

А.А. Орлов¹, И.Н. Сабурин¹, М.Х. Диланян¹, Л.Н. Скуратовская¹,
В.С. Репин¹, Л.Е. Серебрикова², М.Ю. Житков², Э.Е. Евсеенков¹

Динамика формирования костной ткани у крыс под действием нового остеопластического материала «Norian»

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздравсоцразвития, 119991, Москва, ул.Тимура Фрунзе, 16

В эксперименте на крысах линии CD проводилось сравнительное исследование действия остеопластического материала NORIANCRS на скорость регенерации костной ткани нижней челюсти последенальной имплантации (титановый винт) и сочетанного влияния на эти процессы NORIANCRS и протеинового белка (Emdogein). Функциональность и зрелость новообразованной костной ткани оценивалась гистологическим и биохимическими методами. Результаты проведённого исследования свидетельствуют, что использование остеопластического материала NORIANCRS уже к 120-м сут. приводит к практически полной регенерации костной ткани. Установлено также, что сочетанное использование NORIANCRS и протеинового белка Emdogein нецелесообразно, так как его добавление не ускоряет процесс регенерации костной ткани, а на ранних сроках после операционного периода может вызвать воспалительную реакцию.

Ключевые слова: костная пластика, остеопластические материалы, денальная имплантация

А.А. Орлов¹, I.N. Saburina¹, M.Kh. Dilanyan¹, L.N. Skuratovskaya¹,
V.S. Repin¹, L.E. Serebrikova², M.Yu. Zhitkov², E.E. Evseenkov¹

Dynamics of formation of bone tissue in rats under the influence of new xenotransplantat «Norian»

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, 16, Timura Frunze str., Moscow, 119991, Russia

In experiments on rats CD comparative studies have been carried out which is the effect of osteoplastic material NORIAN CRS, the rate of bone regeneration after mandibular dental implants (titanium screw) and the combined effect of these processes NORIAN CRS protein and protein (Emdogein). Functionality and maturity of the newly formed bone tissue was evaluated by histological and biochemical methods. The results suggest that the use of osteoplastic material NORIAN CRS is the 120 days leading to almost complete regeneration of bone tissue. It was also found that the combined use of NORIAN CRS and protein Emdogein impractical because adding Emdogein not accelerate bone regenerative process, but in the early postoperative period may cause an inflammatory reaction.

Key words: bone plastic, osteoplastic materials, dental implantation

Устранение дефектов костной ткани за счет естественных процессов регенерации часто невозможно или слишком длительно. Поэтому для их хирургического лечения широко используют различные остеопластические материалы. Лучшим из них на сегодняшний день считается аутокость []. Однако ее применение связано с определенными трудностями и сопровождается дополнительной травмой пациента. Использование имплантатов из искусственных остеопластических материалов имеет много достоинств, к недостаткам можно отнести часто недо-

статочную скорость регенерации кости и трудности, связанные с точной подгонкой формы и размера имплантата к заполняемому дефекту. Новый остеопластический материал «Нориан» (Norian Craniofacial Repair System Fast Set производство фирмы Norian, США) представляет собой комбинацию порошка и жидкости, после их смешения в заданном соотношении образуется пластичная масса с хорошей адгезией к костной ткани, которой легко можно придать любую требуемую форму. Через несколько минут она застывает и приобретает прочность, сопоставимую с прочностью костной ткани. По данным фирмы-изготовителя остеопластические свойства этого материала соответствуют обычным имплантационным материалам на основе фосфатов кальция.

Для корреспонденции: Диланян Мамикон Хачатурович, аспирант ФГБУ «НИИОПП» РАМН. E-mail: mdilanyan@mail.ru

Цель работы — биохимическая и гистологическая характеристика динамики регенерации кости у крыс после заполнения дефектов в нижней челюсти материалом «Нориан» и оценка влияния на скорость заживления дефектов геля «Эмдогейн» (Emdogain), используемого в стоматологии для ускорения регенерации тканей пародонта.

