

**МОРФОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ, ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТА
И НЕДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

И.Ю. ПЕТРОВ*, Е.В. ЛАРИОНОВ**, Ю.А. ИППОЛИТОВ*, Л.В. БУТ*, А.И. ПЕТРОВ*

*ФГБОУ ВО Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко,
ул. Студенческая, 10, Воронеж, 394000, Россия

**ООО «НПК ВИТАФОРМ», ул. Дубки, д. 4, кв. 53, Москва, 127318, Россия

Аннотация. В настоящее время ведется поиск и разработка новых биологических и синтетических агентов, добавление которых в имплантируемый костезамещающий материал будет способствовать улучшению репаративной регенерации костной ткани в месте дефекта. Цель настоящего исследования – морфогистохимическое изучение влияния остеопластического материала на основе гиалуроновой кислоты, хондраитинсульфата и недеминерализованного коллагена на восстановление экспериментальных костных дефектов. Материалы и методы: в работе использовали 20 кроликов породы Шиншилла, которые были разделены на 2 группы, опытную и контрольную. Под местной анестезией бором формировали дефекты в гребне подвздошной кости, которые заполняли биоматериалом. В первой группе (опытной) в созданный дефект имплантировали исследуемый материал, состоящий из биокomпозиции гиалуроновой кислоты, хондраитинсульфата и недеминерализованного коллагена, во второй группе (контрольной) дефект заполняли крошкой недеминерализованного коллагена. Животных выводили из эксперимента в сроки 2 недели, 1,2 и 3 месяца. Результаты и выводы: проводили гистоморфологические и гистохимическое исследование образцов костной ткани, которые позволили сделать вывод о том, что разработанный остеопластический материал на основе гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и недеминерализованного коллагена обладает эффективным стимулирующим действием на репарацию костного дефекта, препятствует развитию воспаления и фиброза, способствует образованию новой костной ткани, что делает возможным его применение при восстановлении костных дефектов при оперативных вмешательствах в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, костный недеминерализованный коллаген, восстановление костных дефектов, остеопластический материал.

**MORPHOHISTOCHEMICAL STUDIES OF OSTEOPLASTIC MATERIAL BASED
ON HYALURONIC ACID, CHONDROITINSULFATE AND UNDER-MINERALIZED BONE
COLLAGEN FOR BONE DEFECTS RECOVERY IN EXPERIMENT**

I.YU. PETROV*, E.V. LARIONOV**, YU.A. IPPOLITOV*, L.V. BUT*, A.I. PETROV*

*Russian Federation Voronezh State N.N. Burdenko Medical University,
Studencheskaya Str., 10, Voronezh, 394000, Russia

**Scientific Production Company «Vitaphorm», Dubki Str., 4, app. 53, Moscow, 127318, Russia

Abstract. Currently, a search and development of new biological and synthetic agents are being conducted, the addition of which to the implantable bone replacement material will help improve the repair of bone tissue regeneration at the site of the defect. The research purpose is a morphohistochemical study of the effect of osteoplastic material based on hyaluronic acid, chondroitin sulfate and non-demineralized collagen on the restoration of experimental bone defects. Materials and Methods: The authors used 20 Chinchilla rabbits, which were divided into two groups, experimental and control. Under local anesthesia, boron formed defects in the crest of the ilium, which was filled with biomaterial. In the first group (experimental), the test material consisting of a biocomposition of hyaluronic acid, chondroitin sulfate and non-demineralized collagen, was implanted in the created defect. In the second group (control) the defect was filled with a crumb of non-dimineralized collagen. The animals were taken out of the experiment in terms of 2 weeks, 1, 2 and 3 months. Results and conclusions: the authors carried out a histomorphological and histochemical study of bone tissue samples that led to the conclusion that the developed osteoplastic material based on hyaluronic acid, chondroitin sulfate and non-demineralized collagen has an effective stimulating effect on the repair of bone defect, prevents the development of inflammation and fibrosis, promotes the formation of a new bone tissue. This enables its use in the reduction of bone defects during surgery in surgical dental and maxillofacial surgery.

