

Динамика репаративного гистогенеза костной ткани в присутствии некоторых остеопластических материалов в лабораторных условиях

С. Ю. Иванов, чл.-корр РАН, д.м.н., проф.³ зав. кафедрой¹

А. В. Волков, д.м.н., с.н.с.^{2,3}

Д. А. Дё, врач — стоматолог-хирург-имплантолог, аспирант¹

¹Кафедра челюстно-лицевой хирургии Института стоматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский университет)» Минздрава России, г. Москва

²Лаборатория соединительной ткани ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н. Н. Приорова» Минздрава России, г. Москва

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва

Dynamics of reparative histogenesis of bone tissue in presence of some osteoplastic materials in vitro

S. Yu. Ivanov, A. V. Volkov, D. A. De

First Moscow State Medical University n.a. I. M. Sechenov, Central Scientific and Research Institute for Traumatology and Orthopedics n.a. N. N. Priorov, People's Friendship University of Russia, Moscow; Russia

Резюме

В хирургической стоматологии и дентальной имплантологии широко используются материалы — заменители костной ткани. Для определения эффективности применения, а также понимания механизмов воздействия остеопластических материалов на процесс регенерации костной ткани необходимо проведение не только гистологического, но и морфометрического исследования. Данные, полученные в результате этих исследований, позволяют составить объективную картину об основных процессах репаративного остеогенеза. Цель исследования: определение пространственного распространения репаративного остеогенеза в присутствии некоторых остеопластических материалов в лабораторных условиях. Материалы и методы. В качестве биомодели использовались животные — свиньи светлогорской породы. В зависимости от используемых остеопластических материалов животных разделяли на четыре группы по две особи в каждой: первая — в костные дефекты вводили остеопластический материал на основе бычьего депротенизированного костного матрикса; вторая — в костные дефекты вводили остеопластический материал на основе свиной очищенной лиофилизированной кости; третья — в костные дефекты вводили остеопластический композитный материал, состоящий на 60% из гидроксиапатита (ГА) и на 40% из бета-трикальций фосфата; четвертая (контрольная) — костный дефект заживал под кровяным сгустком. Животных выводили из эксперимента на 45-е сутки. Исследовали срезы толщиной 20 мкм с помощью метода световой и флуоресцентной микроскопии. Результаты. Результаты свидетельствуют о различной динамике репаративного остеогенеза в присутствии остеопластических материалов разных классов. В первой группе заполнение новообразованной костной тканью дефекта происходит неравномерно, во второй заполнение новообразованной костной тканью дефекта происходит равномерно, в третьей заполнение новообразованной костной тканью дефекта происходит неравномерно за счет выраженного гиперостоза, в группе контроля заполнения новообразованной костной тканью дефекта не происходит. Заключение: стимуляция, динамика репаративного остеогенеза и трехмерная организация костного регенерата, по всей вероятности, зависят от класса остеопластического материала, что требует дальнейшего изучения динамики и трехмерной организации костного регенерата для выбора оптимального костно-замещающего агента.

Ключевые слова: экспериментальное морфологическое исследование, остеопластические материалы, репаративный остеогенез, остеоиндукция, остеоиндукция, флуоресценция красителя.