Методика

Исследование проведено на 24 крысах линии CD в возрасте 12—14 недель. На наружной поверхности тела левой нижней челюсти в области угла вкручивался титановый винт-имплантат. Далее конструкция закрывалась пластичной массой остеопластического материала Norian CRS в соответствии с инструкцией, прилагаемой к стандартной упаковке. Через 6 мин остеопластический материал затвердевал (группа 1). Части животных (группа 2) в область операционного вмешательства, в целях стимуляции остеогенеза, дополнительно вводился препарат Emdogain представляющий собой особый белок в гелевой матрице в стандартной расфасовке по 0,7 мл. Введение Emdogain проводилось однократно во время операции при помощи микропипетки в дозе 0,05 мл (50 мкл) для каждого животного. После чего рана была послойно ушита. Третья группа крыс составляла группу контроля.

На 21-е, 60-е, 120-е и 180-е сут. после операции по 3 животных из каждой группы были подвергнуты эвтаназии. Из челюсти в области имплантации титанового винта выпиливали блоки и проводили их гистологическое и биохимическое исследование. Биохимическое исследование проводили только в сроки 60, 120 и 180 сут.

Для биохимического исследования материал сохраняли при -25°C . Пробы костной ткани не размораживая помещали в охлажденную фарфоровую ступку и измельчали до однородного состояния. Экстрагирование осуществляли 0,05 М фосфатным буфером pH 7,2 в количестве 1 мл на 10 мг ткани в течение 2 сут. при $+4^{\circ}\text{C}$. В полученном экстракте определяли содержание общего белка и активность ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Активность ферментов пересчитывали на 1 г белка экстракта. Определение белка проводили биуретовым методом, АСТ, АЛТ и ЩФ по методикам фирмы BioSystems (Испания) с наборами реактивов этой фирмы.

Навески ткани 4 раза деминерализовали по 2 сут. при $+4^{\circ}\text{C}$ 0,05 М фосфатным буфером pH 7,2 с 0,1 М трилона Б в количестве 1 мл на мг ткани. После деминерализации из навесок экстрагировали 0,4 М уксусной кислотой в количестве 1 мл на 50 мг ткани в течение 2 сут. при $+4^{\circ}\text{C}$ кислоторастворимый

коллаген. В полученном экстракте определяли содержание коллагена по о-пролину. Содержание коллагена пересчитывали на 1 мг свежей ткани.

В качестве стандарта использовали кислоторастворимый коллаген из сухожилий крысиных хвостов, полученный по методике [7]. Раствор коллагена диализовали в течение 24 ч, затем высушивали 10 сут. в вакуум-эксикаторе над безводным хлоридом кальция. Сухой коллаген (10 мкг/мл) растворяли в 0,1 М уксусной кислоте. Полученный раствор использовали в качестве эталонного раствора. Пробы кислотных экстрактов ткани и эталонного раствора коллагена анализировали параллельно на содержание о-пролина по методике [3]. Общность происхождения коллагена и способа его экстракции, а также параллельный гидролиз в одинаковых условиях проб и эталонных растворов позволили непосредственно определять содержание коллагена в пробах.

Определения проводили на биохимическом анализаторе BTS 370 (фирма BioSystems, Испания).

Для сравнения использовали результаты анализа по аналогичной методике интактной костной ткани нижней челюсти 24 контрольных крыс линии CD сопоставимых по возрасту с опытными. Для гистологического исследования материал фиксировали в забуференном формалине. После декальцинации и приготовления срезов по общепринятой методике с заливкой в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином. При гистологическом исследовании кроме обычной оценки гистологической картины проводили морфометрическое исследование.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования приведены в таблице и на рис. 1 и 2. Между группами 1 (без препарата Emdogain) и 2 (с препаратом Emdogain) различия всех показателей по t-критерию Стьюдента были незначимы ($p > 0,05$). В срок 60 сут. после операции выше, чем в группе сравнения были активность трансаминаз АСТ и АЛТ и ЩФ в группе 1 и активность АСТ в группе 2. Это может указывать на несколько большую активность процессов формирования костного матрикса, в частности, пролиферации и дифференцировки остеобластов в группе 1. Содержание кислоторастворимого коллагена в обеих группах в сроки 60 и 120 сут. после операции было выше, чем в группе сравнения. Таким образом, скорость созревания коллагена в обеих группах была примерно одинакова. Средние значения всех исследованных показателей в срок 180 сут. становятся практически равными контрольному значению для интактной костной ткани ($p > 0,05$), что указывает на завершение процессов синтеза костной ткани и переход ее в относительно стационарное состояние, соответствующее возрасту.

