



А.В. Палій

Особливості регенерації кісткової тканини після остеопластики ксеногенним матеріалом

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Мета роботи — встановити особливості та терміни регенерації кісткової тканини після кісткової пластики матеріалом «Остеопласт-К».

Матеріали та методи. Рівень остеокальцину в сироватці крові визначали за методом імуноферментного аналізу з використанням тест-системи N-MID Osteocalcin ELISA (IDS). Особливості реваскуляризації вивчали за гістологічним методом. Гістологічні препарати забарвлювали за методом Шморля та гематокси-ліном і еозином.

Результати та обговорення. Середня концентрація остеокальцину після імплантації кістковопластичного матеріалу була в межах від $(1,75 \pm 0,04)$ до $(2,9 \pm 0,04)$ нг/мл. Після остеопластики до 30- та 60-ї доби кількість судин калібру $15\text{--}20$ мкм² зростала, після чого до 90-ї доби відсоткове співвідношення зменшилося. На 30- та 60-ту добу зросла кількість судин розміром $10\text{--}15$ та $25\text{--}30$ мкм². До 60- та 90-ї доби експерименту виявляли найбільше судин розміром $15\text{--}20$ та $20\text{--}25$ мкм². У зразках, де загоювання відбувалося під кров'яним згустком, від 14- до 30-ї доби зростала кількість судин площею $20\text{--}25$ та $25\text{--}30$ мкм². Протягом експерименту постійно збільшувалася кількість судин площею $10\text{--}15$ та $15\text{--}20$ мкм² від 30-ї до 60-ї доби.

Висновки. В експерименті в процесі регенерації кісткової тканини після остеопластики матеріалом «Остеопласт-К» встановлено підвищення рівня остеокальцину в крові і відповідно — активності остеобластів. Також протягом 3 міс зростала кількість дрібних судин у кістковому регенераті, що свідчить про інтенсифікацію процесів реваскуляризації та остеогенезу.

Ключові слова: остеointegraція, кісткова пластика, остеокальцин, реваскуляризація.

Відновлення втраченої внаслідок різних чинників кісткової тканини — актуальне питання хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії [6—9]. Для розуміння остеорегенерації в різних випадках важливо знати процеси формування екстрацелюлярного матриксу кісткової тканини [1, 3]. Сучасні остеопластичні матеріали поєднують у собі остеоіндуктивні й остеоіндуктивні властивості, а також забезпечують можливість проростання кровоносних судин [1, 2, 4—6, 10].

Чутливим маркером метаболізму кісткової тканини є остеокальцин (вітамін К-залежний неколагеновий білок). Він локалізується переважно в позаклітинному матриксі кістки і складає 25 % неколагенового матриксу, а зміни його концентрації в крові відображають метаболічну активність остеобластів кісткової тканини. Понад 90 % синтезованого остеокальцину в людей молодого віку та у 70 % зрілого залучається в кістковий матрикс, а решта потрапляє в кровотік. У крові

циркулюють як інтактний остеокальцин, так і його великий N-MID-фрагмент [11].

Мета роботи — встановити особливості та терміни регенерації кісткової тканини після кісткової пластики матеріалом «Остеопласт-К».

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження проведено у віварії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького на 30 щурах лінії Вістар з масою тіла $270\text{--}380$ г. Під ефірним наркозом у асептичних умовах після депіляції операційного поля робили розріз у ділянці дорсальної поверхні великогомілкової кістки, створювали доступ до поверхні кістки і кулястим бором формували два дефекти діаметром $2,0$ мм (по одному з кожного боку) відповідно до топографо-анатомічних особливостей великогомілкової кістки. Кістковий дефект з одного боку заповнювали остеопластичним матеріалом, а з протилежного загоєння відбувалося під кров'яним згустком.

Використовували матеріал «Остеопласт-К» (НВК «Вітаформ») — високоочищений недемінералізований кістковий колаген, виділений із губчастої кістки, який містить сульфатовані глікозаміноглікани. У ділянку оперативного втручання ін'єктували 30 % лінкоміцину гідрохлорид. Тварин

Стаття надійшла до редакції 10 квітня 2014 р.