Summary

Currently, to solve the bone deficiency problem in the maxillo-facial region, osteoplastic materials based on allogeneic and xenogenic collagen bone matrix are used, both in pure and in activated forms, by adding growth factors. It is impossible to determine the effectiveness and mechanisms of the osteoplastic materials effect on bone regeneration without a comprehensive study, including not only histological, but also morphometric studies of the structural components and cellular reactions in the impact area. Such studies provide reliable and objective information on the main processes taking place in bone regeneration. Purpose. To determine the spatial distribution of reparative osteogenesis in the presence of some osteoplastic materials in vitro. Materials and methods. Svetlogorsk breed pigs were used as a biomodel. Depending on the osteoplastic preparations used, the animals were divided into four groups of the two in each: 1st — a preparation based on a natural bovine bone graft was injected into bone defects. 2nd — a preparation based on collagenized porcine transplant was injected into bone defects. 3rd — a preparation consisting of 60% hydroxyapatite (HA) and 40% beta-tri-calcium phosphate; 4th — control group — the bone defect healed under a blood clot. Animals were removed from the experiment on the 45th day. We examined sections with a thickness of 20 μm using the method of light and fluorescence microscopy. Results. The results indicate different dynamics of the reparative osteogenesis in the presence of osteoplastic materials of different classes. In group 1, the filling of the defect with newly formed bone tissue is not uniform; in group 2, the filling of the defect with newly formed bone tissue is uniform; in group 3 the filling of the defect with non-formed bone tissue is uneven due to the pronounced hyperostosis; in the control group, the filling of the defect with newly formed bone tissue is not happening. Conclusion. Stimulation, the dynamics of reparative osteogenesis and the three-dimensional organization of bone regenerate depend on the osteoplastic material class, which requires further study of the dynamics and three-dimensional organization of bone regenerate to select the optimal bone-replacing agent.

Key words: experimental morphological study, osteoplastic materials, reparative osteogenesis, osteoinduction, osteoconduction, fluorescence dye regeneration.

В клинической практике врача — стоматолога-хирурга остеопластические операции необходимы для успешного имплантологического лечения [1, 2]. Успех операций по восстановлению утраченного объема костной ткани также зависит от свойств используемых остеопластических материалов [3, 15, 16].

На стоматологическом рынке представлен широкий спектр остеопластических материалов различного происхождения. Как правило, врачи — стоматологи-хирурги используют ксеногенные материалы ввиду их доступности и хороших osteoconductive свойств. Они не уступают по эффективности аутогенным трансплантатам. Однако применение ксенногенных препаратов исключает создание дополнительной травмы [1, 4, 5]. К отрицательным свойствам таких материалов можно отнести длительный срок резорбции.

В качестве альтернативы ксеногенным препаратам были разработаны синтетические остеопластические материалы, их использование также позволяет избежать дополнительной травмы в донорской зоне [6, 7].

Анализ опубликованных работ отечественных и зарубежных коллег подтвердил необходимость проведения исследований, оценивающих влияние различных по составу и происхождению остеопластических препаратов на динамику остеогенеза и заживления костных ран на основе оценки данных гистологического и морфометрического методов исследования.

Таким образом, на начальном этапе представляет интерес выявить особенности пространственного распространения репаративного остеогенеза в присутствии некоторых остеопластических материалов в лабораторных условиях.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование

Разрешение на данное исследование было получено в локальном этическом комитете Первого МГМУ имени Сеченова. Исследование проводилось на базе ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. В качестве биомо-

дели использовались животные — свиньи светлогорской породы. Содержание животных и все манипуляции проводились в соответствии с приказом Минздравсоцразвития № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики».

В зависимости от используемых остеопластических препаратов животных подразделяли на четыре группы по две особи в каждой: первая — в костные дефекты вводили остеопластический материал на основе бычьего депротеинезированного костного матрикса; вторая — в костные дефекты вводили остеопластический материал на основе свиной очищенной лиофилизированной кости; третья — в костные дефекты вводили остеопластический композитный материал, состоящий на 60 % из гидроксиапатита (ГА) и на 40 % из бета-трикальций фосфата; четвертая (контрольная) — костный дефект заживал под кровяным сгустком.

В послеоперационном периоде животным внутримышечно вводили препараты флуохромов по схеме:

1. доксымаг с 5-х по 14-е сутки;
2. окситремаг с 21-х по 30-е сутки;
3. ализарин с 37-х по 45-е сутки.

