УДК 616.716.8-001.5+616.314.163-089.27)-085.46.001.36-092.9
В.М. Зубачик, І.В. Ган

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ОСТЕОТРОПНОЇ ДІЇ ЕНДОДОНТИЧНИХ ПЛОМБУВАЛЬНИХ МАТЕРІАЛІВ НА МОДЕЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДЕСТРУКЦІЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЩЕЛЕПИ ЩУРІВ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Актуальність теми.

Однією з гострих проблем стоматології залишається гарантування якісного ендодонтичного лікування хворих на хронічні форми періодонтиту. Поширеність ускладненого карієсу, який супроводжується набутою широкою верхівкою кореня зуба та наявністю хронічних вогнищ інфекції в навколоапікальних тканинах, зумовлює постійне вдосконалення та пошук нових способів і засобів для щільної обтурації верхівки кореня і стимулювання біоревіталізації та регенерації позаверхівкових тканин [1;2].

Мета дослідження - встановити динаміку репаративних процесів у кістковій тканині під впливом препаратів та композицій для ендодонтичного лікування.

Матеріали та методи.

Експеримент проведено на 120 білих щурах лінії Wistar віком 9-10 тижнів, стадного розведення. Дослідження на лабораторних тваринах проводилося за дотримання принципів біоетики відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), положення Закону України № 3447-IV „Про захист тварин від жорстокого поводження" і було схвалено місцевим комітетом із питань етики. Для створення дефекту кістки втручання проводили під наркозом (0,5 мл 4 % розчину тіопенталу натрію всередину очеревини). Щурам із лівого боку нижньої щелепи в ділянці між різцем та правим моляром скальпелем робили трапецієподібний розтин та відсепаровували слизову оболонку. Кулястим і фісурним борами створювали дефект кісткової тканини діаметром 3 мм та глибиною 2,5 мм під постійним зрошенням 0,9 % фізіологічним розчином, який заповнювали досліджуваними біоматеріалами або залишали з кров'яним згустком та закривали слизовою оболонкою і накладали шви. Усіх тварин було поділено на 6 дослідних груп по 20 особин у кожній: перша група – інтактні тварини, які слугували контролем; друга група порівняння – тварини, яким було створено дефект кісткової тканини без уведення біоматеріалу; третя група – тварини, яким для заповнення дефекту використовували матеріал «Nano Gen»; четверта група – тварини, яким у створений дефект вносили мінерал триоксид- агрегат (МТА); п'ята група – тварини, яким дефект заповнювали композицією на основі бета–трикальцій фосфату (β-ТКФ); шоста група – тварини, яким у створений дефект кісткової тканини вносили аналогічну композицію на основі гідроксіапатиту кальцію та органічних біоревіталізантів (ГА) (Патент на корисну модель № 95974, Україна). Тварин, окрім групи контролю, в перші три дні після початку експерименту утримували на щадній дієті, а далі – в умовах стандартного харчового раціону та згідно із санітарно-гігієнічними нормами у віварії. З експерименту щурів виводили на 15 та 90 добу шляхом декапітації під наркозом. Для біохімічних досліджень використовували ділянку нижньої щелепи альвеолярного відростка зони дефекту. У гомогенатах кісткової тканини досліджували активність лізосомальних ферментів – лужної (ЛФ) та кислої (КФ) фосфатаз, уміст кальцію і фосфору.

Результати досліджень.