Палій Андрій Володимирович, аспірант кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії
79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69
E-mail: a.paliy7@gmail.com

виводили з експерименту на 14-, 30-, 60- та 90-ту добу. Декальцинацію і виготовлення гістологічних препаратів виконували за стандартною методикою. Забарвлювали препарати за методом Шморля та гематоксилином і еозином. Кров забирали у пробірки (1,5 мл) на 14-, 30-, 60- та 90-ту добу й центрифугували (2000 об./хв), після чого сироватку відокремлювали в пробірки та заморожували. У подальшому вимірювання проводили за методом імуноферментного аналізу на апараті «Stat Fax 2200» з використанням тест-системи N-MID Osteocalcin Elisa (IDS).

Світлову мікроскопію і мікрофотографування гістопрепаратів здійснювали за допомогою мікроскопа Olympus CX 41 та фотокамери Olympus C-5050. Морфометрію на тканинному рівні проводили за морфометричною програмою DP-Soft для мікроскопа Olympus CX 41.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми «Statistica» (StatSoft) та пакета програм у середовищі Microsoft Excel.

Результати та обговорення

У тварин з імплантованим остеопластичним матеріалом середні значення остеокальцину коливалися в межах від $(1,75 \pm 0,04)$ до $(2,9 \pm 0,04)$ нг/мл (рис. 1): на 14-ту добу його вміст становив $(1,75 \pm 0,04; p < 0,001)$, на 30-ту — $(2,9 \pm 0,04; p < 0,05)$, на 60- та 90-ту — $(2,2 \pm 0,09; p < 0,01)$ і $(2,6 \pm 0,03; p > 0,05)$ нг/мл ($M \pm m$).

У зразках, де проводили кісткову пластику, на 14-ту добу переважали судини із площею поперечного зрізу 15–20 (29,35 %) і 20–25 мкм² (24,91 %), судини із площею 10–15 та 25–30 мкм² складала по 15,16 %. На 30-ту добу переважали судини із

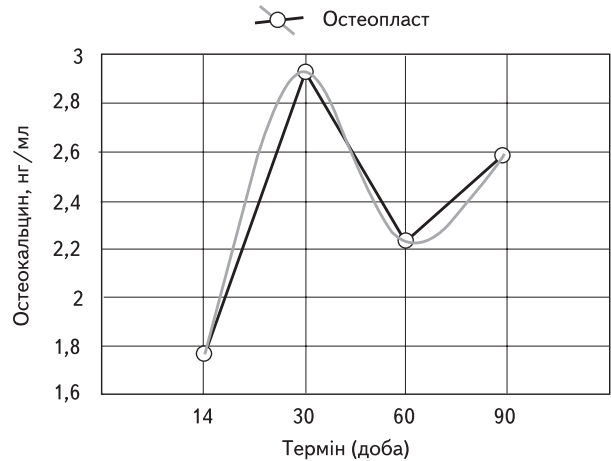


Рис. 1. Коливання показників остеокальцину крові після кісткової пластики остеопластичним матеріалом

площею 15–20 (40,87 %) та 10–15 мкм² (32,61 %), судини розміром 20–25 мкм² складала 15,22 %; на 60-ту добу переважали судини із площею 15–20 (44,19 %) та 20–25 мкм² (20,93 %), із площею 10–15 та 25–30 мкм² складала відповідно 16,67 і 12,79 %; на 90-ту добу переважали судини розміром 15–20 (37,53 %) і 20–25 мкм² (29,04 %), судини із площею 25–30 мкм² складала 13,97 % (таблиця і рис. 2).

Після остеопластики зросла кількість судин розміром 15–20 мкм² до 30-ї (40,87 %) та 60-ї доби (44,19 %), після чого на 90-ту добу відсоткове співвідношення зменшилося до 37,53 %. На 30- та 60-ту добу зросла кількість судин розміром 10–15 та 25–30 мкм². До 60- та 90-ї доби експерименту домінували судини із площею 15–20 і 20–25 мкм² (по 44,19 і 37,53 % на 60-ту добу та 20,93 і 29,04 % на 90-ту) (рис. 2).