Животных выводили из эксперимента внутривенной передозировкой наркоза на 45-е сутки. Фрагменты челюсти с дефектами челюстей помещали в 10 %-ный нейтральный формалин и фиксировали 24 часа. После этого их промывали в проточной воде и переносили в абсолютный изопропанол, который сменяли трехкратно. Затем осуществляли пропитку раствором Technovit 4006 с последовательной сменой его трехкратно. Полимеризацию производили согласно инструкции производителя в аппарате Technomat в условиях повышенного давления (2 Bar) в течение 10 минут. Готовые блоки обрезали, удаляя излишний пластик, и формировали заготовки для последующей секции. Секцию блоков осуществляли на аппарате Isomet 4000 (Buehler, США). В результате получали срезы толщиной 100 мкм, которые

приклеивали акрилатным клеем к стеклу и шлифовали на полировальных кругах с последовательной сменой зернистости с 200 до 1200. Готовые шлифы (гистопрепараты) окрашивали по методике «Небесный трихром» [8]. После высыхания препаратов их заключали в бальзам для наилучшей визуализации клеточных и тканевых структур.

Результаты

Группа 1

Световая микроскопия

При микроскопическом исследовании костных шлифов с костным регенератом через 45 дней после операции обращало на себя внимание, что заполнение новообразованной костной тканью дефекта происходит неравномерно. Преимущественно костные пластинки расположены по дну костной раны с распространением вокруг остеопластического материала в виде тонких пластин.

Флуоресцентная микроскопия

Накопление препарата на данный срок обнаруживали преимущественно в пластинчатой костной ткани по краям костной раны, а также в центральной части регенерата в виде отдельных островков. Между островками пластинчатой костной ткани среди неминерализованной ткани обнаруживаются гранулы костнопластического материала, на поверхности которого обнаруживаются тонкие пластинки минерализующейся костной ткани, накапливающие препарат (рис. 1).

Группа 2

Световая микроскопия

При микроскопическом исследовании костных шлифов с костным регенератом через 45 дней после операции обращал на себя внимание тот факт, что заполнение новообразованной костной тканью дефекта происходит равномерно. Костные пластинки расположены по всей толще костной раны с распространением вокруг остеопластического материала в виде тонких и широких пластин, гаверсовы каналы узкие.

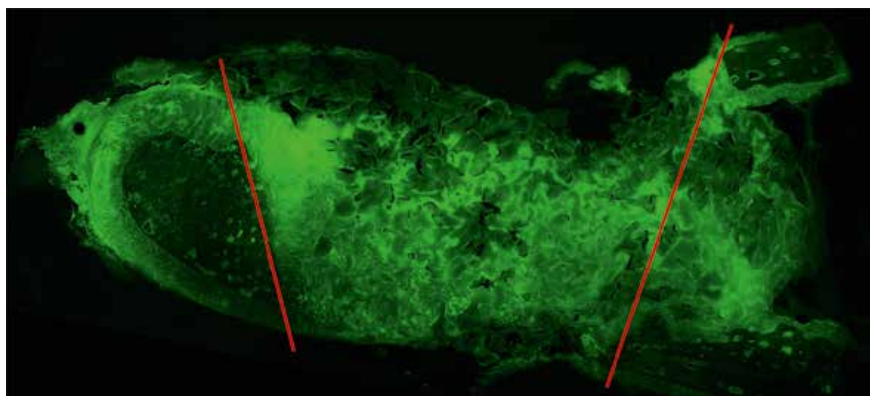


Рисунок 1. Костный шлиф. Группа имплантации остеопластического материала на основе деротеинизированного бычьего костного матрикса. Верхний рисунок: накопление тетрациклина в костном регенерате в течение первых 21 суток после операции (зеленое свечение). Нижний рисунок: костная рана содержит гранулы остеопластического материала (черные поля). Красные линии — края резекции, между ними костные пластинки (серо-фиолетовый цвет). Окраска: небесный трихром. Ув. 50х.

