

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА В КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НАНОСЕКУНДНОГО ИМПУЛЬСНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИССЛЕДОВАНИИ IN VIVO

Чунихин А.А.¹, Базикян Э.А.¹, Чобанян А.Г.¹, Зайратьянц О.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, e-mail: msmsu@msmsu.ru

В работе представлены результаты иммуногистохимического анализа репаративного остеогенеза в эксперименте по воздействию наносекундного низкоэнергетического лазерного излучения на челюстные кости при перемещении зубов у крыс in vivo на разных этапах наблюдения со стороны давления и со стороны растяжения по сравнению с группой контроля без использования лазерного воздействия. После проведения эвтаназии животным проводили декапитацию, затем полученные фрагменты фиксировали в 10% растворе формалина, фрагменты подвергали декальцинации, изготавливали гистологические срезы, которые помещали на специальные стекла для иммуногистохимических исследований. Для иммуногистохимического исследования в качестве первичных использовали поликлональные антикроличьи антитела к MMP-9. Оценивали выраженность экспрессии MMP-9 на 7, 14 и 21 сутки наблюдения. Для количественной оценки иммуногистохимических реакций использовали рутинный полуколичественный метод. Показано, что экспрессия матриксной металлопротеиназы MMP-9 в стенках сосудов, фибробластах, макрофагах, остеокластах, экстрацеллюлярном матриксе периодонтальной связки в основной группе выражена больше на 20-25% на разных этапах наблюдения по сравнению с группой контроля, что доказывает перспективность применения наносекундной низкоэнергетической лазерной терапии для стимуляции репаративных процессов в челюстных костях и тканях пародонта.

Ключевые слова: ремоделирование костной ткани, репаративный остеогенез, низкоинтенсивное лазерное излучения, наносекундный импульсный диодный лазер, иммуногистохимический анализ

IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF REPARATIVE OSTEOGENESIS IN BONE CARE OF THE JAWS UNDER THE ACTION OF NANOSECOND IMPULSE LASER RADIATION IN EXPERIMENTAL INVESTIGATION IN VIVO

Chunikhin A.A.¹, Bazikyan E.A.¹, Chobanyan A.G.¹, Zayratyants O.V.¹

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, e-mail: msmsu@msmsu.ru

The paper presents the results of immunohistochemical analysis of experiments on the effects of nanosecond low-energy laser radiation on reparative osteogenesis of the jaw bones and periodontal tissue repair when teeth are moved in rats in vivo at different stages of observation from the side of pressure and from the side of stretching compared to the control group without using laser exposure. After euthanasia, the animals were decapitated, then the obtained fragments were fixed in 10% formalin solution, the fragments were decalcified, and histological sections were made, which were placed on special glasses for immunohistochemical studies. For immunohistochemistry, polyclonal anti-rabbit antibodies to MMP-9 were used as primary ones. The severity of MMP-9 expression was assessed at 7, 14, and 21 days of observation. For the quantitative evaluation of immunohistochemical reactions, a semi-quantitative routine was used. It was shown that expression of MMP-9 matrix metalloproteinase in vascular walls, fibroblasts, macrophages, osteoclasts, extracellular matrix of the periodontal ligament in the main group is expressed by 20-25% more at different stages of observation compared with the control group, which proves the promise of using nanosecond low-energy laser therapies to stimulate reparative processes in the jaw bones and periodontal tissues.