Таблиця
Відсоткове співвідношення судин різного діаметра після кісткової пластики остеопластичним матеріалом та після загоювання під кров'яним згустком (контроль)

Термін (доба)	«Остеопласт-К»				Контроль			
	14	30	60	90	14	30	60	90
Площа зрізу судини (x) мкм ²	% (відсотки від загальної кількості судин) (p < 0,05)				% (відсотки від загальної кількості судин) (p < 0,05)			
0 < x ≤ 5	0	0,43	0,39	0	0	0	0	0,82
5 < x ≤ 10	0	5,22	0,78	0,27	1,43	0	0,61	0,82
10 < x ≤ 15	15,16	32,61	16,67	13,70	23,22	4,23	10,30	11,84
15 < x ≤ 20	39,35	40,87	44,19	37,53	39,81	29,97	38,79	32,65
20 < x ≤ 25	24,91	15,22	20,93	29,04	25,12	28,34	24,85	24,08
25 < x ≤ 30	15,16	3,48	12,79	13,97	8,53	22,80	11,52	12,24
30 < x ≤ 35	3,97	1,3	3,1	2,74	0,95	5,86	6,67	6,12
35 < x ≤ 40	1,45	0,43	1,15	1,64	0,47	2,93	4,85	5,31
40 < x ≤ 45	0	0,44	0	0,57	0,47	2,28	1,21	2,86
45 < x ≤ 50	0	0	0	0	0	1,3	0,61	1,63
50 < x ≤ 80	0	0	0	0,54	0	2,29	0,59	1,63

