

УДК 616.718.41-021.4-002.4-018-092.4

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-1-71-79>

# ВОЗМОЖНОСТИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ТЕЧЕНИИ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ШАБАЛДИН Н.А.<sup>1\*</sup>, ШАБАЛДИН А.В.<sup>1</sup>, ПЛОХИХ Д.А.<sup>3</sup>, СИНЦКАЯ А.В.<sup>2</sup>, МУХАМАДИЯРОВ Р.А.<sup>2</sup>, БОГДАНОВ Л.А.<sup>2</sup><sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» г. Кемерово, Россия<sup>3</sup> ГАУЗ КО «Кузбасская областная детская клиническая больница им. Ю.А. Атаманова», г. Кемерово, Россия

## Резюме

**Цель.** Провести гистологическое исследование головки бедренной кости, анализ эффективности методик световой, электронной микроскопии у крыс линии Вистар после хирургической индукции асептического некроза.

**Материалы и методы.** Выполнен модельный эксперимент на 12 крысах линии Вистар, в ходе которого проводилась хирургическая индукция асептического некроза головки бедренной кости. Животные выводились из эксперимента по 3 особи каждые 2 недели в течение 8 недель, с экстирпацией бедренной кости со стороны асептического некроза и с условно-здоровой в качестве сравнения. Исследовалась головка бедренной кости с использованием рентгенографии, а также гистологии при помощи световой микроскопии с окрашиванием гематоксилин-эозином, электронной сканирующей микроскопии.

**Результаты.** Рентгенологическая, гистологическая картины отображали прогрессирующее развитие остеорезорбции от 2 к 6 неделе, активацию остеорепаративных процессов на 8 недели эксперимента. Наименее информативной оказалась рентгенография в виду малого размера исследуемого объекта. Гистологическое исследование при помощи световой микроскопии отображало прогрессирующую потерю объема костных балок в следствие остеолитического, истончение гиалинового хряща, замещения костной,

хрящевой ткани плотными фиброзными разрастаниями. Сканирующая электронная микроскопия позволила оценить клеточный состав, определить максимальную активность остеокластов на 6 недели эксперимента, остеобластов на 8 неделе, деструктивные изменения ядер хондроцитов с 6 недели эксперимента.

**Заключение.** Наименее эффективным видом обследования оказалась рентгенография, в виду малого размера исследуемого объекта. Гистологическое исследование при использовании световой микроскопии, окрашивании препарата головки бедренной кости гематоксилин-эозином позволило определить не только количественные, но и качественные признаки развития остеорезорбции. Применение сканирующей электронной микроскопии способствовало более эффективной визуализации клеточного состава кости.

**Ключевые слова:** асептический некроз, гистологическое исследование, сканирующая электронная микроскопия.

## Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

## Источник финансирования

Исследование выполнено за счет финансирования Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, МК-4132.2022.3

## Для цитирования:

Шабалдин Н.А., Шабалдин А.В., Плехих Д.А., Синицкая А.В., Мухамадияров Р.А., Богданов Л.А. Возможности гистологического исследования при течении асептического некроза головки бедренной кости в эксперименте. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2023;8(1): 71-79. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-1-71-79>

## \*Корреспонденцию адресовать:

Шабалдин Никита Андреевич, 650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а, E-mail: shabalдин.nk@yandex.ru  
© Шабалдин Н.А. и др.

## ORIGINAL RESEARCH

STRUCTURAL EXAMINATION OF EXPERIMENTAL  
FEMORAL HEAD AVASCULAR NECROSIS

NIKITA A. SHABALDIN<sup>1</sup>\*, ANDREY V. SHABALDIN<sup>1</sup>, DMITRY A. PLOKHIKH<sup>3</sup>, ANNA V. SINITSKAYA<sup>2</sup>,  
RINAT A. MUKHAMADIYAROV<sup>2</sup>, LEO A. BOGDANOV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

<sup>2</sup>Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

<sup>3</sup>Kuzbass Regional Children's Clinical Hospital, Kemerovo, Russian Federation

## English ►

## Abstract

**Aim.** To conduct histological analysis of femoral head avascular necrosis in Wistar rats.

**Materials and Methods.** Femoral head avascular necrosis was artificially induced in 12 Wistar rats which have been euthanised at 2, 4, 6, and 8 weeks postoperation (n = 3 per time point). Affected and intact femoral heads were examined by X-ray examination, haematoxylin and eosin staining, and scanning electron microscopy.

**Results.** X-ray examination and haematoxylin and eosin staining showed the progressive development of osteonecrosis from 2 to 6 weeks and initiation of bone repair at 8 weeks postoperation. X-ray examination had less informative value as compared to routine histological examination. Progressive loss of bone volume was accompanied by osteolysis, resorption of hyaline cartilage, and replacement of bone and cartilage tissues with collagen fibers. Scanning electron microscopy

provided an opportunity to assess cellular composition and showed that the maximum activity of osteoclasts and osteoblasts occurs at 6 and 8 weeks postoperation, respectively.

**Conclusion.** X-ray examination was dispensable when investigating features of femoral head avascular necrosis. Histological examination using haematoxylin and eosin staining permitted detection of bone resorption, while scanning electron microscopy contributed to high-resolution visualisation of the bone cellular composition.