У тварин зі створеним дефектом кісткової тканини без уведення біоматеріалу на 14 добу встановлено зростання вмісту лізосомального ферменту КФ в 1,5 раза порівняно з показниками в інтактній кістці (табл. 1). Аналогічні результати отримано в групах тварин, деструкція кісткової тканини яких була заповнена біоматеріалами МТА та «Nano Gen» ($p<0,001$). А в групах тварин, де використовували композиції на основі ГА та β-ТКФ, спостерігали зростання вмісту КФ лише в 1,2 та 1,3 раза відповідно ($p<0,001$). КФ є біомаркером кісткової тканини, який характеризує активність остеокластів та інтенсивність остеолізису [3;4]. Тому висока її концентрація в II, III і IV групах тварин указує на вищу активність остеокластів і свідчить про гостріший перебіг запального процесу порівняно з тваринами в V і VI групах, яким деструкцію кісткової тканини було заповнено композиціями. Одночасно з тим спостерігали зміни вмісту й іншого біомаркера кісткової тканини – ЛФ. У II групі тварин активність ферментів зросла в 1,25 раза ($p<0,001$), а в III і IV групах тварин - у 1,3 раза ($p<0,001$) порівняно з контрольною групою тварин. У V і VI досліджуваних групах концентрація ЛФ підвищилася в 1,9 раза ($p<0,001$) порівняно з інтактною кісткою. ЛФ є маркером активності остеобластів і характеризує інтенсивність остеогенезу. Отже, вища концентрація ЛФ у гомогенаті кісткової тканини, дефект якого був заповнений композиціями на основі ГА та β-ТКФ, свідчить про збільшення кількості остеобластів та підвищення їхньої функціональної активності, що сприяє інтенсивнішому остеогенезу в зоні деструкції [5; 6].

Активність процесів остеогенезу та остеолізису під час регенерації кістки характеризує індекс мінералізації, який визначається співвідношенням ЛФ/КФ. У II, III і IV групах тварин індекс знизився на 18%, 16% і 14 % відповідно порівняно з інтактними тваринами, що свідчить про переважання процесів остеолізису над остеогенезом [7; 8]. А в V і VI групах тварин спостерігається зростання індексу на 44 % та 47 % відповідно, що вказує на переважання регенераторних процесів остеогенезу.

Таблиця 1

Показники активності ЛФ мккат/кг і КФ мккат/кг у гомогенатах кісткової тканини щурів (M±m)

Групи тварин Дослідні препарати	Терміни спостереження					
	14 доба			90 доба		
	КФ	ЛФ	ЛФ/КФ	КФ	ЛФ	ЛФ/КФ
I. Контроль (n=5)	1,58±0,02	20,2±0,3	12,8	1,58±0,02	20,2±0,3	12,8
II. Група порівняння (n=10)	2,41±0,02 ***	25,3±0,3 ***	10,5	1,69±0,03 ***	21,1±0,3 *	12,5
III. «Nano Gen» (n=10)	2,39±0,01 ***	25,8±0,2 *** °	10,8	1,65±0,03	20,6±0,3	12,5
IV. МТА (n=10)	2,38±0,02 ***	26,2±0,3 *** °	11,0	1,64±0,03	21,3±0,3 **	13,0
V. Композиція на основі β-ТКФ (n=10)	1,98±0,03 *** °°°	36,6±0,2 *** °°°	18,5	1,61±0,03 °	22,7±0,4 *** °°	14,1
VI. Композиція на основі ГА (n=10)	1,97±0,03 *** °°°	37,2±0,4 *** °°°	18,9	1,60±0,02 *** °°	23,1±0,3 *** °°	14,5

Примітка:- показник вірогідності різниці порівняно з контролем при p < 0,05;*
***- p < 0,01;*
****- p < 0,001; °- показник вірогідності різниці порівняно з групою порівняння при p < 0,05, °°- p < 0,01, °°°- p < 0,001.*

Через 90 діб після моделювання деструкції активність ЛФ і КФ у кістковій тканині знижувалася та наближалася до значень їхньої активності в групі інтактних тварин, що свідчить про відновлення балансу процесів остеогенезу і остеолізису [9; 10].

Уміст іонів кальцію на 14 добу дослідження у II і III групах тварин (табл. 2) знизився в 1,8 раза, у IV групі – в 1,6 раза, в V дослідній групі – в 1,5 раза та в VI – у 1,3 раза відносно показників групи контролю і є істотним у всіх дослідних групах (p<0,001). А вміст іонів фосфору в II, III та IV групах тварин знижується в 1,8; 1,7 та 1,5 раза відповідно; в V дослідній групі – в 1,4 раза і в VI дослідній групі – в 1,3 раза відносно показників групи контролю (p<0,001). Зниження індексу співвідношення кальцію і фосфору вказує на дефіцит кальцію порівняно з фосфором.