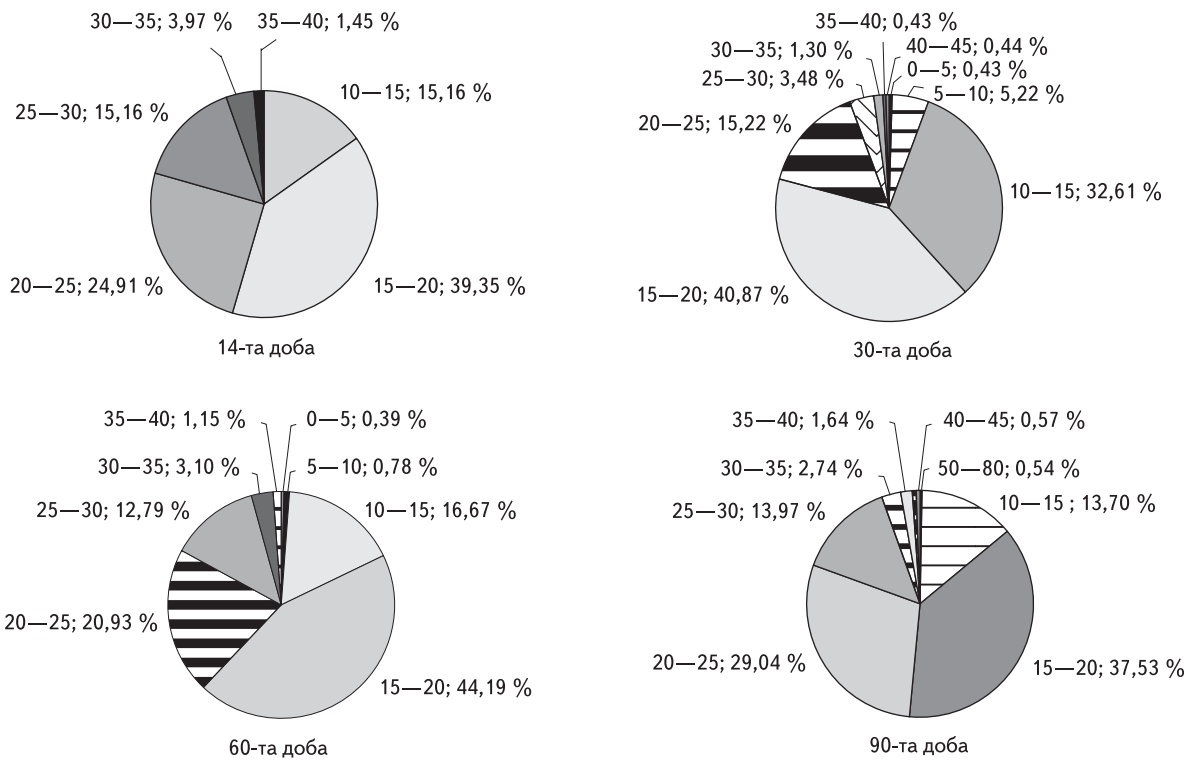


Рис. 2. Динаміка зміни відсоткового співвідношення судин різної площі після кісткової пластики остеопластичним матеріалом (мкм²)

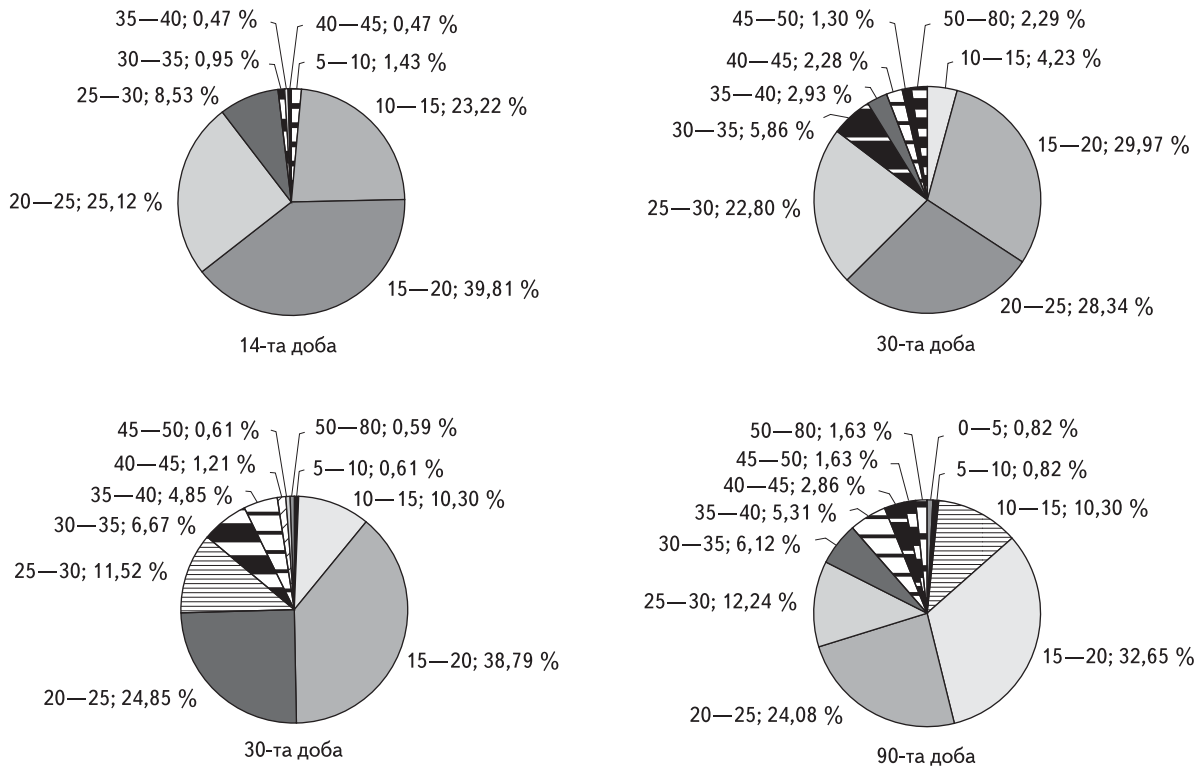


Рис. 3. Динаміка зміни відсоткового співвідношення судин різної площі після загоювання рани під кров'яним згустком (мкм²)