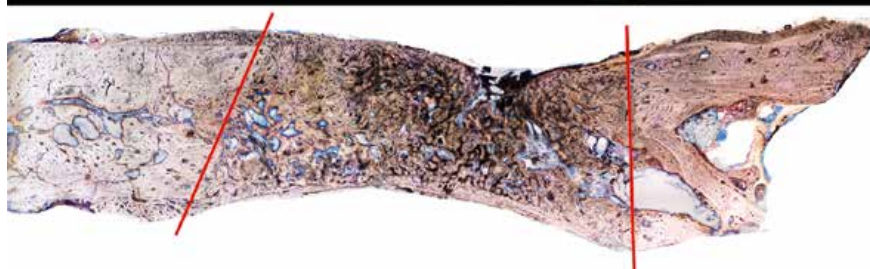
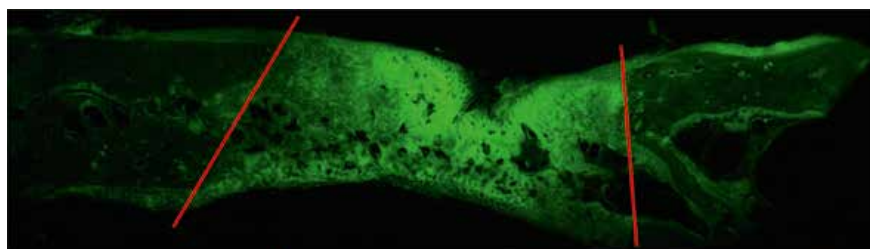


Рисунок 2. Костный шлиф. Группа имплантации остеопластического материала на основе лиофилизированного свиного костного матрикса. Верхний рисунок: накопление тетрациклина в костном регенерате в течение первых 21 суток после операции (зеленое свечение). Нижний рисунок: костная рана содержит гранулы остеопластического материала и костные пластинки (серо-фиолетовый цвет) между ними. Красные линии — края резекции. Окраска: небесный трихром. Ув. 50х.

Флуоресцентная микроскопия

Накопление препарата на данный срок обнаруживали преимущественно в пластинчатой костной ткани

в центральной части регенерата. Регенерат имел строение в виде плотного массива с толстыми балками пластинчатой костной ткани. Также

препарат накапливался в формирующихся гаверсовых каналах по краям костного регенерата, поднадкостнично и в толще материнской кости (рис. 2).

Группа 3

Световая микроскопия

При микроскопическом исследовании костных шлифов с костным регенератом через 45 дней после операции обращало на себя внимание, что заполнение новообразованной костной тканью дефекта происходит неравномерно за счет выраженного гиперостоза. Костные пластинки расположены по всей толще костной раны с распространением вокруг остеопластического материала в виде тонких и широких пластин, гаверсовы каналы узкие. Местами костный матрикс незрелый.

Флуоресцентная микроскопия

Накопление препарата на данный срок обнаруживали преимущественно в пластинчатой костной ткани в центральной части регенерата, поднадкостнично и внутри гаверсовых каналов материнской кости. Регенерат имел строение в виде плотного массива с толстыми балками пластинчатой костной ткани. Препарат преимущественно накапливался в формирующихся гаверсовых каналах в центральной части костного регенерата, а также в массиве новообразующейся костной ткани в базальных отделах. Массив костной ткани не только заполняет костный дефект, но и выходит за его пределы в апикальной и базальной частях костной раны (рис. 3).

Группа 4 (контрольная)

Световая микроскопия

При микроскопическом исследовании костных шлифов с костным регенератом через 45 дней после операции обращало на себя внимание, что заполнения новообразованной костной тканью дефекта не происходит. Накопление костного вещества — только по краям раны. Костные пластинки утолщены, массивны, гаверсовы каналы узкие.

Флуоресцентная микроскопия

Накопление препарата на данный срок обнаруживали преимущественно в пластинчатой костной ткани по краям регенерата, поднадкостнично и внутри гаверсовых каналов материнской кости. Частично в виде отдельных и сливающихся островков содержащая метку костная ткань обнаруживалась в центральной части регенерата (рис. 4).

Обсуждение

Проблема восстановления объема альвеолярного отростка или части челюсти с помощью различных остеопластических материалов актуальна в практике врача — стоматолога-хирурга. На современном стоматологическом рынке представлен большой выбор остеопластических материалов. «Золотым стандартом» костнопластического материала является аутогенная костная ткань, в которой есть жизнеспособные остеобласты, факторы роста и дифференцировки кости [6, 9, 12]. Однако использование аутогенных трансплантатов связано не только с большим количеством осложнений, но и неизбежной дополнительной травматизацией в области забора трансплантата [10, 11].