На 90 добу дослідження вміст іонів кальцію в II, III групах знижується в 1,6 раза, у IV групі – в 1,3 раза, а в V і VI дослідних групах – у 1,1 та 1,01 раза відповідно відносно показників групи контролю (p<0,001). Уміст іонів фосфору в II , III групах тварин знизився в 1,5раза , в IV групі – в 1,3 раза, а в V і VI дослідних групах – у 1,1 раза відносно показників групи контролю (p<0,001). Зниження індексу співвідношення кальцію і фосфору на 90 добу в порівнянні з 14 добою свідчить про сповільнення процесів кальцифікації [11; 12].

Таблиця 2

Показники вмісту кальцію ммоль/л і фосфору ммоль/л у гомогенатах кісткової тканини щурів (M±m)

Групи тварин	Терміни спостереження					
	14 доба			90 доба		
	кальцій	фосфор	кальцій/фосфор	кальцій	фосфор	кальцій/фосфор
I. Контроль (n=5)	13,31±0,11	5,70±0,13	2,33	13,31±0,11	5,70±0,13	2,33
II. Група порівняння (n=10)	7,14±0,07 ***	3,13±0,11 ***	2,28	8,02±0,13 ***	3,81±0,12 ***	2,11
III. «Nano Gen» (n=10)	7,29±0,09 ***	3,20±0,11 *** °°°	2,28	8,19±0,11 ***	3,88±0,12 ***	2,11
IV. МТА (n=10)	8,27±0,13 *** °°°	3,61±0,09 *** °°°	2,29	10,01±0,12 *** °°°	4,57±0,10 *** °°°	2,19
V. Композиція на основі β-ТКФ (n=10)	8,85±0,09 *** °°°	3,85±0,09 *** °°°	2,30	11,43±0,14 *** °°°	4,99±0,10 *** °°°	2,29
VI. Композиція на основі ГА (n=10)	9,82±0,12 *** °°°	4,27±0,11 *** °°°	2,30	11,76±0,14 *** °°°	5,09±0,13 *** °°°	2,31

*Примітки: *- показник вірогідності різниці порівняно з контролем при p < 0,05;*
***- p < 0,01;*
****- p < 0,001; °- показник вірогідності різниці порівняно з групою порівняння при p < 0,05, °°- p < 0,01, °°°- p < 0,001.*

Висновок

1. Остеотропні композиції на основі бета-трикальцій фосфату та гідроксіапатиту кальцію стимулюють процеси остеогенезу більше, ніж препарати МТА та «Nano Gen», впливаючи на мінералізуючу функцію, про що свідчить підвищення вмісту ЛФ і зниження концентрації КФ, а також збільшення їхнього показника мінералізації.

2. Наближення до норми показника співвідношення кальцію і фосфору в гомогенаті кісткової тканини, дефект якого був заповнений композиціями на основі гідроксіапатиту кальцію та бета-трикальцій фосфату, порівняно з групами тварин, у зону деструкції яких було внесено МТА та «Nano Gen», указує на позитивний вплив запропонованих композицій на процеси кальцифікації, які інтенсивніше відбуваються на 15 добу дослідження та дещо сповільнюються до 90 доби.

3. Аналіз результатів остеотропної дії ендодонтичних пломбувальних матеріалів на моделі експериментальної деструкції кісткової тканини щелепи щурів свідчить про краще стимулювання репаративних процесів у кістковій тканині композиціями на основі гідроксіапатиту кальцію і бета-трикальцій фосфату.

Перспективи подальших досліджень.

Планується розробити методику пломбування апікальної ділянки кореня досліджуваними композиціями для підвищення ефективності лікування хронічного періодонтиту з набутими широкими верхівками коренів.