Key words: hyaluronic acid, chondroitin sulfate, bone non-demineralized collagen, restoration of bone defects, osteoplastic material.

Определенные дефекты костной ткани или ее возрастная утрата, патологические состояния не могут быть устранены путем ее физиологической регенерации или благодаря простому хирургическому вмешательству [1]. В таких случаях для восстановления ткани, как правило, применяются биоматериалы или их синтетические аналоги, способные либо механически выполнять функции кости, либо оказывать индуцирующее влияние на процессы регенерации.

В настоящее время существует большое количество разнообразных биопластических материалов, которые обладают остеокондуктивными и/или остеоиндуктивными свойствами [1]. Материалы, содержащие практически чистый гидроксиапатит, проявляют главным образом кондуктивные свойства. Другая группа материалов представляет собой либо полностью или частично деминерализованную костную ткань, либо некоторые компоненты данной ткани, а также их сочетания с факторами роста и/или биологически активными субстанциями, обладающими способностью индуцировать остеогенез или направленно влиять на обменные процессы в формирующейся кости [2, 4].

Современные остеопластические материалы должны быть эффективными, безопасными, хорошо заполнять объем костного дефекта, обладать остеокондуктивной и остеоиндуктивной функциями, способствовать формированию новой кости. В настоящее время ведется поиск и разработка новых биологических и синтетических агентов, добавление которых в имплантируемый костезамещающий материал будет способствовать улучшению микроциркуляции в области операции; ускорению прорастания, сосудов и репаративной регенерации костной ткани в месте дефекта [3].

Особую роль в формировании и построении костной ткани играют матричные сложные полисахариды (гиалуроновая кислота, хондроитин и гепаран сульфаты [2, 4, 10]. Важным матричным компонентом соединительной ткани, особенно развивающейся, является несультатированный гликозаминогликан – гиалуроновая кислота (ГК) [7, 11].

Как когезивный вископротектор ГК характеризуется относительно прочными соединениями молекулярных цепочек между собой, за счет чего раствор ГК ведет себя как единая масса, поддерживающая объем полостей и дефектов [5]. Это свойство широко используется в косметологии, ортопедии и офтальмохирургии [8].

В настоящее время в научной литературе имеются единичные сообщения об экспериментальных исследованиях ГК и морфогенетических белков при восстановлении костных дефектов [11]. Однако ее роль в восстановлении и заживлении костной ткани остается малоизученной.

Цель исследования – морфогистохимическое изучение влияния остеопластического материала на основе гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и недеминерализованного коллагена на восстановление экспериментальных костных дефектов.

Материалы и методы исследования. В работе использовали отечественный биоматериал – недеминерализованный костный коллаген, выделенный из кости быка (производство ООО «НПК ВИТАФОРМ» г. Москва) в виде крошки, который смешивали с композицией ГК (М.в. 550 000-800 000 Da) и хондроитин сульфат (*Bioiberica*, Испания).

Полученную таким образом композицию использовали в виде костной крошки размером 700-2000 мкм, стерилизованной потоком быстрых электронов (Патент РФ № 2517037).

Исследования действия композиции на состояние костного дефекта проводили на кроликах породы Шиншилла (всего 20 животных), которые были разделены на две группы – опытную и контрольную, в каждой из которых было по 10 животных.

Хирургические вмешательства выполнялись под местной анестезией Рометаром 20,0 мл (Чехия) в дозировке 0,1 мг на кг массы тела.

Под местной анестезией *Sol. Lidokaini 1% – 2 ml* проводили линейный разрез на боковой поверхности, в проекции подвздошной кости, делали горизонтальный разрез размером до 3,0 см с последующим скелетированием кости. Остеотомом цилиндрической формы диаметром 3,0 мм со скоростью вращения 100 оборотов в 1 минуту перпендикулярно кости создавали костные дефекты, глубиной до 1,0 см у всех 20 кроликов.

