

УДК 616.314.17:576.31:616-092.4

© С.Г. Безруков, Т.С. Саенко, Т.Г. Филоненко, 2013.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ АУГМЕНТАЦИИ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ОТРОСТКА ИНЪЕКЦИОННЫМ МЕТОДОМ

С.Г. Безруков, Т.С. Саенко, Т.Г. Филоненко

Кафедра хирургической стоматологии (зав. кафедрой – проф. С.Г. Безруков); кафедра патологической анатомии (зав. кафедрой – доц. Н.Ю. Новиков), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь.

EXPERIMENTAL RESULTS MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF THE AUGMENTATION OF THE ALVEOLAR PROCESS INJECTION METHOD

S.G. Bezrukov, T.S. Saenko, T.G. Filonenko

SUMMARY

Results of experimental and morphological studies have established the effectiveness of injectable use osteoplastic materials (for example PRP and Biomin GTIS). In the post-injection period, there were no active development of local inflammatory reactions in the two groups of observations. Already on the third day of the experiment in the group of animals which used the combination of drugs (PRP and Biomin GTIS), an inflammatory reaction was absent. The histological study, it was observed that the rats in the two comparison groups on the 30th and 60th day at the site of administration osteoplastic materials formed coarse-fibered newly formed connective tissue, including bone beams and walls, with a large number of osteoblasts. The productivity of these changes were more pronounced in the 2nd group of observations, where the PRP was used in conjunction with the preparation Biomin GTIS.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ АУГМЕНТАЦІЇ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ВІДРОСТКА ІН'ЄКЦІЙНИМ МЕТОДОМ

С.Г. Безруков, Т.С. Саенко, Т.Г. Філоненко

РЕЗЮМЕ

Результати експериментально-морфологічного дослідження дозволили встановити ефективність ін'єкційного застосування остеопластических матеріалів (на прикладі PRP і Біомін ГТЛС). У Постін'єкційних періоді не було відзначено активного прояву місцевих запальних реакцій в обох групах спостережень. Вже на 3-ю добу експерименту в групі тварин, де застосовували поєднання препаратів (PRP і Біомін ГТЛС) запальна реакція була відсутня. При гістологічному дослідженні було відзначено, що у щурів в обох групах порівняння, до 30-м і 60-м добі в ділянці введення остеопластических матеріалів формувалася новостворена грубоволокниста сполучна тканина, що включає кісткові балки і перегородки, з великою кількістю остеобластів. Продуктивність перерахованих змін була більш вираженою в 2-й групі спостережень, де PRP використовувалася разом з препаратом Біомін ГТЛС.

Ключевые слова: остеопластические материалы, Биомин ГТЛС, PRP, инъекционное введение, аугментация альвеолярного отростка.

Проблема лечения заболеваний пародонта имеет медицинскую и социальную значимость. В последнее время для оптимизации процессов регенерации в челюстно-лицевой области все чаще применяется обогащенная тромбоцитами плазма крови (PRP) [1, 8]. Она широко используется для ускоренной регенерации ран тканей рта, при проведении остеопластических операций (синус-лифтинг, аугментация альвеолярного отростка), для обработки ложа перед установкой дентального имплантата и пр. [8]. Общеизвестно, что PRP оказывает выраженное остеиндуктивное действие. В то же время, известно, что в комплексном лечении генерализованного пародонтита целесообразно использовать остеокондукторы [7], которые позволяют более существенно увеличить объем костной ткани. В последнее время на стоматологическом рынке появились

эффективные отечественные синтетические остеопластические (остеокондуктивные) препараты. Одним из них является серебросодержащий материал «Биомин ГТЛС».

Цель исследования: проследить клинические и морфологические изменения, развивающиеся в тканях пародонта в условиях эксперимента на крысах при местном инъекционном изолированном и сочетанном использовании PRP и остеопластического материала Биомин ГТЛС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментально-морфологический фрагмент исследования проведен на базе вивария ГУ «КГМУ имени С.И. Георгиевского», на 30 крысах. Были сформированы две экспериментальные группы наблюдений из расчета по 15 животных в каждой. В первой группе проводилось однократное инъекци-

онное поднадкостничное введение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови (PRP). Во второй группе по такой же методике PRP вводили в сочетании с синтетическим остеопластическим материалом (Биомином ГТЛС).