Keywords: bone tissue remodeling, reparative osteogenesis, low-intensity laser radiation, nanosecond pulsed diode laser, immunohistochemical analysis

Низкоинтенсивное лазерное излучение в настоящее время становится все более востребованным инструментом для стимуляции регенераторных процессов, в том числе для стимуляции репаративного остеогенеза [1,2]. Это связано с тем, что сфокусированные

световые волны, проходя через ткани, вызывают локальное воздействие в фокальной области пучка стимулируя остеобластогенез из мезенхимальных клеток и дифференцировку остеобластов в области костной раны [3,4]. Широкий диапазон параметров лазерного излучения позволяет проводить настройки для различного воздействия на ткани организма. Эффекты, вызываемые потоком фотонов лазерного света, при воздействии на организм человека могут быть различными – фотохимический, фототермический, фотодинамический и т.д. – и напрямую зависят от параметров излучения [5]. Сегодня широкое применение в медицине получили лазеры с непрерывным излучением, которое приводит к локальному нагреванию и разрушению ткани в фокусе по типу термической абляции. Исследования современных ученых по изучению эффектов воздействия импульсного лазерного излучения на живые ткани показали, что такой тип воздействия существенно снижает возможность ожога и коагуляционного некроза. Особенный научный интерес вызывает применение лазерного излучения в ультракороткоимпульсном диапазоне (наносекундном, фемтосекундном), где высокая мощность в импульсе позволяет глубже проникать в ткани без биодеструктивного нагрева [6-8]. Разрушение патологических тканей в этом случае достигается, в том числе, за счет взаимодействия лазерного излучения с кислородом в тканях без теплового эффекта с выделением активных форм кислорода (синглетной, триплетной) в фокусе воздействия [9]. Наносекундное импульсное излучение способствует суммированию энергии световых фотонов на разных уровнях и заселению тканей активными формами кислорода [10]. Кроме этого, низкоинтенсивное лазерное излучение в определенных диапазонах длин волн обладает в ультракороткоимпульсном режиме, молекулярно-мембранным стимулирующим действием за счет эффектов фотоокситерапии [11].

Лазерное устройство, с заданными параметрами, разработано и сконструировано на основе технической документации с основным излучателем с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения кислорода в тканях и наносекундной частотой импульсного излучения, исследовательской группой кафедры хирургии полости рта МГМСУ им. А.И. Евдокимова [12]. Новые медицинские технологии с применением роботизированной хирургии также разрабатываются учеными разных стран. Компактные размеры нового лазерного устройства позволят встраивать его в роботические медицинские устройства для проведения лазерной прецизионной хирургии челюстно-лицевой области [13, 14].

Исследования, проведенные ранее на биохимических и биологических жидкостях *in vitro*, показывают высокую эффективность генерации синглетного кислорода при использовании нового лазерного устройства [8, 9, 11, 12]. Интерес представляет изучение на доклиническом этапе влияния лазерного излучения нового устройства на репаративный

остеогенез челюстей в экспериментальном исследовании с использованием современных технологий иммуногистохимического анализа.

Цель исследования: оценить влияние низкоэнергетической наносекундной лазерной терапии на remodelирование костной ткани челюстных костей в экспериментальном исследовании *in vivo* с помощью иммуногистохимического анализа.

Материалы и методы исследования

Исследования на экспериментальных животных проводились в соответствии с Директивой ЕС 86/609/ЕСС и Конвенцией Совета Европы по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (1986).

В эксперименте использовали половозрелых крыс-самцов линии Вистар, распределенных на 2 группы – основную и контрольную. Перед началом лечения животным проводили обезболивание наркотическую анестезию с использованием Рометара/ксилы 4-6 мг/кг внутримышечно, затем через 20 мин в/м введение Золетил-100 (5-10 мг/кг), что обеспечивало анальгезию и релаксацию в течение 30-40 мин. После проведения внутримышечного наркоза моделировали медиальное перемещение первого моляра нижней челюсти с помощью ортодонтической пружины с силой сжатия 40 Н/см² по методике Kawasaki, K. Shimizu N. (2000) [15] для чего один конец пружины был закреплен к первому моляру нижней челюсти лигатурной проволокой, другой - к центральному резцу с помощью композиционного материала (рисунок 1).