В первой (опытной) группе животных дефект заполняли недеминерализованным костным коллагеном, выделенным из губчатой кости и содержащим гликозаминогликаны, смешанные предварительно с ГК в пропорции 1:3. Сверху укладывалась коллагеновая мембрана (производство «НПК ВИТАФОРМ» г. Москва), рана покрывалась антисептиком. Во второй группе (контрольной) 10 кроликам в полости, образованные фрезой, дефект заполняли недеминерализованным костным коллагеном. Сверху укладывалась коллагеновая мембрана, рана покрывалась антисептиком (рис. 1).

Место хирургического вмешательства ушивалось послойно во избежание разрыва мягкотканых лоскутов с использованием нитей из рассасывающего полилактина 910 (викрил 5/0, производитель «Этикон», Саммервиль, США). Животных держали на обычной диете в течение трех месяцев.

Кроликов выводили из эксперимента через две недели, один и три месяца по два животных в каждой группе – эвтаназией путем передозировки препарата «Зоолетил» в соответствии с рекомендациями МЗРФ.

После выведения животных из эксперимента и удаления из подвздошной области фрагментов кости – они были погружены в свежеприготовленный 10% нейтральный буферизованный формалин для фиксации на 10-14 дней.

Для проведения гистологических и гистохимических методов исследования после фиксации фрагмент промывали в проточной воде не менее двух суток. После деминерализации костных фрагментов готовили парафиновые срезы и окрашивали морфологические препараты с помощью гематоксилина Карацци-эозин, а также для идентификации ГК проводили гистохимическую окраску с помощью реакции с ферригидроксизолем при $pH\ 2,0$.

Изучение препаратов и фотографирование выполняли с помощью микроскопа *Motic* и фотокамеры *MoticCam* (Испания).

Результаты и их обсуждение. В опытной группе животных через две недели после операции остеопластический материал полностью заполнил объем дефекта без пустот и полостей, ограничивая зону дефекта по периферии от окружающих тканей.

При гистохимической окраске срезов ферригидроксизолем на ГК видно, что полость дефекта заполнена раствором ГК, который окружает крошку недеминерализованного коллагена (рис. 2).

При большем увеличении (рис. 3.) видно начало развития фиброваскулярной ткани вокруг остеопластического материала обеспечивают активное замещение дефекта на этот срок наблюдения.

На некоторых препаратах отмечали усиление пролиферации сосудов, которые обычны для реакций на имплантацию материалов в этой фазе заживления. Моно и полиморфонуклеаров в зоне дефекта не выявляли, участков развития фиброзных изменений и воспаления тканей в дефекте не отмечали. При заполнении дефекта недеминерализованным коллагеном контрольным животным в течение двухнедельного срока (рис. 4) наблюдали заполнение дефекта фиброваскулярной тканью с начальными зонами оформления остеоида. Каких-либо воспалительных реакций или отторжений материалов на данный срок наблюдения в опытной и контрольной группах не отмечали.

Гистохимическая картина опытных образцов через один месяц после операции была следующей (рис. 5): ГК локализуется в основном в межучасточном веществе вокруг трабекул новой костной ткани и в частицах крошки. Это доказывает ее непосредственное участие в построении нового костного матрикса, в частности, коллагена типа I, в построении хрящевой ткани, содержащей в основном коллаген типа II и формировании пограничной зоны между хрящевой и костной тканью.

Присутствие в материале ГК и хондраитинсульфата придает имплантированному материалу когезивно-адгезивные свойства, которые определяют основные свойства всей композиции – активно влиять на процессы хондро- и остеорепарации на ранних стадиях заживления костного дефекта.

На контрольных препаратах (срок один месяц после операции) также наблюдается процесс активного заживления (рис. 6), зона дефекта заполняется новой костной тканью с меньшей плотностью по сравнению с опытными.

Через два месяца после операции на опытных препаратах наблюдали дальнейший процесс активной остеорепарации. В этот период наблюдения костный дефект снаружи закрыт зрелой хрящевой тканью.

Гистохимическая окраска на ГК показала, что в прикортикальных слоях частицы остеопластического материала погружены в новый костный матрикс. В губчатой зоне дефект полностью заполняется новой костной тканью, формируются множественные трабекулы и балки. Частицы недеминерализованного коллагена подвергаются частичной фрагментации, ГК имеет сетчатую структуру и заключена в новую костную ткань новой кости. В отдельных участках дефекта определяли зоны ремоделирования.