**Keywords:** aseptic necrosis, histological examination, scanning electron microscopy.

**Conflict of Interest**

None declared.

**Funding**

The research was carried out by funding the grant of the "President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – Candidates of Sciences", MK-4132.2022.3

**For citation:**

Nikita A. Shabaldin, Andrey V. Shabaldin, Dmitry A. Plokhikh, Anna V. Sinitskaya, Rinat A. Mukhamadiyarov, Leo A. Bogdanov. Structural examination of experimental femoral head avascular necrosis. *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.). 2023;8(1): 71-79. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-1-71-79>

**\*Corresponding author:**

Dr. Nikita A. Shabaldin, 22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation, E-mail: shabaldin.nk@yandex.ru

© Nikita A. Shabaldin, et al.

## Введение

Асептический некроз головки бедренной кости представляет собой стадийный процесс развития остеодеструкции с последующим ремоделированием, приводящим в ряде случаев к формированию дисконгруэнтности в тазобедренном суставе [1]. В основе манифестации аваскулярного некроза лежит нарушение кровообращения проксимального отдела бедра с созданием зоны локальной ишемии. Гипоперфузия приводит к нарушению регуляции ра-

боты сигнальных путей, регулирующих костный гомеостаз [2]. Однако природа сосудистого коллапса, особенности сигналинга остеокластогенеза, остеобластогенеза в течении асептического некроза остаются до конца не известными. При этом ведётся активная научно-исследовательская работа, в том числе экспериментальная, с использованием лабораторных животных по исследованию патогенеза остеодеструктивных процессов в головке бедренной кости [3].

Течение аваскулярного некроза характеризуется изменениями костной, хрящевой ткани в зависимости от стадии патологического процесса. Гистологическое исследование играет ведущую роль в диагностике остеодеструкции, хондродеструкции, активности процессов остеорезорбции, остеорепарации, идентификации клеток костной, хрящевой тканей [4]. Большое значение имеют методики фиксации, декальцинации, окрашивания препарата. Наиболее часто используется рутинная световая микроскопия с окраской гематоксилин-эозином, позволяющая визуализировать костные трабекулы, сосудистый компонент, гиалиновый хрящ и др. При этом гистологическое исследование имеет ряд преимуществ над рентгенографическим, таких как возможность изучения конкретной зоны интереса, большая детальность исследования [5].

Наряду с этим определенного распространения достигла методика сканирующей электронной микроскопии в экспериментальных исследованиях костной ткани. Преимуществами представленного метода являются большая разрешающая способность, кратность увеличения [6]. Тем не менее, трудности в подготовке материала для изучения обусловили ограниченность применения сканирующей электронной микроскопии в клинической практике.

В исследовательской деятельности крайне важное значение имеют: диагностика характера изменений костной, хрящевой ткани, динамическое наблюдение за течением деструктивных, репаративных процессов, оценка эффективности медикаментозных, хирургических способов лечения. Для этого в экспериментальных работах применяются различные методики обследования полученных препаратов, при этом их диагностическая ценность различная.

## Цель исследования

Провести гистологическое исследование головки бедренной кости, анализ эффективности методик световой, электронной микроскопии у крыс линии Wistar после хирургической индукции асептического некроза.

## Материалы и методы

Проведен модельный эксперимент на 12 самцах крыс линии Wistar, массой тела 250 гр.  $\pm$  25 г, возрастом 3 мес. Эксперимент выполнялся согласно «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Сове-

том Европы (Strasbourg, Франция, 1986) и Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях».

С целью индукции аваскулярного некроза головки бедренной кости всем животным под ингаляционным наркозом изофлурана проведены хирургические манипуляции в виде наложения плотной лигатуры вокруг шейки бедренной кости, что создало зону гипоперфузии, а также введения в полость сустава 1,5 мл 10% раствора реополиглюкина для увеличения внутрисуставного давления. Крысы выводились из эксперимента путем декапитации каждые 2 недели в течении 8 недель по 3 особи.

Проводились рентгенологическое, гистологическое исследования с окраской гематоксилин эозином, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). При этом оценивалась головка бедренной кости со стороны манифестации асептического некроза, а также с условно-здоровой в качестве сравнения.

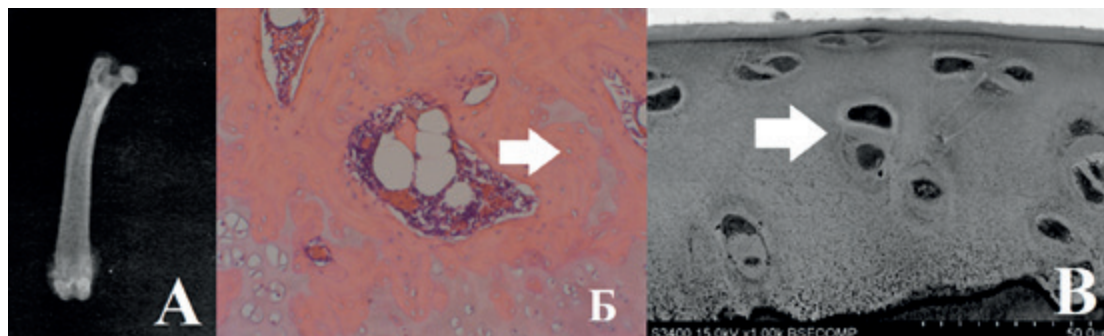
После экстирпации бедренных костей выполнялась рентгенография с подсчетом эпифизарного индекса, который определяется как соотношение высоты эпифиза головки бедренной кости к ширине.