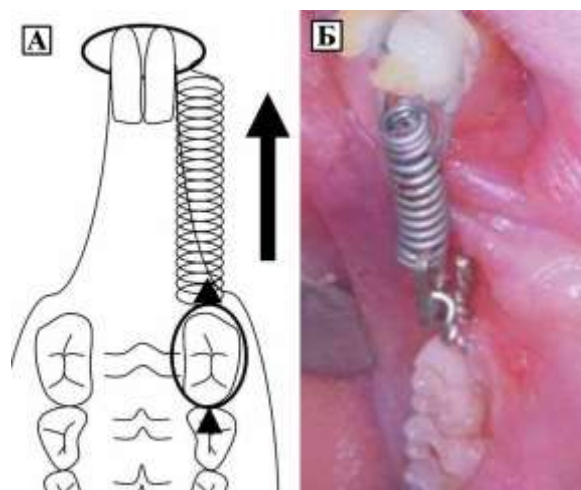


Рис.1. Схема (А) и клиническая картина (Б) наложения пружины для моделирования перемещения первого моляра

После фиксации пружины в основной группе на следующие сутки начинали терапию с применением нового лазерного устройства со следующими параметрами: длина волны 1270±5 нм, режим излучения – импульсный наносекундный с частотой следования импульсов 200 нс и паузы 200 нс, экспозиция излучения – 6 мин, диаметр световода -400 мкм, фокусное расстояние -3 мм. Процедуру лазерного воздействия проводили в течение 7

дней с помощью облучения зоны с медиальной стороны и дистальной стороны первого моляра с оральной и щечной поверхности по 1,5 мин попеременно. Данные параметры позволяют проводить лазерное воздействие со средней суммарной мощностью 200 мДж/см² на каждый облучаемый сегмент. После этого делали перерыв в проведении процедур с применением лазера на 7 суток, затем в течение 7 дней лазерное воздействие повторяли с теми же параметрами. В контрольной группе никакой дополнительной терапии не проводили. Для получения репрезентативных данных животных выводили из эксперимента на 7, 14 и 21-е сутки с помощью эвтаназии с использованием 5 мг препарата Рометар/ксила для угнетения дыхания. Проводили декапитацию с помощью костных кусачек, затем с помощью фрезы отделяли фрагмент с нижним моляром, отступя в каждую сторону на 10 мм, полученные фрагменты фиксировали в забуференном 10% растворе формалина в течение 2-х суток при температуре 4°C. С помощью препарата Биодек R (Италия) полученные фрагменты подвергали декальцинации, затем заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 3 мкм, изготовленные с помощью роторного микротомы HM355S (Thermo Scientific, Германия), помещали на покрытые специальными адгезивом предметные стекла для иммуногистохимических исследований. Эндogenous пероксидазу в депарафинированных срезах блокировали 3% перекисью водорода. Для иммуногистохимического исследования в качестве первичных использовали поликлональные антикроличьи антитела к MMP-9 (Lab Vision, США, в разведении 1:100). Матриксные металлопротеиназы (MMP) относятся к семейству цинк-зависимых металлопротеиназ, функция которых связана с обменом соединительнотканного и костного матрикса в норме и при патологии. Они участвуют в миграции клеток, расщеплении белков внеклеточного матрикса (коллагена и других), активации цитокинов, ростовых факторов и адгезивных молекул, формировании их растворимых форм, способствующих усилению или ингибированию биологических эффектов. MMP-9 принимает участие в процессах воспаления, ремоделирования ткани и репарации, мобилизации матрикссвязанных факторов роста и процессинга цитокинов.

Постановку иммуногистохимических реакций осуществляли после высокотемпературного восстановления антигенных детерминант в РТ-модуле для термической обработки парафиновых срезов (Thermo Scientific, Великобритания) осуществляли в аутостейнере Thermo Scientific, (Великобритания) согласно протоколу, прилагаемому фирмой-изготовителем. Для визуализации реакций применяли готовую тест-систему с универсальными вторичными антителами, мечеными хромогеном (3,3'-диаминобензидином) – Histophine (Nihirei Corp., Япония). Учитывали два негативных контроля (на специфичность реакции и отсутствие активной эндогенной пероксидазы) и один внутренний позитивный на специфичность реакции. Иммуногистохимическое

исследование проводили на кафедре патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова (заведующий кафедрой – Заслуженный врач Российской Федерации, проф. О.В.Зайратьянц).