Несмотря на то что эффективность остеопластических материалов подтверждена большим количеством экспериментальных и клинических исследований, существует необходимость разрабатывать и изучать свойства новых материалов [12, 15, 17].

Анализ работ отечественных и зарубежных коллег показал, что морфологическое исследование — необходимый инструмент для оценки эффективности и безопасности костнопластических материалов. Методику морфометрии костной ткани в регенеративной медицине начали применять относительно недавно [12]. Однако принципы доказательной медицины диктуют условия для создания концепции по комплексной оценке костных регенератов в условиях имплантации материалов — заменителей костной ткани. Особенности репаративного остеогенеза, сложные многофакторные взаимодействия имплантирован-

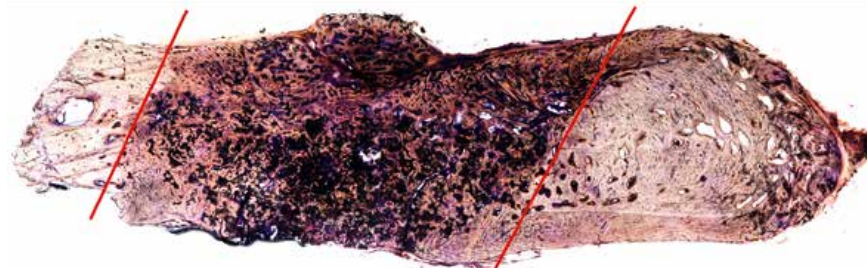
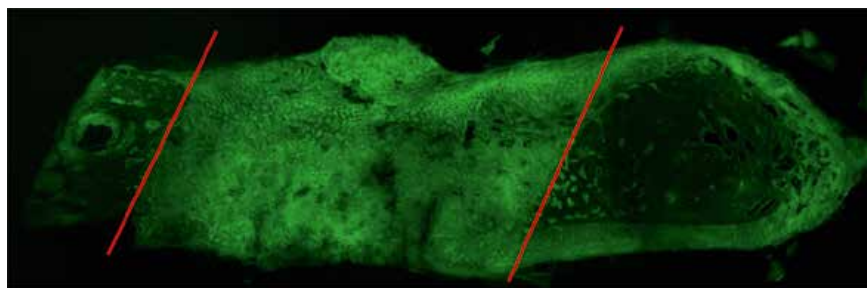


Рисунок 3. Костный шлиф. Группа имплантации остеопластического материала на основе композитного синтетического материала. Верхний рисунок: накопление тетрациклина в костном регенерате в течение первых 21 суток после операции (зеленое свечение). Нижний рисунок: костная рана содержит гранулы остеопластического материала (черные поля). Между ними — костные пластинки (серо-фиолетовый цвет). Красные линии — края резекции. Окраска: небесный трихром. Ув. 50х.

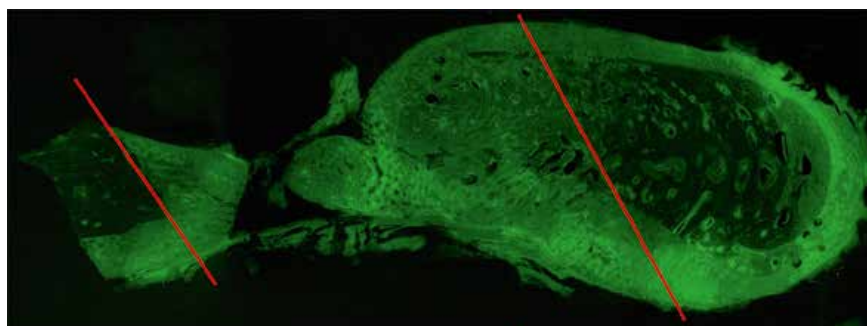


Рисунок 4. Костный шлиф. Группа контроля. Верхний рисунок: накопление тетрациклина в костном регенерате в течение первых 21 суток после операции (зеленое свечение). Нижний рисунок: костная рана с костным регенератом (серо-фиолетовый цвет). Красные линии — края резекции. Окраска: небесный трихром. Ув. 50х.