Головки бедренных костей подвергали мягкой декальцификации в 14% растворе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) на протяжении 10 дней, после чего промывали водопроводной водой 2 часа и нарезали на замораживающем микротоме Thermo Scientific NX 50 толщиной 5 мкм, полученные срезы хранили в морозильной камере при температуре - 60°C до востребования. Для оценки общего состояния тканей выполняли окрашивание гематоксилином и эозином, для этого срезы отмывали в бидистиллированной воде в течение 15 минут и далее проводили окрашивание по модифицированному протоколу производителя: ядра контрастировали гематоксилином Майера (DiaPath, Италия) на протяжении 10 минут, затем производили подсинение в проточной воде 5 минут, инкубировали в водно-спиртовом растворе эозина (DiaPath, Италия) в течение 1 минуты, обезвоживали в 3 сменах 95% этанола по 15 секунд в каждой, просветляли в ксилоле в течение 3 минут и заключали под покровное стекло при помощи монтирующей среды Diamount на основе лимонена (DiaPath, Италия).

**Рисунок 1.**

Результаты исследований головки бедренной кости через 2 недели после хирургической индукции асептического некроза. А) Рентгенография: сохранение высоты эпифиза на фоне снижения костной плотности; Б) Световая микроскопия, окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$ . Стрелочкой указаны дистрофические изменения пластины роста; В) Электронная микроскопия, увеличение  $\times 1000$ . Стрелочкой указано сохранение строения ядра хондроцитов.

**Figure 1.** Examination of femoral head avascular necrosis 2 weeks postoperation. A) X-rat examination reveals retained height of the epiphysis and reduced bone density; B) Light microscopy, haematoxylin and eosin staining,  $\times 200$  magnification. The arrow indicates dystrophy of the growth plate; C) Scanning electron microscopy, magnification  $\times 1000$ . The arrow indicates preserved nuclei of chondrocytes.



Готовые микропрепараты анализировали при помощи светового микроскопа (Axiolmager. A1, Carl Zeiss) на увеличениях  $\times 200$  и  $\times 400$ . Для оценки морфометрических параметров использовалась программа ImageJ.

Исследование эксплантированных образцов костной ткани проводили по оригинальной методике EM-BSEM [7]. Образцы фиксировались в формалине в течение первых суток, затем выполнялась постфиксация 1% тетраоксидом осмия в 0,1М фосфатном буфере и окрашивались 2% тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 часов. Далее образцы обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации, окрашивали 2% уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95% этаноле, обезживали 99,7% изопропанолом (BioVitrum, Россия) в течение 5 часов и ацетоном (Реахим, Россия) в течение 1 часа, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1:1 (6 часов), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 часа) и далее проводили её полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при  $60^{\circ}\text{C}$ . После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США). Контрастирование цитратом свинца проводили по Рейнольдсу в течение 7 минут путём нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10–15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Визуализацию структуры образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в обратно-рассеянных электронах проводили на электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 15 кВ.

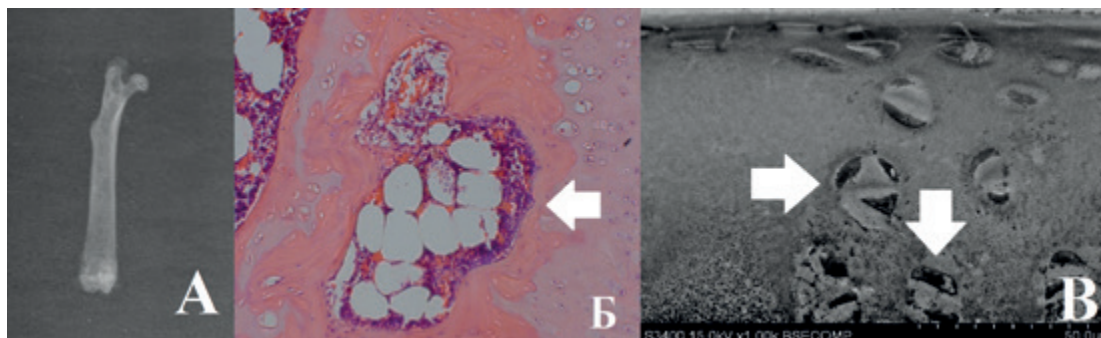
Статистическая обработка полученных результатов проводилась в программе Statistica для WINDOWS фирмы StatSoft Inc., версия 10.0. Для выборок определялись медиана и межквартильный размах (25, 75 перцентиль). Для сравнения выборок был использован непараметрический критерий Манна-Уитни. Вероятность ошибки первого рода была принята за 5%, соответственно уровень статистической значимости – при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Изменения рентгенологической, гистологической картин у всех животных после хирургической индукции асептического некроза были достаточно однотипными и характеризовались прогрессирующим развитием признаков активной остеодеструкции первые 6 недель с последующим усилением остеорепаляции на 8 неделе течения эксперимента.