Изучение результатов иммуногистохимической реакции в альвеолярной кости проводили с обеих сторон от первого моляра (зуба, на который производилось воздействие пружины) – со стороны давления и со стороны растяжения. Для количественной оценки иммуногистохимических реакций использовали рутинный полуколичественный метод. Учитывали выраженность экспрессии MMP-9 в баллах: отсутствие (0 баллов), слабую (1 балл), умеренную (2 балла) и выраженную (3 балла). Подсчет проводили в 10-и случайным образом отобранных полях зрения при увеличении микроскопа $\times 400$. Результаты обрабатывали статистически с использованием программного обеспечения MS Office Excel и Statistica for Windows 10.0, представляли в виде среднего значения \pm стандартное квадратическое отклонение ($M \pm \sigma$). Количественные данные в группах анализировали с помощью непараметрической метода Манна-Уитни (Mann-Whitny) для малых выборок. Величина критического уровня значимости принималась равной 0,05, т.е. различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты иммуногистохимического исследования костной и мягких тканей со стороны давления на 7 сутки наблюдения показали в основной группе умеренную и выраженную экспрессию MMP-9 в стенках сосудов, фибробластах, макрофагах, цементобластах, остеобластах, остеокластах и экстрацеллюлярном матриксе периодонтальной связки, особенно в участках резорбции альвеолярной костной ткани (рисунок 2А). В контрольной группе экспрессия MMP-9 в тех же клетках и структурах была слабой или умеренной (рисунок 2Г). На 14 сутки в основной группе со стороны давления отмечалась еще более выраженная экспрессия MMP-9 как в стенках сосудов, фибробластах, макрофагах, остеокластах, так и в экстрацеллюлярном матриксе периодонтальной связки в участках резорбции альвеолярной костной ткани (рисунок 2Б). В контрольной группе на данном этапе наблюдения по-прежнему отмечалась слабая экспрессия MMP-9 (рисунок 2Д). На 21 сутки наблюдения со стороны давления в основной группе сохранялась выраженная экспрессия MMP-9 во всех структурах пародонта (рисунок 2В). В контрольной группе со стороны давления на 21 сутки отмечалась лишь умеренная экспрессия MMP-9 (рисунок 2Е). Со стороны растяжения на всех этапах наблюдения результаты иммуногистохимической оценки экспрессии матриксной металлопротеиназы MMP-9 были практически идентичны результатам полученным при оценке иммуногистохимических препаратов на стороне давления.