Содержание общего белка, аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) в экстрактах

Срок, сут.	Белок, г/л	АСТ, Е/г белка	АЛТ, Е/г белка	ЩФ, Е/г белка	Коллаген, мкг/г ткани	
60 сут.	Группа 1	39±4	1,43±0,61	0,99±0,28	0,65±0,18	107±35
	Группа 2	45±5	1,26±0,60	0,79±0,27	0,59±0,18	105±35
120 сут.	Группа 1	40±7	0,80±0,45	0,61±0,38	0,41±0,40	93±25
	Группа 2	26±5	1,05±0,50	0,90±0,39	0,71±0,41	77±25
180 сут.	Группа 1	42±8	0,57±0,44	0,47±0,15	0,29±0,15	81±27
	Группа 2	36±5	0,90±0,44	0,63±0,18	0,46±0,15	59±27
Группа сравнения	35±4	0,82±0,23	0,64±0,11	0,48±0,10	65±17	

К сроку 21-х суток судя по гистологической картине, отмечается интенсивное образование костной ткани и растворение остеопластического материала. В ряде случаев наблюдалось формирование заметной доли фиброзной соединительной ткани. В группе 2 (с препаратом Эмдогейн) по сравнению с группой 1 существенно выражены воспалительные реакции. Признаки воспалительных процессов отмечаются до 60-х суток. В более поздние сроки они не выявляются.

Полученные результаты показывают, что уже через 120 сут. (4 мес.) после операции регенерация костной ткани в обеих опытных группах в основном завершается и костный цемент оказывается большей частью замещен костью. Как и следовало ожидать, различия в скорости формирования костной ткани в зависимости от методики ее замещения к 4—6 мес. сглаживаются. Очевидно, к этому времени большая часть активных компонентов (факторов роста тканей зубов свиньи) в препарате Emdogain уже абсорбирована [7]. Различия в характере регенеративных процессов между группами невелики. В группе 2 можно отметить некоторое замедление регенерации кости, которое можно связать с воспалительными реакциями в ранние сроки и преобладанием соединительнотканых элементов в регенерате. Воспаление, скорее всего, вызвано реакцией на препарат Эмдогейн, а преимущественное образование соединительной

ткани может быть обусловлено специфическим действием активных компонентов препарата. Этими особенностями вызвана большая скорость снижения содержания кислоторастворимого коллагена в группе 2 по сравнению с группой 1. Активность трансаминаз, связанная с интенсивностью процессов пролиферации клеток, в ранние сроки была выше в группе 1. Активность ЩФ в экстракте, отражающая интенсивность процессов минерализации костного матрикса, через 60 сут. после операции также была выше в группе 1.

Динамика биохимических и гистологических показателей, отражающих регенерацию костной ткани, в целом, соответствует нормальному ходу этого процесса в присутствии остеоиндуктивных материалов [1, 2, 4—6, 9].

Можно заключить, что препарат Emdogain в ранние сроки (до 2—3 мес.) может ухудшить регенерацию дефектов костной ткани вследствие воспалительных процессов. В более поздние сроки наблюдается меньшая минерализация образованного костного матрикса и преобладание в регенерате волокнистой соединительной ткани. Признаков усиления репаративных процессов в костной ткани при введении этого препарата в сочетании с остеопластическим материалом Norian не отмечено. Поэтому его применение совместно с костным цементом Norian нецелесообразно.