Рентгенологическая картина в первые 2 недели течения асептического некроза головки бедренной кости мало отличалась от здоровой конечности. Эпифизарный индекс не имел значимых отличий, определялось снижение костной плотности проксимального отдела бедренной кости. При гистологическом исследовании препарата головки бедра с окраской гематоксилин-эозином определялось незначительное снижение объема на фоне сохранения архитектуры костных трабекул, снижение толщины гиалинового хряща. Пластина роста – с начальными дистрофическими изменениями, клеточность красного костного мозга сохранена. Выполнение СЭМ позволило более детально изучить особенности клеточного строения костной, хрящевой тканей на фоне хирургически созданной циркуляторной гипоксии. Так, по сравнению с контралатеральной условно-здоровой конечностью количество активных остеобластов со стороны индукции асептического некроза было несколько снижено (**рисунок 1**).





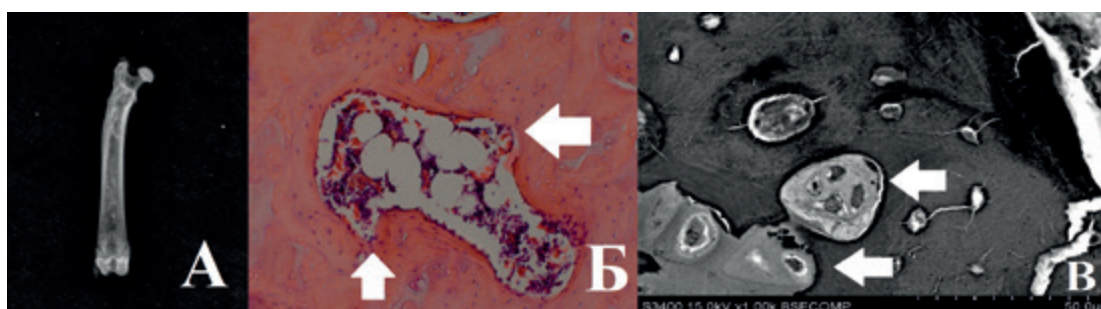
**Рисунок 2.** Результаты исследования головки бедренной кости через 4 недели после хирургической индукции асептического некроза. А) Рентгенография: снижение высоты, снижение костной плотности проксимального отдела бедра; Б) Световая микроскопия, окрашивание гематоксилин-эозин, увеличение x200. Стрелочкой указана лакунарная резорбция костной ткани; В) Электронная микроскопия, увеличение x1000. Стрелочками указаны дегенеративно измененные ядра хондроцитов.

**Figure 2.** Examination of femoral head avascular necrosis 4 weeks postoperation. А) X-ray examination finds decrease in epiphysis height and reduced bone density of the proximal femur; Б) Light microscopy, haematoxylin and eosin staining, x200 magnification. The arrow indicates lacunar bone resorption; С) Scanning electron microscopy, magnification x1000. Arrows indicate degeneration of chondrocyte nuclei.

Через 1 месяц течения асептического некроза по данным рентгенографии определялись снижение эпифизарного индекса, остеопения проксимальной трети бедренной кости со стороны хирургического вмешательства. Гистологическое исследование отобразило снижение плотности костных трабекул, их волнообразное расположение, пустые костные лакуны. Суставной хрящ – с дегенеративными изменениями в виде уплощения, потери части хондроцитов. Пластина роста также дегенеративно изменена. СЭМ позволила визуализировать активные остеокласты в зоне лакунарной резорбции костной ткани, истончение костных трабекул, деформацию остеоцитов, хондроцитов (рисунок 2).

Через 6 недель после начала эксперимента рентгенологическая картина по-прежнему характеризовалась снижением высоты эпифиза со стороны асептического некроза на фоне

потери костной плотности. При этом эпифизарный индекс оставался без значимых изменений по сравнению с результатами, полученными через 1 месяц течения аваскулярного некроза. Гистологическая картина характеризовалась наиболее ярко протекающими остеорезорбтивными процессами. Так, при выполнении световой микроскопии определялось истончение костных трабекул, замещение плотной соединительной тканью части кости, истончение гиалинового хряща, хаотичное расположение хондроцитов, потеря архитектуры костной ткани. Проведённая СЭМ позволила идентифицировать наибольшее количество активных остеокластов в зонах резорбции кости за всё время проведения эксперимента. Часть суставного хряща была замещена фиброзной тканью. Хондроциты характеризовались явными дегенеративными изменениями (рисунок 3).



**Рисунок 3.** Результаты исследований головки бедренной кости через 6 недель после хирургической индукции асептического некроза. А) Рентгенография: прогрессирующее снижение высоты эпифиза, снижение костной плотности проксимального отдела бедра; Б) Световая микроскопия, окрашивание гематоксилин-эозин, увеличение x200. Стрелочками указаны многочисленные лакуны резорбции костной ткани; В) Электронная микроскопия, увеличение x1000. Стрелочками указаны активные остеокласты в лакуне костной резорбции.