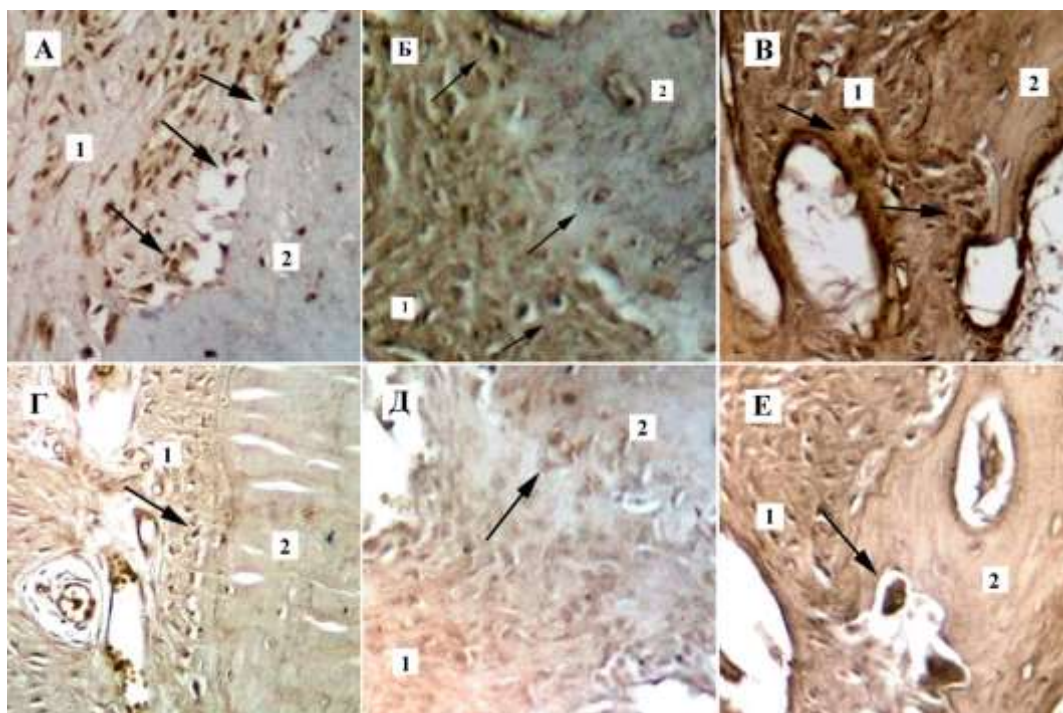


Рис. 2. Экспрессия матричной металлопротеиназы ММР-9 в тканях пародонта на этапах наблюдения со стороны давления на костную ткань. Верхний ряд – основная группа. Нижний ряд – группа сравнения: А, Г – 7 сутки наблюдения; Б, Д - 14 сутки наблюдения; В, Е - 21 сутки наблюдения: 1 – периодонтальная связка, 2 – альвеолярная кость, стрелками указана экспрессия ММР-9 в остеокластах. Непрямой иммуногистохимический метод с антителами к ММР-9, х 400

Результаты морфометрического исследования показали, что практически на всех этапах наблюдения со стороны давления экспрессия матричной металлопротеиназы ММР-9 в стенках сосудов, фибробластах, макрофагах, остеокластах, экстрацеллюлярном матриксе периодонтальной связки в участках резорбции альвеолярной костной ткани выражена больше в основной группе с применением лазерной биостимуляции репаративного остеогенеза на 20-25% по сравнению с группой контроля при статистически достоверной разнице между всеми показателями групп, а также внутри групп в разные сроки эксперимента ($p=0,0005$).

Выраженность экспрессии ММР-9 в различных клетках и экстрацеллюлярном матриксе периодонтальной связки со стороны давления на этапах эксперимента

Группа	Сутки эксперимента		
	7	14	21
Основная	2,7±0,38	2,8±0,13	2,9±0,07
Контрольная	2,1±0,72	2,1±0,63	2,3±0,48

Заключение

Результаты экспериментального исследования при перемещении зубов у животных *in vivo* по оценке влияния низкоэнергетической наносекундной лазерной терапии на remodelирование костной ткани челюстных костей с помощью иммуногистохимического анализа показали, что воздействие лазерного излучения нового диодного лазерного устройства с длиной волны 1265 ± 10 нм и возможностью излучения в импульсном наносекундном режиме с генерацией активных форм кислорода в тканях, способствует стимуляции экспрессии матриксной металлопротеиназы ММР-9 во всех структурах пародонта, включая стенки сосудов, фибробласты, макрофаги, остеобласты, остеокласты, экстрацеллюлярный матрикс периодонтальной связки. Экспрессия ММР-9 возрастает по сравнению с контрольной группой на 20-25% как со стороны давления на альвеолярную кость, так и со стороны растяжения. Увеличение экспрессии ММР-9 свидетельствует об ускорении remodelирования костной ткани и репаративного остеогенеза под действием лазерного излучения.

Полученные данные доказывают возможность стимуляции репаративных процессов в костной ткани челюстей и пародонте под действием наносекундной низкоэнергетической лазерной терапии, что, несомненно, свидетельствует о перспективах новой лазерной технологии для применения в клинической практике с целью ускорения реабилитации пациентов при проведении костнопластической хирургии челюстно-лицевой области, а также гнатологической хирургии и ортодонтическом перемещении зубов в челюстных костях.