ного материала с организмом человека замедляют процесс создания протоколов морфометрической оценки остеокондукции и остеоиндукции [11, 13]. Отсутствие объективных критериев оценки этих явлений не позволяет сделать выводы об эффективности и безопасности применения различных остеопластических материалов.

Данные морфологической оценки костных регенератов после имплантации выявили ряд особенностей репаративного остеогенеза в присутствии ксеногенных остеопластических материалов на основе депротеинизированной бычьей кости (костный гидроксиапатит), коллагенизированного свиного трансплантата и синтетического

материала на основе гидроксиапатита и трикальцийфосфата. При сравнении полученных результатов в исследуемых группах с группой контроля, в которой заживление костной раны проходило «под сгустком», имплантация всех типов остеопластических материалов не оказывала значительного влияния на течение репаративного остеогенеза, что подтверждает эффективность использования их в клинической практике (относительно достаточный объем костного регенерата, сопоставимый с таковым при естественном заживлении). Также выявлены особенности взаимодействия остеопластического материала с подлежащими тканевыми структурами, что позволяет охарактеризовать течение репаративного остеогенеза в их присутствии. Таким образом, склонность к формированию плотноволнообразной соединительной ткани над поверхностью регенерата характерна для ряда коллагенсодержащих материалов, для депротенизированного костного матрикса характерно формирование плотноволнообразной соединительной ткани как над поверхностью регенерата, так и внутри; выявлены явления хронического воспаления с инфильтрацией клетками макрофагального ряда — реакцией на инородное тело по сравнению с заживлением костной раны «под сгустком» и течением репаративного остеогенеза при трансплантации аутологичной костной ткани [5, 8, 11, 12, 13].

Заключение

Основываясь на полученных данных, характеризующих динамику образования и распространения костной ткани при имплантации различных классов остеопластических материалов в сравнении со спонтанным заживлением, репаративный остеогенез в их присутствии имеет особенности.

Так, к контрольному времени в группе со спонтанным заживлением регенерация костной ткани

не привела к полному восстановлению объема и структуры нативной кости. Внесение в костную рану различных классов остеопластических материалов изменяет течение остеогенеза, характер и трехмерную организацию костного регенерата. В свою очередь, стимуляция репаративного остеогенеза этими материалами приводит к различному объему образования костной ткани в исследуемых временных интервалах. Образование и созревание костного вещества к контрольному времени также, по всей вероятности, зависит от класса остеопластического материала.

Таким образом, следует сделать заключение, что стимуляция, динамика репаративного остеогенеза и трехмерная организация костного регенерата, по всей вероятности, зависят от класса остеопластического материала, что требует дальнейшего изучения динамики и трехмерной организации костного регенерата для выбора оптимального костно-замещающего агента.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Тарасенко С. В., Шехтер А. Б., Ершова А. М., Бондаренко И. М. Сравнительный гистологический анализ применения синтетических и ксеногенных остеопластических материалов для аугментации альвеолярного отростка верхней челюсти перед дентальной имплантацией. *Российская стоматология*. — 2016; 9 (3): 3–7. DOI: 10.17116/rosstomat2016933–7.
2. Chiapasco M., Zaniboni M. Failures in jaw reconstructive surgery with autogenous onlay bone grafts for pre-implant purposes: incidence, prevention and management of complications // *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* — 2011. — N 23 (1). — P. 1–15. doi.org/10.1016/j.coms.2010.10.009.
3. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin. Oral Impl. Res.* 21, 2010; 567–576. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x
4. Testori T., Iezzi G., Manzon L., Fratto G., Piattelli A., Weinstein R. L. High temperature-treated bovine porous hydroxyapatite in sinus augmentation procedures: a case report // *Int J Periodontics Restorative Dent.* — 2012. — N 32(3). — P. 295–301.
5. Юрьев Е. М., Ушаков А. И., Серова Н. С., Багирова Э. А., Канноева М. В. Дифференциальный подход к выбору костно-пластического материала при дентальной имплантации в усло-