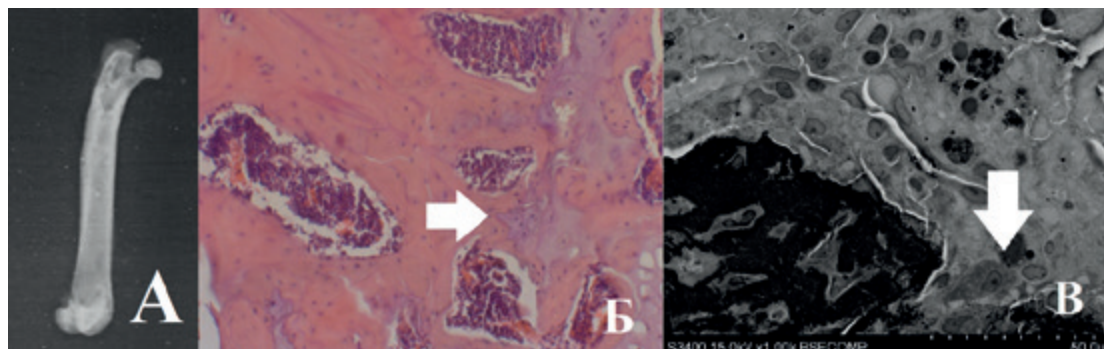
**Figure 3.** Examination of femoral head avascular necrosis 6 weeks postoperation. А) X-ray examination detects progressive decrease in epiphysis height and reduced bone density of the proximal femur; Б) Light microscopy, haematoxylin and eosin staining, x200 magnification. Arrows indicate numerous gaps in bone resorption; С) Scanning electron microscopy, magnification x1000. Arrows indicate active osteoclasts in the areas of bone resorption.

Рентгенография через 2 месяца после индукции аваскулярного некроза мало чем отличалась от предыдущих исследований. По-прежнему эпифизарный индекс поражённой головки бедренной кости оставался сниженным, костная плотность не нормализовалась. Гистологическое исследование при помощи световой микроскопии характеризовалось картиной костной деструкции в следствие остеолитизиса. Большой объём костной ткани замещен фиброзной, пластина роста прерывиста, дегенеративно изменена, су-

ставной хрящ с потерей части хондроцитов, толщина его снижена. Однако, по данным СЭМ, на фоне явных остеодеструктивных процессов, таких как замещение хрящевой, костной ткани плотной фиброзной, истончения костных трабекул, визуализировались признаки остеорепаративных процессов. Так, в зонах остеорезорбции количество активных остеокластов было снижено, при этом в зонах костного склероза определялось большое количество активных остеобластов (рисунок 4).

**Рисунок 4.**

Результаты исследования головки бедренной кости через 8 недель после хирургической индукции асептического некроза. А) Рентгенография: снижение высоты эпифиза, снижение костной плотности проксимального отдела бедра; Б) Световая микроскопия, окрашивание гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 200$ . Стрелочкой указано замещение костной ткани плотной фиброзной; В) Электронная микроскопия, увеличение  $\times 1000$ . Стрелочками указаны активные остеобласты.

**Figure 4.**

Examination of femoral head avascular necrosis 8 weeks postoperation. A) X-ray examination detects progressive decrease in epiphysis height and reduced bone density of the proximal femur; B) Light microscopy, haematoxylin and eosin staining,  $\times 200$  magnification. The arrow indicates the replacement of bone tissue with dense collagen fibers; C) Scanning electron microscopy, magnification  $\times 1000$ . Arrows indicate active osteoblasts.

Использование программы ImageJ при анализе данных гистологического исследования, световой микроскопии с окрашиванием препаратов гематоксилин-эозином позволило оценить объём костных трабекул на основании интенсивности их окрашивания. Отмечалась прогрессирующая потеря костной ткани на фоне усиления остеорезорбции. Так, со стороны асептического некроза головки бедренной кости по сравнению с условно-здоровой конечностью с 4-й по 8-ю неделю эксперимента установлено значимое снижение объёма костных балок (таблица 1).

Кроме того, при сравнении внутри групп препаратов «асептический некроз» и «условно-здоровая конечность» выявлено следующее. Объём костных балок был сопоставим во все

недели эксперимента в группе препаратов «условно-здоровая конечность». Значимые отличия между показателями препаратов после хирургической индукции аваскулярного некроза были достигнуты между 2-й и 4-й неделями ( $p=0,04$ ), 4-й и 6-й неделями эксперимента ( $p=0,01$ ). При сравнении 6-й, 8-й недели течения аваскулярного некроза результаты значительно не отличались ( $p>0,05$ ). Тем самым можно утверждать, что с 6-й недели эксперимента устанавливается патологическое плато в остеорезорбции.

При сравнении показателей эпифизарного индекса между условно-здоровой конечностью и асептическим некрозом достоверные отличия получены с 4-й по 8-ю недели эксперимента (таблица 2).

**Таблица 1.**  
Гистологические показатели объема костных балок (%).**Table 1.**  
Histological indicators of bone volume (%).