Список литературы

1. Marques L., Holgado L.A., Francischone L.A., Ximenez P.B., Okamoto R., Kinoshita A. New LLLT protocol to speed up the bone healing process-histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. *Lasers Med Sci.* 2015. V. 30 (4). P. 1225-30.
2. Sirak S.V., Shchetinin E.V., Vafiadi M.Yu. Morphological Assessment of Semiconductor Infrared Laser Utilization in Mandibular Fracture Treatment. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 2015. no 6(6). P. 698–704
3. Щетинин Е.В., Сирак С.В., Быкова Н.И., Адамчик А.А., Петросян Г.Г., Гатило Ю.Ю., Кошель И.В. Механизмы репаративного остеогенеза при воздействии импульсного лазерного излучения инфракрасного диапазона // *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2016. Т.11.№ 4. С.556-560.
4. Cossetin E., Janson G., Carvalho M.G., Carvalho R.A., Henriques J.F.C., Garib D. Influence

of low-level laser on bone remodeling during induced tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2013. V. 83 (6). P. 1015-1021. DOI: 10.2319/100812-789.1.

5. Воронова О.С., Генинг Т.П., Светухин В.В. Влияние фемтосекундного лазерного излучения на показатели оксидативного стресса в опухолевой ткани при экспериментальном раке шейки матки // *Фундаментальные исследования.* 2012. № 1. С. 24-27.

6. Бойко В.И., Ларичева Л.П., Дегтярева Л.М. Механизм действия лазерного излучения на биологические объекты // *Электроника и связь. Тематический выпуск «Проблемы электроники».* 2008. Т. 2. С. 122–125.

7. Владимиров И.А., Клебанов Г.И., Борисенко Г.Г., Осипов А.Н. Молекулярно-клеточные механизмы действия низкоинтенсивного лазерного излучения // *Биофизика.* 2004. Т. 49. № 2. С. 339–350.

8. Чунихин А.А., Базикян Э.А., Зайратьянц О.В. Оценка эффективности наносекундной лазерной терапии болезней пародонта в эксперименте // *Российская стоматология.* 2017. Т. 10 (4). С. 3-7.

9. Anquez F., Yazidi-Belkoura I.E., Randoux S., Suret P., Courtade E. Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 2012. V. 88(1). P. 167-174.

10. Drobizhev M., Karotki A., Kruk M., Rebane A. Resonance enhancement of two-photon absorption in porphyrins. *Chem. Phys. Lett.* 2002. V. 355 (1-2). P.175-182.

11. Алексеев Ю.В, Захаров С.Д., Иванов А.В. Фотодинамический и светокислородный эффекты: общность и различия // *Лазерная медицина.* 2012. Т. 16. № 4. С. 4-9.

12. Chuniknin A.A., Bazikyan E.A., Pikhtin N.A. A laser unit for photodynamic therapy and robot-assisted microsurgery in dentistry. *Tech. Phys. Lett.,* 2017. V. 43 (6). P. 507-510. DOI: 10.1134/S1063785017060074.

13. Базикян Э.А., Чунихин А.А. Малоинвазивные лазерные технологии на основе роботизированных мультифункциональных комплексов в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии // *Российский стоматологический журнал.* 2016. Т. 20. № 5. С. 228-231.

14. Чунихин А.А., Базикян Э.А., Саакян М.Ю., Гажва С.И. Разработка наносекундного лазерного модуля, встраиваемого в роботизированный многофункциональный хирургический комплекс для малоинвазивной терапии патологии челюстно-лицевой области, и определение эффектов его воздействия на плазму крови // *Современные технологии в медицине.* 2016. Т. 8. № 4. С. 30-35.

15. Kawasaki K., Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med.,* 2000. V. 26 (3). P. 282-291.