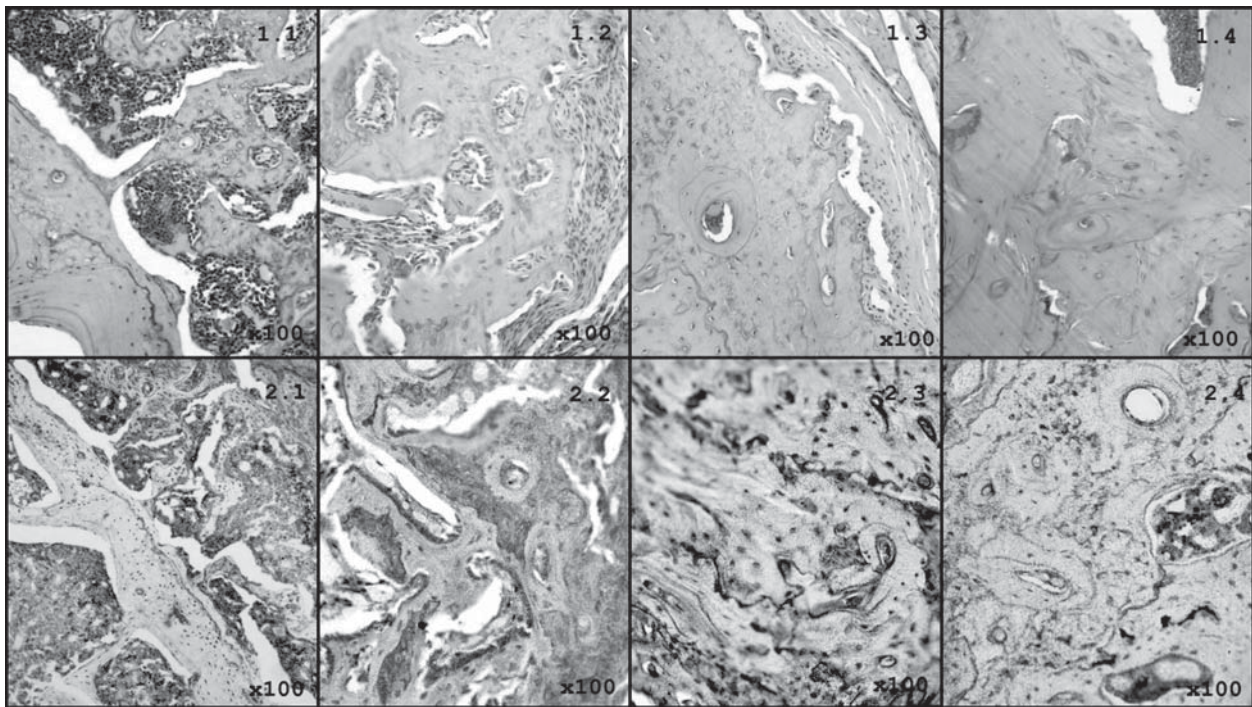


Рис. 4. Динаміка ревазуляризації після кісткової пластики остеопластичним матеріалом. Забарвлення гематоксиліном і еозином: 1.1 — 14 діб; 1.2 — 30 діб; 1.3 — 60 діб; 1.4 — 90 діб. Забарвлення за методом Шморля: 2.1 — 14 діб; 2.2 — 30 діб; 2.3 — 60 діб; 2.4 — 90 діб