**Примечание:** Сравнение проводилось между препаратами с асептическим некрозом и с условно-здоровой конечности.

Недели эксперимента/ Weeks of experiment	Асептический некроз Me [25%;75%]/ Femoral head avascular necrosis Me [25%;75%]	Условно здоровая конечность, Me [25%; 75%] Intact limb, Me [25%; 75%]	p
2 недели 2 weeks	35,67 [34,33; 37,22]	37,78 [36,78; 38,22]	> 0,05
4 недели 4 weeks	31,45 [27,32; 31,56]	37,82 [37,43; 38,12]	> 0,05
6 недель 6 weeks	23,03 [21,03; 24,41]	37,92 [37,23; 38,12]	0,02
8 недель 8 weeks	24,43 [22,67; 25,34]	37,12 [37,31; 38,1]	0,03

**Таблица 2.**  
Рентгенологические показатели эпифизарного индекса (%).**Table 2.**  
X-ray indicators of the epiphyseal index (%).

**Примечание:** Сравнение проводилось между препаратами с асептическим некрозом и с условно-здоровой конечности.

Недели эксперимента/ Weeks of experiment	Асептический некроз Me [25%;75%]/ Femoral head avascular necrosis Me [25%;75%]	Условно здоровая конечность, Me [25%; 75%] Intact limb, Me [25%; 75%]	p
2 недели 2 weeks	44,84 [41,2; 46,3]	47,35 [45,9; 48,2]	> 0,05
4 недели 4 weeks	39,67 [37,4; 40,3]	47,21 [46,3; 47,1]	0,03
6 недель 6 weeks	38,06 [36,1; 39,1]	47,66 [46,4; 48,1]	0,02
8 недель 8 weeks	38,89 [37,2; 39,1]	47,89 [46,4; 47,8]	0,02

Однако анализ различий эпифизарного индекса внутри групп показал, что значимые отличия имели место только в группе препаратов аваскулярного некроза. Эпифизарный индекс был сопоставим на 4-ю, 6-ю и 8-ю недели эксперимента ( $p > 0,05$ ), и эти показатели значимо отличались от 2-й недели эксперимента ( $p = 0,03$ ;  $p = 0,01$ ;  $p = 0,02$  соответственно). Это усложняет оценку процессов остеорезорбции и моделирования новой костной ткани в модельных экспериментах.

## Обсуждение

Наименьшей диагностической ценностью при проведении экспериментальной работы на малых моделях животных по моделированию и изучению асептического некроза головки бедренной кости имело рентгенологическое исследование. Так, выполнение рентгенографии по мере течения аваскулярного некроза отображало лишь факт снижения высоты эпифиза головки бедра, который выражался в снижении эпифизарного индекса со стороны хирургических манипуляций на фоне разрежения костной плотности. Однако стадийность течения асептического некроза от стадии импрессионного перелома, фрагментации до стадии восстановления визуализировать по данным рутинного рентгенографического исследования было невозможно ввиду малого размера интересующего объекта. Оценить динамику изменений костной ткани невозможно, учитывая отсутствие значимых различий между показателем эпифизарного индекса от 4-й до 8-й недель эксперимента. Для большей визуализации возможно использование микро-мультиспиральной компьютерной томографии, о чём свидетельствует ряд научных работ, однако в представленном исследовании данный вид обследования не проводился [8].

Гистологическое исследование методом световой микроскопии при окрашивании гематоксилин-эозином позволило более детально визуализировать признаки процессов остеопороза, хондродеструкции на фоне гипоксического стресса. Стоит отметить, что наиболее частым методом оценки структурных изменений костной и хрящевой тканей является методика световой микроскопии с окрашиванием образцов гематоксилин-эозином. Представленный способ наиболее часто используется при морфологическом исследовании течения асептического некроза, регенеративных процессов в об-

разцах кости и позволяет с достаточно высокой точностью определить степень дегенеративно-дистрофических, воспалительных процессов [9, 10]. Анализ гистологической картины отразил прогрессирующее развитие деструктивных процессов от 2-й до 8-й недели эксперимента, выражающихся в истончении, уменьшении объема костных трабекул, истончении гиалинового, суставного хряща. При этом использование программы imageJ дало возможность провести количественную оценку морфометрических показателей. Так, объём костных балок определён как пиксельное значение, соответствующее окрашенным костным трабекулам. Представленный показатель был значимо снижен между 2-й и 4-й, а также 4-й и 6-й неделями эксперимента, что даёт возможность оценить не только качественные характеристики остеодеструкции, но и количественные, которые привносят объективизацию в исследование.