Через три месяца после операции зона дефекта на опытных препаратах трудно определяется. В области бывшего дефекта имеется вновь сформированная костная ткань в прикортикальной зоне с развитыми остеонами, хорошо развитыми линиями склеивания, которые на данный срок наблюдения выглядят несколько неравномерными. Костная ткань плотная без полостей и разрывов.

На рис. 7 представлены места локализации ГК через три месяца после операции. Костный дефект заполнен практически зрелой костной тканью.

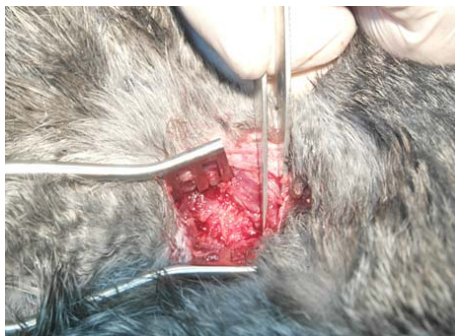


Рис. 1. Ход операции. Остеопластический материал укладывается в дефект гребня подвздошной кости

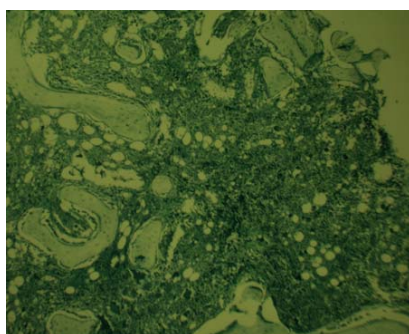


Рис. 2. Гистохимическая картина участка поперечного среза дефекта подвздошной кости, заполненного остеопластическим материалом через 2 недели после операции. Опытная группа. Фиксация 10% формалин. Окраска ферригидроксизолем. Световая микроскопия. Ув.×140 крат.

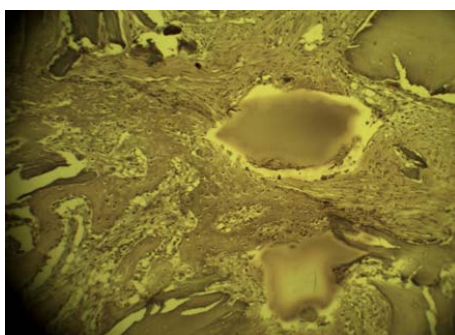


Рис. 3. Гистологическая картина участка среза дефекта кости, заполненного остеопластическим материалом через 2 недели после операции. Опытная группа. Фиксация 10% формалин. Окраска гематоксилин эозин. Световая микроскопия. Ув.×240 крат.

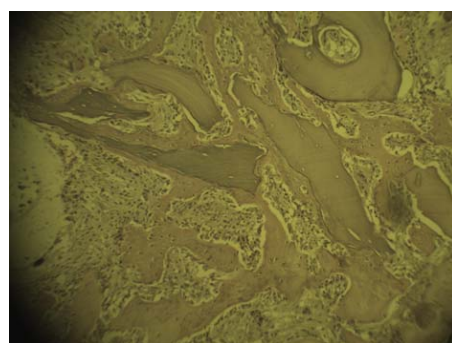


Рис. 4. Гистологическая картина участка среза дефекта кости, заполненного недеминерализованным костным коллагеном через 2 недели после операции. Контрольная группа. Фиксация 10% формалин. Окраска гематоксилин эозин. Световая микроскопия. Ув.×240 крат.

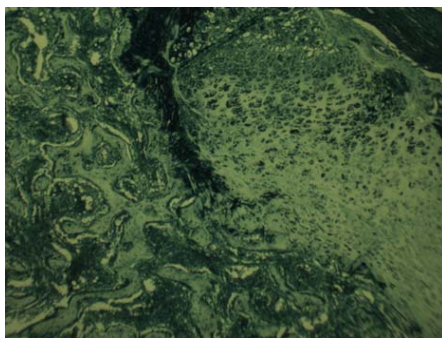


Рис. 5. Гистохимическая картина участка поперечного среза дефекта подвздошной кости, заполненного остеопластическим материалом через 1 месяц после операции. Опытная группа. Фиксация 10% формалин. Окраска ферригидроксизолем. Световая микроскопия. Ув.×140 крат.