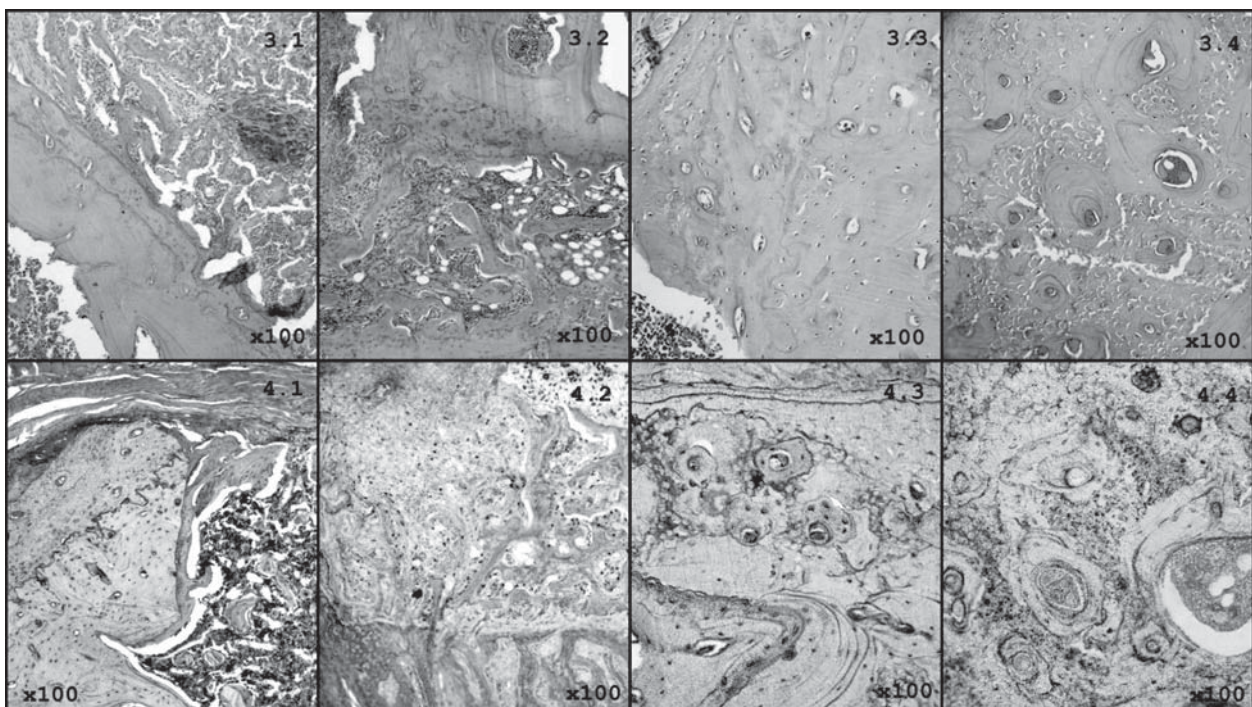


Рис. 5. Динаміка ревазуляризації кісткового дефекту в разі загоювання під кров'яним згустком. Забарвлення гематоксиліном і еозином: 3.1 — 14 діб; 3.2 — 30 діб; 3.3 — 60 діб; 3.4 — 90 діб. Забарвлення за методом Шморля: 4.1 — 14 діб; 4.2 — 30 діб; 4.3 — 60 діб; 4.4 — 90 діб

Прослідковувалось збільшення кількості дрібних судин, найбільша їхня кількість спостерігалась на 30-у добу експерименту.

У контрольних зразках на 14-ту добу переважали судини із площею поперечного зрізу 15—20 (39,81 %), 10—15 (23,22 %) та 20—25 (25,12 %) мкм²; на 30-ту — 15—20 (29,97 %), 20—25 (28,34 %) та 25—30 мкм² (22,80 %); на 60-ту — 15—20 (38,79 %) та 20—25 мкм² (24,85 %). Судини розміром 10—15 і 25—30 мкм² складала відповідно 10,30 та 11,52 %. На 90-ту добу домінували судини із площею 15—20 (32,65 %) і 20—25 (24,08 %) мкм², судини із площею 10—15 та 25—30 мкм² складала 11,84 та 12,24 % відповідно (див. таблицю і рис. 3).

У зразках після остеопластики відмічалось збільшення кількості дрібних судин з 14-ї по 30-ту добу експерименту. У контрольних зразках була не така інтенсивна динаміка росту, а відсоткове співвідношення судин змінювалося незначно протягом усього експерименту (90 діб).

У зразках, де загоювання відбувалося під кров'яним згустком, від 14- до 30-ї доби зростала кількість судин площею 20—25 мкм² від 25,12 % (14-та доба) до 28,34 % (30-та доба) та 25—30 мкм² — від 8,53 до 22,8 % відповідно. Збільшувалася кількість судин із площею 10—15 мкм² від 30- (4,23 %) до 60- (10,3 %) та 90-ї (11,84 %) доби, а також судин із площею 15—20 мкм² — від 30- до 60-ї доби від 29,97 до 38,79 % загальної кількості (див. рис. 3).