Література

1. Піляєв А.Г. Вивчення ймовірності успішного результату лікування хронічних періодонтитів у зубах із зруйнованим апікальним отвором / А.Г. Піляєв, І.О. Юровська, Л.І. Косарєва // Зб. статей. – 2013. – Вип. 17, т. 1. – С.313–315.
1. 2. Юровська І.О. Клініко – морфологічні особливості перебігу та лікування хронічного періодонтиту в зубах з різним станом апікальної констрикції: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.22 „Стоматологія" / І.О. Юровська. – К., 2011. – 20 с.
2. Деньга О.В. Біохімічні показники колозубних тканин при експериментальній терапії періодонтиту / О.В. Деньга, Д.Б. Цевух, А.П. Левицький // Вісник стоматології. – 2007. – №4. – С.40–45.
3. Любченко О.В. Порівняльна оцінка протизапальних та антиоксидантних властивостей пломбувальних цементів „Ретапекс" і „PRO ROOT MTA" на моделі експериментального періодонтиту / О.В. Любченко // Вісник стоматології. – 2011. – №2. – С. 5–9.
4. Рубленко М.В. Динаміка біомаркерів репаративного остеогенезу за умов заміщення кісткового дефекту / Рубленко М.В., Семеняк С.А., Ульянчич Н.В. // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – 2014. – Т. 16, – №3 (60). – С. 278 – 294.
5. Лисенко О.С. Остеостимулююча активність остеотропних композицій на основі наноструктурованої біокераміки / О.С. Лисенко, А.П. Левицький, А.В. Борисенко // Вісник стоматології. – 2014. – №1. – С. 2 – 7.
6. Івченко А.В. Хімічний склад регенерату кісткової тканини, що формується в місці дефекту, на фоні стрептозотоцинового діабету у щурів статевозрілого віку / А.В. Івченко // Запорожский медицинский журнал. – 2012. – №1 (70). – С. 14 – 16.
7. Прочан В. Н. Химический состав костей скелета у белых крыс разного возраста при нанесении механических дырчатых дефектов большеберцовых костей / В. Н. Прочан // Український медичний альманах. – 2010. – Т. 13, №4. – С. 152 – 155.
8. Chemical composition features of the regenerate of metadiaphyseal defects filled with materials based on biogenic hydroxyapatite / [V.I. Luzin, V.K. Ivchenko, A.V. Ivchenko [et al.] //Ortopedia, Traumatologia, Rehabilitacja. - 2005. – Vol. 7 (Suppl. 1). – P.69.
9. Sousa C. Serum total and bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activities for the assessment of bone fracture healing in dogs / C. Sousa, H. Abreu, C. Viegas // Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. – 2011. - Vol 63. – P.1007-1011.
10. The efficacy of the bone markers osteocalcin and the carboxyterminal cross-linked telopeptide of type-I collagen in evaluating osteogenesis in a canine crural lengthening model / Theyse L., Mol J.A., Voorhout G. [et al.] // Vet. J. – 2005. -Vol.171. – P.525-531.
11. 12. Monitoring of osteoblast activity with an immunoradiometric assay for determination of bone alkaline phosphatase mass concentration in patients receiving renal transplantats / Withold W., Degenhardt S., Castelh D. [et al.] // ClinicaChimicaActa, 1994. - Vol. 225. – P. 137-146.

Стаття надійшла 22.02.2016 р.

Резюме

Наведено порівняльну оцінку динаміки репаративного процесу в кістковій тканині під впливом препаратів МТА та «Nano Gen» і композицій на основі бета-трикальцій фосфату і гідроксіапатиту кальцію, які містять органічні біоревіталізанти. Експеримент було проведено на 120 білих щурах, яким створювали дефект кісткової тканини та заповнювали його досліджуваними біоматеріалами. З досліду тварин виводили на 15 та 90 добу шляхом декапітації під наркозом і в гомогенатах кісткової тканини яких досліджували активність лізосомальних ферментів – лужної та кислої фосфатаз, уміст кальцію і фосфору. Вища концентрація лужної фосфатази і нижча кислої фосфатази та наближення до норми співвідношення кальцію і фосфору в гомогенаті кісткової тканини, дефект якого був заповнений композиціями на основі гідроксіапатиту кальцію та бета-трикальцій фосфату, порівняно з групами тварин, у зону деструкції яких було внесено МТА та «Nano Gen», указує на активніше стимулювання остеогенезу і кальцифікацію кісткової тканини.