Забор крови (0,7 - 1,0 мл) осуществляли одноразовым шприцем из сосудов хвоста крысы (после его частичной ампутации) путем ее вакуумного отсасывания [5]. В шприц предварительно вводили 0,05 ЕД гепарина. Взятую кровь в стерильных пробирках центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин и 15 мин при 6000 об/мин на настольной центрифуге HETTICH EBA-20 (Германия). Из центрифугата отбирали нижнюю часть плазмы желто-розового цвета (в среднем 0,1 – 0,15 мл). Полученную таким образом PRP (0,1 мл) вводили инсулиновым шприцем под- и наднадкостнично вестибулярно в молярную область нижней челюсти крысы.

Во второй экспериментальной группе животным в аналогичный участок инъекционно инсулиновым шприцем, но иглой для в/м введений (для лучшего прохождения остеопластического материала) вводили взвесь Биомина ГТЛС (0,1 г) в PRP (0,1 мл).

Эвтаназия крыс проводилась путем декапитации во время эфирного наркоза на 7-е, 10-е, 30-е и 60-е сутки (по три особи). [5]. При выполнении исследования нами соблюдались биоэтические нормы работы с экспериментальными животными [4, 5]. Биоптат для дальнейшего микроскопического исследования подготавливали по общепринятым патогистологическим методам. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином [3, 6, 9].

Всего изучено 60 препаратов (на каждом стекле по 2 среза), полученных от 30 крыс в обеих группах. Просмотр и фотографирование материала осуществляли на световом микроскопе Olympus CX41.

Результаты и их обсуждение. Анализ клинических показателей у экспериментальных животных проводился на 1, 3, 5, 7, 10, 30 и 60-е сутки с использованием бальной оценки контролируемых показателей. Определяли выраженность таких клинических симптомов, как гиперемия и отек в зоне инъекционной травмы.

Через сутки после проведенной манипуляции у 5 крыс (33,3%) в первой группе определялась незначительно выраженная гиперемия и отек тканей в исследуемой области. Во второй группе эти показатели были отмечены у 2-х животных (13,33%). В целом все грызуны были активными, подвижными, аппетит был не нарушен, раны на ампутированных хвостах выполнены корочками.

На третьи сутки наблюдений слизистая оболочка в постинъекционной зоне в 1-й группе сохраняла отечность лишь у 2-х крыс при ее физиологической окраске. У животных во второй группе симптомов воспалительной реакции выявлено не было.

При осмотрах на 5-е, 7-е сутки признаков отека

и гиперемии не определялось. Кроме того, на протяжении всего недельного срока наблюдений проявлений воспалительной инфильтрации и тем более флюктуации не отмечено.

На 20-е и 30-е сутки эксперимента слизистая оболочка альвеолярного отростка была без патологических изменений. В сравнении с симметричной стороной, где остеопластические материалы не вводились, отмечено визуально определяемое утолщение вестибулярной кортикальной пластинки в молярной зоне нижней челюсти (в участке проведенной инъекции препаратов), что в большей степени было выражено у представителей второй группы.

Гистологическое исследование тканей пародонта (проведенное после декальцинации кости и окраски тканей гематоксилином и эозином) показало, что 7-е сутки экспериментального исследования в обеих группах характеризуются развитием сходных тканевых и сосудистых реакций, в большей степени выраженных в первой группе.

Ткани в зоне инъекции во всех случаях покрыты многослойным плоским эпителием (МПЭ), количество слоев которого уменьшено до 2 – 3. Во второй группе на поверхности МПЭ определялось наличие серозно-фибринозного экссудата с большим количеством лейкоцитов. Сами эпителиоциты увеличены в объеме, цитоплазма их заполнена вакуолями, содержащими цитоплазматическую жидкость, что является показателем гидропической дистрофии или явлений внутриклеточного отека. Следует отметить, что в обеих группах в эпителиальных сосочках, а также в зоне введения остеопластического материала определяется наличие межклеточного отека и сегментоядерных лейкоцитов.