Для анализа особенностей клеточного состава кости, изменений активности остеобластов, остеокластов более целесообразно применение СЭМ. Большая кратность увеличения, разрешающая способность открывают возможности лучшей визуализации клеточного состава кости. Стоит отметить некоторые сложности в определении количественных характеристик полученных данных. Подсчёт активных остеобластов, остеокластов в полях зрения – крайне трудоёмкий процесс, во многом зависящий от кратности увеличения, а также выбранного для анализа участка кости. Тем не менее проведённая работа свидетельствует о значимости электронной микроскопии в оценке морфологических изменений костной ткани. При небольшом увеличении (до 50х) возможно оценить форму головки бедренной кости, толщину хрящевого покрытия, упорядоченность, размер костных балок. При значительных увеличениях (1500-2000х) визуализируются клетки костной, хрящевой тканей в зонах интереса. Можно однозначно сделать вывод об активном или не активном состоянии остеобластов, остеокластов. Так, в ходе эксперимента по изучению течения асептического некроза головки бедренной кости наиболее значимые процессы остеолитического характера, выражающиеся, по данным гистологического исследования, большим количеством активных остеокластов в зонах лакунарной остеорезорбции, были на 6-й неделе эксперимента. При исследовании препаратов головок бедренных костей черз



2 месяца после хирургической индукции аваскулярного некроза общая гистологическая картина соответствовала последствиям значительной остеодеструкции с потерей костной, хрящевой тканей, их замещением плотной фиброзной тканью. Однако при значительном увеличении определялось большое количество активных остеобластов, что свидетельствует об усилении остеорепаративных процессов.

## Заключение

Течение аваскулярного некроза головки бедренной кости сопровождалось прогрессирующим развитием остеодеструкции от 2-й до 8-й недель, по данным рентгенографического, гистологического исследований. Наименее

эффективным видом обследований оказалась рентгенография ввиду малого размера исследуемого объекта. Гистологическое исследование при использовании световой микроскопии, окрашивании препарата головки бедренной кости гематоксилин-эозином позволило определить не только количественные, но и качественные признаки развития остеорезорбции. Применение сканирующей электронной микроскопии способствовало более эффективной визуализации клеточного состава кости, отобразило наиболее значимый остеолитический с активацией большого количества остеокластов на 6-й неделе эксперимента, начало репаративных процессов в виде активации остеобластов на 8-й неделе эксперимента.

## Литература:

1. Шостак Н.А., Клименко А.А., Демидова Н.А., Андрияшкина Д.Ю., Ратьев А.П., Чирков А.В., Аветисян Г.Р., Михеева Е.П. Остеонекроз головки бедренной кости, не связанный с травмой: хирургические и консервативные методы лечения (часть 2). *Лечебное дело*. 2021;2:4-16. <https://doi.org/10.24412/2071-5315-2021-12387>
2. Chong DY, Schrader T, Laine JC, Yang S, Gilbert SR, Kim HKW; International Perthes Study Group. Reliability and Validity of Visual Estimation of Femoral Head Hypoperfusion on Perfusion MRI in Legg-Calve-Perthes Disease. *J Pediatr Orthop*. 2021;41(9):e780-e786. <https://doi.org/10.1097/BPO.0000000000001945>
3. Adapala NS, Kim HKW. Comprehensive Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Immature Articular Cartilage following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head in Piglets. *Plos One*. 2016;11(4):e0153174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153174>
4. Янушевич О, Козлова М, Козлова Л, Белякова А. Сравнительная оценка конусно-лучевой компьютерной томографии и гистологического исследования костной ткани челюстей. *Эндодонтия Today*. 2014;12(3):49-53.
5. Новиков СВ, Румакин ВП, Иванова АС. Экспериментальное гистологическое исследование костных регенератов, полученных из костных аутоаугментатов различных донорских зон кроликов. *Пародонтология*. 2012;17(4):55-59.
6. Шамик ВБ, Давуд БА, Франциянц КГ. Сканирующая электронная микроскопия грудины у детей с различными формами воронкообразной грудной клетки. *Астраханский медицинский журнал*. 2013;8(1):316-319.
7. Mukhamadiyarov RA, Bogdanov LA, Glushkova TV, Shishkova DK, Kostyunin AE, Koshelev VA, Shabaev AR, Frolov AV, Stasev AN, Lyapin AA, Kutikhin AG. EM bedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy: A Detailed Protocol for the Whole-Specimen, High-Resolution Analysis of Cardiovascular Tissues. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:739549. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.739549>
8. Yamaguchi R, Kamiya N, Adapala NS, Drissi H, Kim HK. HIF-1-Dependent IL-6 Activation in Articular Chondrocytes Initiating Synovitis in Femoral Head Ischemic Osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Am*. 2016;98(13):1122-1131. <https://doi.org/10.2106/JBJS.15.01209>
9. Резник ЛБ, Ерофеев СА, Стасенко ИВ, Борзунов ДЮ. Морфологическая оценка остеointеграции различных имплантов при замещении дефектов длинных костей (экспериментальное исследование). *Гений ортопедии*. 2019;25(3):318-323. <https://doi.org/10.18019/1028-4427-2019-25-3-318-323>
10. Павлова Т., Башук И. Клинико-морфологические особенности дегенеративных изменений костной ткани на фоне остеопороза в возрастном аспекте. *Врач*. 2019;30(6):47-50. <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-06-11>