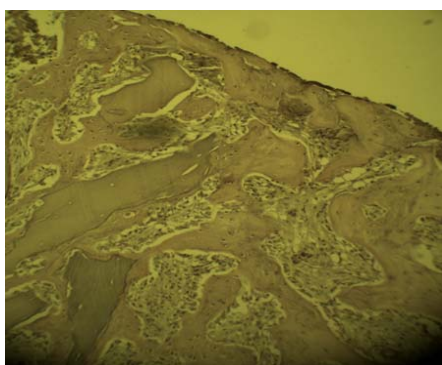


Рис. 6. Гистологическая картина участка среза дефекта кости, с недеминерализованным коллагеном через 1 месяц после операции. Контрольная группа. Фиксация 10% формалин. Окраска гематоксилин эозин. Световая микроскопия. Ув.×140 крат.

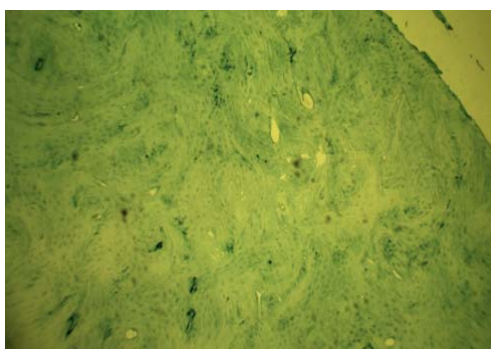


Рис. 7. Гистохимическая картина участка в зоне среза дефекта подвздошной кости, заполненного остеопластическим материалом через 3 месяца после операции. Опытная группа. Фиксация 10% формалин. Окраска ферригидроксизолем. Световая микроскопия. Ув.×140 крат.

Заключение. Таким образом, комплекс остеопластического материала – *гиалуроновая кислота*, хондроитинсульфат, недеминерализованный коллаген – играют ключевую роль в организации внеклеточного матрикса на каждой фазе восстановления и заживления соединительной ткани после повреждения.

Присутствие в остеопластическом материале *гиалуроновой кислоты* и хондроитинсульфата придает имплантированному материалу когезивно-адгезивные свойства, которые определяют основные свойства всей композиции – активно влиять на процессы хондро- и остеорепарации на ранних стадиях заживления костного дефекта.

Разработанный отечественный остеопластический материал на основе *гиалуроновой кислоты*, хондроитинсульфата и недеминерализованного костного коллагена способствует восстановлению хрящевой и костной ткани, снижает воспалительные реакции, препятствует развитию фиброза, что делает перспективным его широкое применение при различных оперативных вмешательствах в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Литература

1. Белозеров М.Н. Оценка остеопластических свойств различных биокomпозиционных материалов для заполнения дефектов челюстей: дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2004. 146 с.
2. Иванов С.Ю. Исследование влияния нового биокomпозиционного материала на основе гиалуроновой кислоты и неминерализованного костного коллагена на восстановление костных дефектов // Российский вестник лентальной имплантологии. 2016. Т. 34, № 2. С. 21–30.
3. Исследование нового биокomпозиционного остеопластического материала на основе костного минерального компонента, гиалуроновой кислоты и сульфатированных гликозаминогликанов / Иванов С.Ю. [и др.] // Российский вестник дентальной имплантологии. 2015. Т. 31, № 1. С. 14–19.
4. Иванов С.Ю. Новое поколение биокomпозиционных материалов для замещения дефектов костной ткани // Новое в стоматологии. 1999. № 5. С. 47–50.
5. Alpar J.J. Viscoelastic surgery // Ann. Ophthalmol. 1987. Vol. 19. P. 350–353.
6. Balazs E.A. Sodium hyaluronate and viscosurgery. Healon (sodium hyaluronate) a guide to its in ophthalmic surgery / ed. by Miller D., Stegman R. John Wiley & Sons, 1983. 19 p.
7. Biocompatibility and biodegradation of intravitreal hyaluronan implants in rabbits / Avitabile T. [et al.] // Biomaterials. 2001. Vol. 22, № 3. P. 195–200.
8. Chen W.Y., Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair // Wound Repair Regen. 1999. Vol. 7, № 2. P. 79–89.
9. Evidence of hyaluronic acid and hyaluronic acid binding sites on human corneal endothelium / Härfstrand A. [et al.] // J. Cataract Refract. Surg. 1992. Vol. 18. P. 265–269.
10. Robey P.G. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. Principles of Bone Biology. 1-st ed. / ed. by Bilezikian P.J., Raisz L.G., Rodan G.A. San Diego: Academic, 1996. 155 p.
11. Schawalder P. Effects of bone morphogenetic protein-2 and hyaluronic acid on the osseointegration of hydroxyapatite-coated implants: An experimental study in sheep // J. of Biomedical Materials Res. 2005. Vol. 73a. P. 295–302.