- виях дефицита костной ткани // *Российская стоматология*. — 2014. — Т. 7. — № 4. — С. 30–33.
6. Hu J., Zhou Y., Huang L., Liu J., Lu H. Effect of nano-hydroxyapatite coating on the osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramics // *BMC Musculoskelet Disord.* — 2014. — N 15. — P. 114. DOI: 10.1186/1471-2474-15-114.
 7. Scarano A., Degidi M., Perrotti V., Piattelli A., Iezzi G. Sinus augmentation with phycoene hydroxyapatite: histological and histomorphometrical results after 6 months in humans. A case series // *Oral Maxillofac Surg.* — 2012. — No 16(1). — P. 41–45. DOI: 10.1007/s10006-011-0296-3.
 8. Волков А. В., Шустров С. А., Корсаненков К. С., Набиева Е. Х. Новый метод окраски недекальцинированной костной ткани // *Клиническая и экспериментальная морфология*. — 2016. — № 4 (20). — С. 55–58.
 9. Mangano C., Perotti V., Shibli J. A., Mangano F., Ricci L., Piattelli A., Iezzi G. Maxillary sinus grafting with biphasic calcium phosphate ceramics: clinical and histologic evaluation in man // *Int J Oral Maxillofac Implants.* — 2013. — N 28(1). — P. 51–56. DOI: 10.11607/jomi.2667.
 10. Иванов С. Ю., Мухаметшин Р. Ф., Мураев А. А., Бонарцев А. П., Рябова В. М. Синтетические материалы, используемые в стоматологии для замещения дефектов костной ткани // *Современные проблемы науки и образования*. — 2013. — N 1. — Режим доступа: www.science-education.ru/ru/article/view?id=8345.
 11. Daniel S. Thoma, Stefan P. Bienz, Michael Payer, Jürg Hüsler, Patrick R. Schmidlin, Christoph H. F. Hämmerle, Norbert Jakse and Ronald E. Jung. Randomized clinical study using xenograft blocks loaded with bone morphogenetic protein-2 or autogenous bone blocks for ridge augmentation — A three-dimensional analysis, *Clinical Oral Implants Research*, 30, 9, 872–881, 2019. DOI: 10.1111/clr.13492.
 12. Волков А. В. К вопросу о безопасности остеопластических материалов / А. В. Волков // *Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова*. — 2015. — N 1. — С. 46–51.
 13. Janner S.F.M. The influence of collagen membrane and autogenous bone chips on bone augmentation in the anterior maxilla: a preclinical study / S.F.M. Janner, D.D. Bosshardt, D.L. Cochran, V. Chappuis, G. Huynh-Ba, A. A. Jones, D. Buser // *Clin. Oral. Implants Res.* — 2016. DOI: 10.1111/clr.12996.
 14. Мураев А. А., Иванов С. Ю., Ивашкевич С. Г., Горшенев К., Телешев А. Т., Кибардин А. В., Кобец К. К., Дубровин В. К. Органотипичные костные имплантаты — перспектива развития современных остеопластических материалов. *Стоматология*. 2017; 96 (3): 36–39. doi.org/10.17116/stomat201796336–39.
 15. Мураев А. А., Бонарцев А. П., Гажва Ю. В., Рябова В. М., Волков А. В., Жаркова И. И., Стамболиев И. А., Кузнецова Е. С., Жуйков В. А., Мышкина В. Л., Махина Т. К., Бонарцева Г. А., Яковлев С. Г., Кудряшова К. С., Воинова В. В., Шайтан К. В., Иванов С. Ю. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия. *Современные технологии в медицине*. 2016; 8 (4): 50–57.
 16. Мураев А. А., Иванов С. Ю., Артифксов А. А., Рябова В. М., Володина Е. В., Полякова И. Н. Изучение биологических свойств нового остеопластического материала на основе недеминерализованного коллагена, содержащего фактор роста эндотелия сосудов при замещении костных дефектов // *Современные технологии в медицине*, № 1, 2012, с. 21–26.