## References:

1. Shostak NA, Klimenko AA, Demidova NA, Andriyashkina DYU, Rat'ev AP, Chirkov AV, Avetisyan GR, Miheeva EP. Non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: surgical and conservative treatment (part 2). *Lechebnoe delo*. 2021;2:4-16. (In Russ). <https://doi.org/10.24412/2071-5315-2021-12387>
2. Chong DY, Schrader T, Laine JC, Yang S, Gilbert SR, Kim HKW; International Perthes Study Group. Reliability and Validity of Visual Estimation of Femoral Head Hypoperfusion on Perfusion MRI in Legg-Calve-Perthes Disease. *J Pediatr Orthop*. 2021;41(9):e780-e786. <https://doi.org/10.1097/BPO.0000000000001945>
3. Adapala NS, Kim HKW. Comprehensive Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Immature Articular Cartilage following Ischemic Osteonecrosis of the Femoral Head in Piglets. *Plos One*. 2016;11(4):e0153174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153174>
4. Yanushevich O, Kozlova M, Kozlova L, Belyakova A. Comparative evaluation of cone-beam computed tomography and histological examination of jaw bone tissue. *Endodontics Today*. 2014;12(3):49-53. (In Russ).
5. Novikov SV, Rumakin VP, Ivanova AS. Experimental histological study of regenerated bone received from bone autografts from different donor parts of rabbits. *Periodontology*. 2012;17(4): 55-59. (In Russ).
6. Shamik VB, Davud BA, Franciyants KG. The scanning electron microscopy of sternum in children with different forms of funnel chest. *Astrakhan Medical Journal*. 2013;8(1):316-319 (In Russ).
7. Mukhamadiyarov RA, Bogdanov LA, Glushkova TV, Shishkova DK, Kostyunin AE, Koshelev VA, Shabaev AR, Frolov AV, Stasev AN, Lyapin AA, Kutikhin AG. EM bedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy: A Detailed Protocol for the Whole-Specimen, High-Resolution Analysis of Cardiovascular Tissues. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:739549. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.739549>
8. Yamaguchi R, Kamiya N, Adapala NS, Drissi H, Kim HK. HIF-1-Dependent IL-6 Activation in Articular Chondrocytes Initiating Synovitis in Femoral Head Ischemic Osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Am*. 2016;98(13):1122-1131. <https://doi.org/10.2106/JBJS.15.01209>
9. Reznik LB, Erofeev SA, Stasenkov IV, Borzunov DU. Morphological assessment of osteointegration of various implants for management of long bone defects (experimental study). *Orthopaedic genius*. 2019;25(3):318-323. <https://doi.org/10.18019/1028-4427-2019-25-3-318-323>
10. Pavlova T., Bashuk I. Clinical and morphological features of degenerative changes in bone tissue with osteoporosis in age aspect. *Vrach*. 2019;30(6):47-50. (In Russ). <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-06-11>



## Сведения об авторах

**Шабалдин Никита Андреевич**, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой детских хирургических болезней ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а)

**Вклад в статью:** проведение хирургических манипуляций, написание всех разделов статьи.

**ORCID:** 0000-0001-8628-5649

**Шабалдин Андрей Владимирович**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, б-р Сосновы, д. 6)

**Вклад в статью:** обсчет результатов, статистический анализ данных.

**ORCID:** 0000-0002-8785-7896

**Плохих Дмитрий Александрович**, кандидат медицинских наук, врач детский хирург, заместитель главного врача по учебно-методической работе ГАЗУ КО «Кузбасская областная детская клиническая больница им. Ю.А. Атаманова», (650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 21)

**Вклад в статью:** анализ данных, написание разделов рукописи.

**ORCID:** 0000-0002-9511-3571

**Синицкая Анна Викторовна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, б-р Сосновы, д. 6)

**Вклад в статью:** проведение экспериментальной части, обсчет результатов

**ORCID:** 0000-0002-4467-8732

**Мухамадияров Ринат Авахидиевич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, б-р Сосновы, д. 6)

**Вклад в статью:** концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, составление рисунков, написание статьи.

**ORCID:** 0000-0002-5558-3229

**Богданов Лев Александрович**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, б-р Сосновы, д. 6)

**Вклад в статью:** подготовка гистологических препаратов, анализ полученных данных

**ORCID:** 0000-0003-4124-2316

Статья поступила: 27.10.2022 г.

Принята в печать: 28.02.2023 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## Authors

**Dr. Nikita A. Shabaldin**, MD, PhD, Head of the Department of Pediatric Surgical Diseases, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation)

**Contribution:** performed the experiments; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0001-8628-5649

**Prof. Andrey V. Shabaldin**, MD, DSc, Leading Research Fellow, Laboratory of Cell and Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

**Contribution:** performed the data analysis.

**ORCID:** 0000-0002-8785-7896

**Dr. Dmitry A. Plokhikh**, MD, PhD, Pediatric Surgeon, Deputy Chief Physician, Kuzbass Regional Children's Clinical Hospital (21, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation)

**Contribution:** performed the data analysis; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0002-9511-3571

**Dr. Anna V. Sinitskaya**, PhD, Research Fellow, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

**Contribution:** conducting the experimental part, calculating the results

**ORCID:** 0000-0002-4467-8732

**Dr. Rinat A. Mukhamadiyarov**, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

**Contribution:** conceived and designed the study; collected and processed the data; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0002-5558-3229

**Mr. Leo A. Bogdanov**, MSc, Junior Research Fellow, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation)

**Contribution:** performed the data analysis.

**ORCID:** 0000-0003-4124-2316

Received: 27.10.2022

Accepted: 28.02.2023

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.