References

1. Belozerov MN. Ocenka osteoplasticheskikh svojstv razlichnykh biokompozicionnykh materialov dlya zapolneniya defektov cheluyestey [Evaluation of osteoplastic properties of various biocompositional materials for filling jaw defects][dissertation]. Moscow (Moscow region); 2004. Russian.
2. Ivanov SYU. Issledovanie vliyaniya novogo biokompozicionnogo materiala na osnove gialuronovoy kisloty i nemineralizovannogo kostnogo kollagena na vosstanovlenie kostnykh defektov [Study of the impact of the new biocomposite material based on hyaluronic acid and demineralized bone collagen for the restoration of bone defects]. Rossijskij vestnik lental'noj implantologii. 2016;34(2):21-30. Russian.
3. Ivanov SYU, et al. Issledovanie novogo biokompozicionnogo osteoplasticheskogo materiala na osnove kostnogo mineral'nogo komponenta, gialuronovoy kisloty i sulfatirovannykh glikozaminoglikanov [Investigation of new biocomposite osteoplastic material on the basis of the bone mineral component, hyaluronic acid and sulfated glycosaminoglycans]. Rossijskij vestnik dental'noj implantologii. 2015;31(1):14-9. Russian.
4. Ivanov SYU. Novoe pokolenie biokompozicionnykh materialov dlya zameshcheniya defektov kostnoj tkani [a New generation of biocomposite materials to replace bone defects]. Novee v stomatologii. 1999;5:47-50. Russian.
5. Alpar JJ. Viscoelastic surgery. Ann. Ophthalmol. 1987;19:350-3.
6. Balazs EA. Sodium hyaluronate and viscosurgery. Healon (sodium hyaluronate) a guide to its in ophthalmic surgery. ed. by Miller D, Stegman R. John Wiley & Sons; 1983.
7. Avitabile T, et al. Biocompatibility and biodegradation of intravitreal hyaluronan implants in rabbits. Biomaterials. 2001;22(3):195-200.
8. Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. Wound Repair Regen. 1999;7(2):79-89.
9. Härfstrand A. et al. Evidence of hyaluronic acid and hyaluronic acid binding sites on human corneal endothelium. J. Cataract Refract. Surg. 1992;18:265-9.
10. Robey PG. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. Principles of Bone Biology. 1-st ed. ed. by Bilezikian PJ, Raisz LG, Rodan GA. San Diego: Academic; 1996.
11. Schawalder P. Effects of bone morphogenetic protein-2 and hyaluronic acid on the osseointegration of hydroxyapatite-coated implants: An experimental study in sheep. J. of Biomedical Materials Res. 2005;73a:295-302.

Библиографическая ссылка:

Петров И.Ю., Ларионов Е.В., Ипполитов Ю.А., Бут Л.В., Петров А.И. Морфогистохимические исследования остеопластического материала на основе гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и недеминерализованного костного коллагена для восстановления костных дефектов в эксперименте // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №3. Публикация 1-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-3/1-6.pdf> (дата обращения: 24.05.2018). DOI: 10.24411/2075-4094-2018-16038. *

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-3/e2018-3.pdf>