <https://doi.org/10.17513/mjpf.12931>
Zhivtsov OP, Aleynik DYa, Orlinkaya NYu, Mitrofanov VN. Peculiarities of bone tissue regeneration in conditions of a cell engineering construction for restoring bone defect in a rabbit. *International Journal of Applied and Fundamental Research.* 2019;11:54–59. (In Russ.). <https://doi.org/10.17513/mjpf.12931>
 23. Seeherman HJ, Azari K, Bidic S, et al. rhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(7):1553–1565. PMID: 16818982. <https://doi.org/10.2106/JBJS.E.01006>
 24. Kang S-H, Chung Y-G, Oh I-H, Kim Y-S, Min K-O, Chung J-Y. Bone regeneration potential of allogeneic or autogeneic mesenchymal stem cells loaded onto cancellous bone granules in a rabbit radial defect model. *Cell Tissue Res.* 2014;355(1):81–88. PMID: 24169864. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1738-z>
 25. Christou C, Oliver RA, Pelletier MH, Walsh WR. Ovine model for critical-size tibial segmental defects. *Comp Med.* 2014;64(5):377–385. PMID: 25402178. PMCID: PMC4236786.
 26. Gugala Z, Lindsey RW, Gogolewski S. New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones. *Macromol Symp.* 2007;253:147–161. <https://doi.org/10.1002/masy.200750722>
 27. Takigami H, Kumagai K, Latson L, et al. Bone formation following OP-1 implantation is improved by addition of autogenous bone marrow cells in a canine femur defect model. *J Orthop Res.* 2007;25(10):1333–1342. PMID: 17551968. <https://doi.org/10.1002/jor.20411>
 28. Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Christou C, Walsh WR. A sheep model for cancellous bone healing. *Front Surg.* 2014;1:37. PMID: 25593961. PMCID: PMC4286987. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2014.00037>
 29. Liu G, Guo Y, Zhang L, et al. A standardized rat burr hole defect model to study maxillofacial bone regeneration. *Acta Biomater.* 2019;86:450–464. PMID: 30605772. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.049>
 30. Liu H-Y, Liu X, Zhang L-P, Ai H-J, Cui F-Z. Improvement on the performance of bone regeneration of calcium sulfate hemihydrate by adding mineralized collagen. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(6):2075–2084. PMID: 20136401. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0669>
 31. Young S, Bashoura AG, Borden T, et al. Development and characterization of a rabbit alveolar bone nonhealing defect model. *J Biomed Mater Res.* 2008;86(1):182–194. PMID: 17969052. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31639>
 32. Cheng G, Li Z, Wan Q, et al. A novel animal model treated with tooth extraction to repair the full-thickness defects in the mandible of rabbits. *J Surg Res.* 2015;194(2):706–716. PMID: 25491176. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.11.010>
 33. Regan JD, Witherspoon DE, Foyle D. Surgical repair of root and tooth perforations. *Endodontic Topics.* 2005;11(1):152–178. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2005.00183.x>
 34. Ye L, Zeng X, Li H, Wang Z. Fabrication and biocompatibility of porous bioactive scaffold of nonstoichiometric apatite and poly(ϵ -caprolactone) nanocomposite. *J Appl Polym Sci.* 2010;116:762–770. <https://doi.org/10.1002/app.31466>
 35. Marei HF, Mahmood K, Almas K. Critical size defects for bone regeneration experiments in the dog mandible: a systematic review. *Implant Dent.* 2018;27(1):135–141. PMID: 29283895. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000713>
 36. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007;13:1–10. PMID: 17334975. <https://doi.org/10.22203/ecm.v013a01>
 37. Henkel KO, Gerber T, Lenz S, Gundlach KK, Bienengraber V. Macroscopic, histological, and morphometric

studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(5):606–613. PMID: 17052636. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.10.034>

38. Ruehe B, Niehues S, Heberer S, Nelson K. Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(5):699–706. PMID: 19782620. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.06.037>

39. Carlisle PL, Guda T, Silliman DT, Lien W, Hale RG, Brown Baer PR. Investigation of a pre-clinical mandibular bone notch defect model in miniature pigs: clinical computed tomography, micro-computed tomography, and histological evaluation. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2016;42(1):20–30. PMID: 26904491. PMCID: PMC4761569. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2016.42.1.20>

40. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 2011;45(1):14–24. PMID: 21156759. <https://doi.org/10.1258/la.2010.010085>

41. Gupta DM, Kwan MD, Slater BJ, Wan DC, Longaker MT. Applications of an athymic nude mouse model of nonhealing critical-sized calvarial defects. *J Craniofac Surg.* 2008;19(1):192–197. PMID: 18216688. <https://doi.org/10.1097/scs.0b013e31815c93b7>

42. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J.* 2009;28(4):396–400. PMID: 19721275. <https://doi.org/10.4012/dmj.28.396>

43. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):879–893. PMID: 23742162. <https://doi.org/10.1111/clr.12194>

44. Guda T, Darr A, Silliman DT, et al. Methods to analyze bone regenerative response to different rhBMP-2 doses in rabbit craniofacial defects. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014;20(9):749–760. PMID: 24422668. PMCID: PMC4152791. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2013.0581>

45. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(1):56–59. PMID: 14690660. <https://doi.org/10.1054/ijom.2003.0466>

46. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):123–145. PMID: 19891542. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0658>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ананьева Анна Шамильевна, аспирант кафедры фундаментальной и клинической биохимии, Кубанский государственный медицинский университет (Краснодар, Россия). <https://orcid.org/0000-0002-2927-2734>

Бараева Лилия Максимовна, соискатель кафедры фундаментальной и клинической биохимии, ассистент кафедры нормальной анатомии, Кубанский государственный медицинский университет (Краснодар, Россия). <https://orcid.org/0000-0002-5161-3152>

Быков Илья Михайлович, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, Кубанский государственный медицинский университет (Краснодар, Россия). <https://orcid.org/0000-0002-1787-0040>

Веревкина Юлия Владимировна, аспирант кафедры терапевтической стоматологии, Кубанский государственный медицинский университет (Краснодар, Россия). <https://orcid.org/0000-0003-3948-6960>

Курзанов Анатолий Николаевич, д. м. н., профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии, Кубанский государственный медицинский университет (Краснодар, Россия). <https://orcid.org/0000-0002-0566-256X>

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CREDENTIALS

Anna Sh. Ananeva, PhD Student, Department of Basic and Clinical Biochemistry, Kuban State Medical University (Krasnodar, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0002-2927-2734>

Liliya M. Baraeva, External PhD Student, Department of Basic and Clinical Biochemistry, Assistant Professor, Department of General Anatomy, Kuban State Medical University (Krasnodar, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0002-5161-3152>

Ilya M. Bykov, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Basic and Clinical Biochemistry, Kuban State Medical University (Krasnodar, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0002-1787-0040>

Yulia V. Verevkina, PhD Student, Department of Dental Therapy, Kuban State Medical University (Krasnodar, Russian Federation). <https://orcid.org/0000-0003-3948-6960>

Anatoliy N. Kurzanov, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Department of Basic and Clinical Biochemistry, Kuban State Medical University (Krasnodar, Russia). <https://orcid.org/0000-0002-0566-256X>

Funding: the study was not sponsored.

Conflict of interest: none declared.