Найвища концентрація остеокальцину крові спостерігалася на 30-ту добу експерименту, що відповідає найвищій активності остеобластів у цей період. До 30-ї доби також виявлено найвищу активність росту дрібних судин: 5—10 та 10—15 мкм² (див. рис. 1).

У гістопрепаратах на 14-ту добу переважала сполучна та хрящова тканина як після остеопластики, так і в разі загоювання під кров'яним згустком. На 30-ту добу в зразках після імплантації ксеногенного матеріалу виявляли ділянки незрілої кісткової тканини, активного формування кістки з великою кількістю остеобластів та сформованих остеоцитів (рис. 4).

У контрольних зразках на 30-ту добу спостерігалися ділянки незрілої кістки, кількість остео-

бластів та активність формування кісткової тканини була значно нижчою (рис. 5).

На 60- та 90-ту добу в зразках після остеопластики помічено активніше формування кісткової тканини, велику кількість остеоцитів, однак були й залишки незрілої кістки. У контрольних зразках, де загоювання відбувалося під кров'яним згустком, формувалася кістка менш інтенсивно (див. рис. 4, 5).

У разі використання остеопластичного матеріалу реваскуляризація відбувалася інтенсивніше, швидше та в більшій кількості утворювалися кровоносні судини, які формували осередки кісткотворення. Також у разі використання згаданого матеріалу швидше формувалася нова кісткова тканина в ділянці імплантації. В аналогічні терміни спостереження (14-, 30-, 60- та 90-та доба) в регенераті помічено меншу, ніж у контролі, кількість включень хрящової тканини, незрілої кістки та відповідно більше осередків формування кісткової тканини й зрілої кістки (див. рис. 4, 5).

Отже, у разі використання остеопластичного матеріалу найвища активність остеобластів та найбільша кількість судин малого діаметра спостерігалися на 30-ту добу експерименту. У контрольних зразках, де загоювання відбувалося під кров'яним згустком, найвище відсоткове співвідношення судин малого діаметра зауважено на 14-ту добу експерименту.

Висновки

В експерименті регенерація кісткової тканини після остеопластики матеріалом «Остеопласт-К» супроводжувалася підвищенням рівня остеокальцину крові й відповідно — активності остеобластів. Також протягом 3 міс збільшувалася кількість дрібних судин у кістковому регенераті після остеопластики кісткових дефектів ксеногенним матеріалом «Остеопласт-К», що засвідчило інтенсифікацію процесів реваскуляризації та остеогенезу.

Перспективи подальших досліджень. Нові наукові дані можна використати для подальших досліджень кістковопластичних матеріалів та визначення найбільш біологічно сумісного матеріалу.

Література

1. Иванов С.Ю., Бизяев А.Ф., Ломакин М.В., Панин А.М. Клинические результаты использования различных костнопластических материалов при синуслифтинге // Новое в стоматологии. — 2009. — № 5. — С. 51—53.
2. Иванов С.Ю., Гиллер Л.И., Бизяев А.Ф. и др. Новое поколение биокомпозиционных материалов для замещения дефектов костной ткани // Новое в стоматологии. — 1999. — № 5. — С. 47—50.
3. Иванов С.Ю., Ларионов Е.В., Панин А.М. та ін. Разработка биоматериалов для остеопластики на основе коллагена костной ткани // Институт стоматологии. — 2005. — № 4. — С. 1—3.
4. Опанасюк И.В., Опанасюк Ю.В. Костнопластические материалы в современной стоматологии // Совр. стоматол. — 2002. — № 1, Ч. I. — С. 77—80.

5. Расмуссон Л.А. Закрытие локальных дефектов альвеолярного отростка // Новое в стоматологии. — 2011. — № 5. — С. 40—43.
6. Aziz N. Bone grafts and bone substitutes: Basic Science and Clinical Applications — Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2005. — 592 p.
7. Bikramjit Basu, Dhirendra Katti, Ashok Kumar Advanced biomaterials fundamentals, processing, and applications. — John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009. — P. 4—12.
8. Jay R. Lieberman, Gary E. Friedlaender. Bone regeneration and repair: biology and clinical applications. — Rosemont IL: Humana Press, 2005. — 398 p.
9. Joon B. Park, Joseph D. Biomaterials: Principles and Applications, CRC. — New-York: Bronzino press, 2003.
10. Kanczler J.M., Oreffo R.O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone // Eur. Cell Mater. — 2008. — P. 100—114.
11. Markus J. Seibel, Simon P. Robins, John P. Bilezikian. Dynamics of bone and cartilage metabolism. — Academic Press, 2006. — 918 p.