Ключові слова: біоматеріали, регенерація, експеримент, лужна і кисла фосфатаза, кальцій, фосфор.

Резюме

Приведена сравнительная оценка динамики репаративного процесса в костной ткани под влиянием препаратов МТА и «Nano Gen» и композицій, содержащих бета-трикальций фосфат и гидроксиапатит кальция, а также включающих органические биоревитализанты. Эксперимент был проведен на 120 белых крысах, которым создавали дефект костной ткани и заполняли его исследуемыми биоматериалами. С эксперимента животных выводили на 15 и 90 сутки путем декапитации под наркозом и в гомогенатах костной ткани которых исследовали активность лизосомальных ферментов - щелочной и кислой фосфатаз, содержание кальция и фосфора. Более высокая концентрация щелочной фосфатазы и низкая кислой фосфатазы и приближение к норме соотношения кальция и фосфора в гомогенате костной ткани, дефект которого был заполнен композициями на основе гидроксиапатита кальция и бета-трикальций фосфата, по сравнению с группами животных, в зону деструкции которых были внесены МТА и «Nano Gen», указывает на более активное стимулирование остеогенеза и кальцификацию костной ткани композициями.

Ключевые слова: биоматериалы, регенерация, эксперимент, щелочная и кислая фосфатазы, кальций, фосфор.

UDC 616.716.8-001.5+616.314.163-089.27)-085.46.001.36-092.9

COMPARATIVE EVALUATION OF OSTEOTROPIC ACTION OF ENDODONTIC FILLING MATERIALS ON THE MODEL OF EXPERIMENTAL DESTRUCTION OF BONE TISSUE OF THE JAW OF RATS

Volodymyr Zubachyk, Iryna Han

Danylo Halytsky i National Medical University , Lviv

Department of Therapeutic Dentistry

Summary

The purpose of our research was to determine the dynamics of reparative processes in the bone tissue under the influence of drugs and compositions.

The experiment was conducted on 120 white rats Wistar line, aged 9-10 weeks, herd breeded. To create a bone defect intervention was performed under general anesthesia (0.5 ml 4% solution of sodium thiopental into the peritoneum). On the left side of the lower jaw of the animals in the area between the incisor and right molar was created bone defect which was filled with studied biomaterials or was left with grume. All animals were divided into 6 research groups and 20 individuals in each: first group - intact animals that were served as a control; second comparative group - animals on which bone defect was created without entering the biomaterial; the third group - animals on which material Nano Gen to fill the defect was used; fourth group - animals, on which mineral trioxide aggregate (MTA) in the created defect was entered; fifth group – animals, which defect was filled with the composition based on beta-tricalcium phosphate (β-TCP); sixth group – animals, which created defect in a bone was entered with the composition made from calcium hydroxyapatite (HA). From the experiment the rats were taken out after 15 and 90 days. For biochemical studies dissection of the lower jaw alveolar sprout defect area was used. In homogenates of bone fabric the activity of lysosomal enzymes - alkaline (ALP) and acid (CF) phosphatase, calcium (Ca) and phosphorus (P) was examined.

Results. In 14 days in the second group of animals KF content increased in 1.5 times compared to the data in intact bone (Table 1). Similar results were obtained in the third and fourth experimental groups ($p < 0.001$). In V and VI groups of animals was observed growth of KF content only in 1.2 and 1.3 times, in accordance ($p < 0.001$). CF is a biomarker of bone tissue, which characterizes the activity of osteoclasts and intensity of osteolysis. Therefore, its high concentration in II, III and IV groups of animals indicates higher activity of osteoclasts and shows sharper course of inflammation compared to animals of V and VI groups.