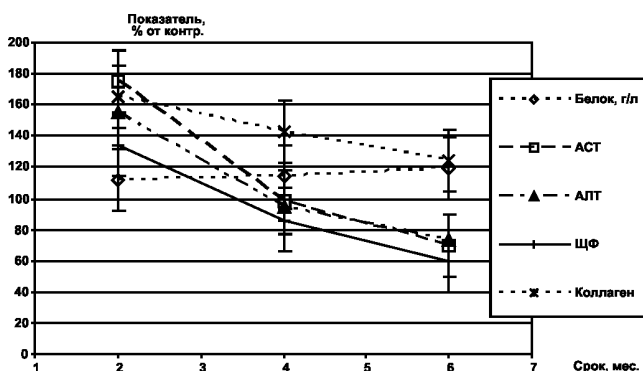


Рис. 1. Группа 1. Активность ферментов АСТ, АЛТ и ЩФ и содержание коллагена (% от значений для группы сравнения)

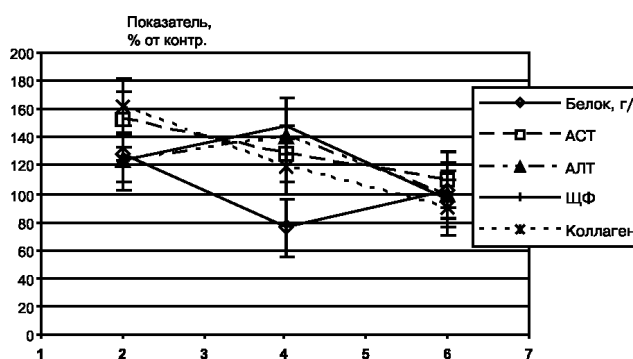


Рис. 2. Группа 2. Активность ферментов АСТ, АЛТ и ЩФ и содержание коллагена (% от значений для группы сравнения)

Список литературы

1. *Арсеньев И.Г.* Экспериментально-морфологическое обоснование клинического применения деградируемых биоимплантатов в комплексном лечении переломов и ложных суставов длинных трубчатых костей: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2007.
2. *Лекишвили М.В., Горбунова Е.Д., Васильев М.Г.* и др. Пластика дефектов костей черепа у детей деминерализованными костными аллоимплантатами // Детская хирургия. — 2004. — №5. — С. 9-12.
3. *Орехович В.Н.* (ред.) Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — 592 с.
4. *Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В.* Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани // Научно-практическая ревматология. — 2000. — №2. — С. 46-55.
5. *Норина С.В.* Диагностика и эффективность лечения остеоартроза коленных суставов на поликлиническом уровне: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Хабаровск, 2007.
6. *Шишков Н.В.* Влияние биокомпозиционных материалов на регенерацию костной ткани при заполнении дефектов челюстных костей после удаления радикулярных кист: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2005.
7. *Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A.* Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution // J. Biol. Chem. — 1967. — №251. — P. 6062-6067.
8. *Finkemeier C.G.* Bone-grafting and bone-graft substitutes // J. Bone Jr. Surg. A. — 2002. — Vol. 84, №3. — P. 454-464.
9. *Kawai T., Urist M.R.* Quantitative computation of induced heterotopic bone formation by an image analysis system // Clin. Orthop. — 1988. — №233. — P. 262-267.

Поступила 14.10.2012

Сведения об авторах:

Орлов Андрей Алексеевич, проф., д-р мед. наук, зав. лаб. трансляционной медицины ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Сабурина Ирина Николаевна, д-р биол. наук, зав. лаб. новых клеточных технологий ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Скуратовская Лариса Николаевна, учёный секретарь ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Репин Вадим Сергеевич, проф., член-корр. РАМН д-р биол. наук, ведущий науч. сотр. лаб. новых клеточных технологий ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Серебрикова Лариса Евгеньевна, канд. мед. наук, зав. биохим. лаб. ФГУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития

Житков Михаил Юрьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. биохим. лаб. ФГУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития

Евсеев Эдуард Евгеньевич, аспирант ФГБУ «НИИОПП» РАМН