А.В. Палий

Особенности регенерации костной ткани после остеопластики ксеногенным материалом

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

Цель работы — установить особенности и сроки регенерации костной ткани после костной пластики материалом «Остеопласт -К».

Материалы и методы. Определяли уровень остеокальцина в сыворотке крови по методу иммуноферментного анализа с использованием тест-системы N-MID Osteocalcin ELISA (IDS). Особенности реваскуляризации изучали с помощью гистологического метода. Гистологические препараты окрашивали по методу Шморля и гематоксилиновой и эозином.

Результаты и обсуждение. Средние концентрации остеокальцина после имплантации ксеногенного материала были в пределах от $(1,75 \pm 0,04)$ до $(2,9 \pm 0,04)$ нг /мл. После остеопластики к 30- и 60-м суткам количество сосудов размером 15—20 мкм² возрастало, после чего к 90-м суткам процентное соотношение уменьшилось. На 30- и 60-е сутки возросло количество сосудов размером 10—15 и 25—30 мкм². К 60—90-м суткам отмечалось наибольшее количество сосудов размерами 15—20 и 20—25 мкм². В образцах, где заживление проходило под кровяным сгустком, с 14- до 30-х суток увеличивалось количество сосудов площадью 20—25 и 25—30 мкм². В течение эксперимента с 30-х по 60-е сутки постоянно возрастало количество сосудов площадью 10—15 и 15—20 мкм².

Выводы. В эксперименте в процессе регенерации костной ткани после остеопластики ксеногенным материалом установлено повышение уровня остеокальцина крови и соответственно — активности остеобластов. В течение 3 мес увеличивалось количество мелких сосудов в костном регенерате, что свидетельствует об интенсификации процессов реваскуляризации и остеогенеза.

Ключевые слова: остеоинтеграция, костная пластика, остеокальцин, реваскуляризация.

A.V. Paliy

Peculiarities of bone regeneration after the osteoplasty with osteoplastic material

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine

Objective. To determine peculiarities and time of bone tissue regeneration after osteoplasty with «Osteoplast-K» osteoplastic material.

Materials and methods. The blood serum levels of osteocalcin were determined by Elisa with the use of N-MID Osteocalcin Elisa (IDS) test-system. Peculiarities of revascularization were studied by histological method. Histological specimens were stained using Schmorl technique and natural hematoxylin-eosin.

Results and discussion. The mean values of osteocalcin level after «Osteoplast-K» implantation ranged from 1.75 ± 0.04 ng/ml to 2.9 ± 0.04 ng/ml. Number of vessels with area of 15—20 μm^2 increased in case of «Osteoplast-K» use by days 30 and 60 and decreased by the 90th day of experiment. Number of vessels with area of 10—15 μm^2 increased by the days 30 and 60. By the 60th and 90th day of the experiment the highest number of vessels with area of 15—20 μm^2 and 20—25 μm^2 was observed. In samples where healing processes took place under a blood clot number of vessels with area of 20—25 μm^2 and 25—30 μm^2 increased from day 14 till 30. Number of vessels with area of 10—15 μm^2 increased during the period from 30th to 60th day of experiment, and number of vessels with area of 15—20 μm^2 increased during the period from 60th till 90th day.

Conclusions. In the experimental process of bone regeneration after «Osteoplast-K» osteoplasty, it has been established the increase of osteocalcin levels and as a result, the increased osteoblasts'. Moreover, the increase of number of small blood vessels has been revealed in the bone regenerate after the osteoplasty, suggesting the intensification of the revascularization and osteogenesis processes.

Key words: osteointegration, osteoplasty, osteocalcin, revascularization.