Simultaneously, changes of the content and the other biomarker of bone fabric – ALP were observed. In the second group of animals the enzyme activity increased in 1.25 times ($p < 0.001$), and in the III and IV groups of animals - in 1.3 times ($p < 0.001$) compared to the control group of animals. In the V and VI of research groups – in 1.9 times ($p < 0.001$) compared to intact bone. LF is a marker of osteoblasts' activity and characterizes intensity of osteogenesis.

Activity of processes of osteogenesis and osteolysis during bone regeneration characterizes the index of mineralization, which is defined by LF / CF. (). In the II, III and IV groups of animals index decreased by 18%, 16% and 14% in accordance compared to intact animals, demonstrating the predominance of processes of osteolysis over osteogenesis. In the V and VI groups of animals was observed the increase of the index by 44% and 47% in accordance, indicating a prevalence of regenerative processes of osteogenesis.

For 90 day after modeling of degradation activity of LF and CF in the bone tissue was decreasing and approaching to the values of their activity in the group of intact animals, indicating the restoration of balance of processes of osteogenesis and osteolysis. However, analysis of the results shows that in the V and VI experi-

mental groups content of KF is the lowest and almost closed to the value of intact animals (p> 0.05), while LF content remains the highest among all the indicators of research groups (p <0.001), indicating a decrease of the function of osteoclasts and stimulation of the activity of osteoblasts and proves that the proposed compositions stimulate osteogenesis the most actively.

The content of calcium ions on the 14 day of study in the II and III groups of animals (table 2) decreased in 1,8 times, and in the IV group – in 1,6 times in the V experimental group – 1,5 times and in the VI - in 1,3 times relatively the indicators of control group and is essential in all experimental groups (p <0.001). A content of ions of phosphorus in the II, III and IV groups of animals is reduced in 1,8; 1,7 and 1,5 times accordingly in the experimental group V - 1.4 times and VI in the experimental group - 1.3 times relatively to the indicators of the control group (p <0.001). Reducing of index of correlation of calcium and phosphorus points on the calcium deficiency compared to phosphorus.

For the 90 day of the study content of calcium ions in the II, III groups is reduced in 1,6 times, in the IV group – in 1,3 times, and in the V and VI experimental groups - in 1,1 and 1,01 times in accordance relatively to the indicators of control group (p <0.001). The content of phosphorus ions in the II , III groups of animals has decreased in 1,5 times, in the IV group – in 1,3 times, and in the V and VI of experimental groups - in 1.1 times relatively to the indicators of the control group (p <0.001). Reducing of index of correlation of calcium and phosphorus on the 90 day compared to the 14 day indicates a deceleration of calcification processes.

Osteotropic compositions based on beta tricalcium phosphate and calcium hydroxyapatite stimulate more processes of osteogenesis than drugs MTA and Nano Gen, affecting on mineralized function that shows the increasing of te content of ALP, reducing the concentration of CF and, in addition, increasing their indicator of mineralization. Approaching to the normal indicator of correlation of calcium and phosphorus points on the positive impact of the proposed compositions on calcification processes.

The article presents a comparative assessment of the dynamics of the reparative process of the bone tissue under the influence of drugs MTA and Nano Gen and compositions based on the beta-tricalcium phosphate and calcium hydroxyapatite, containing organic biorevitalizants. The experiment was conducted on 120 white rats, on which a bone defect was made and was filled with investigative biomaterials. From the experience animals were taken for 15 and 90 days by decapitation under anesthesia and in homogenates of bone tissue which were investigated of the activity of lysosomal enzymes - alkaline and acid phosphatase, content of calcium and phosphorus. Higher concentrations of alkaline phosphatase, below the acid phosphatase and the approximation to the normal correlation of calcium and phosphorus in the homogenate bone, defect of which was filled with compositions based on hydroxyapatite calcium and beta-tricalcium phosphate, compared to the groups of animals in the area of degradation that have been bringing in MTA and Nano Gen indicates at more active stimulating of osteogenesis and calcification of bone tissue.

Keywords: biomaterials, regeneration, experiment, alkaline and acid phosphatase, calcium, phosphorus.