Под МПЭ визуализируется отечная рыхлая соединительная ткань, состоящая из гомогенизированных волокнистых структур с явлениями мукоидного и фибриноидного набухания. Часть коллагеновых волокон фрагментирована. Воспалительные изменения проявлялись наличием очагового серозно-гнояного экссудата с выраженной лимфо-гистиоцитарной и лейкоцитарной инфильтрацией межклеточного вещества.

Помимо воспалительной реакции в МПЭ и подлежащих тканях отмечено наличие циркуляторных гемодинамических расстройств. На фоне большинства неизмененных сосудов микроциркуляторного русла, встречаются капилляры с утолщенным эндотелием, измененным вследствие мукоидного и фибриноидного набухания. В зоне инъекции и прилегающей к ней области определяется периваскулярный отек, а так же геморрагическая инфильтрация или диapedезные кровоизлияния. Все сосуды в этих участках гиперемированы, некоторые сохраняют явления стаза эритроцитов.

Исследование структуры костной ткани альвеолярного отростка позволило определить утолщение

надкостницы с очаговыми участками ее отслоения. В костном мозге – явления гиперемии сосудов и очаговой периваскулярной инфильтрации лейкоцитами. Важным межгрупповым отличием в этот срок наблюдений мы считаем отсутствие воспалительной инфильтрации тканей в исследуемой зоне во второй экспериментальной группе, что обусловлено, по нашему мнению, результатом местного антибактериального эффекта серебра.

На фоне дистрофических явлений в компактной костной ткани у животных в 1-й экспериментальной группе отмечаются участки гладкой и лакунарной резорбции. В некоторых препаратах альвеолярной кости обнаруживается разрушение прободающих волокон цемента и прогрессирующая деминерализация с набуханием коллагеновых волокон, что так же является показателем начальных проявлений резорбции.

На 10-е сутки экспериментального исследования эффективности инъекционного применения остеопластических материалов общим признаком во всех группах было стихание циркуляторных расстройств, явлений отека и серозно-фибринозного пропитывания тканевых структур с появлением выраженных признаков восстановления поверхностного многослойного плоского эпителия. Оценивая состояние МПЭ в экспериментальных группах следует отметить, что его утолщение на фоне отсутствия лейкоцитарно-фибринозного детрита в 1 группе сохранялось, тогда как во 2 - й – восстановление эпителия имело более выраженный характер. Во всех препаратах определялся равномерно сформированный многослойный плоский эпителий, покрывающий поврежденную поверхность с полностью дифференцированными клетками и пролиферацией базального слоя эпителиоцитов, соответствующих гистологической норме. По периферии инъекционной зоны визуализируется регенерирующий эпителий с явлениями акантоза и гиперкератоза. При этом часть эпителиоцитов сохраняла явления внутриклеточного отека, что в меньшей степени выражено в 1 группе. Отмечены единичные межэпителиальные нейтрофилы.

Одним из показателей эффективности восстановительных процессов в подслизистом слое является преобладание макрофагов и фибробластов в очаге слабо выраженного лимфоплазматического инфильтрата, наибольшее число которых определялось во 2 группе, где вводили два остеопластических материала (PRP и Биомин ГТлС). Это связано прежде всего с тем, что в кооперации с нейтрофилами они оказывают выраженное бактерицидное действие и осуществляют детоксикацию путем фагоцитоза и внеклеточного лизиса продуктов распада клеток и межклеточного вещества. Кроме того, они ограничивают очаг повреждения от окружающих тканей, последовательно формируя нейтрофильно-макрофагальный и макрофагально-фибробластический ба-

рьеры, предшествующие образованию грануляционной ткани.

Дисциркуляторные расстройства в исследуемой зоне отличались вариабельностью просвета сосудов, величина которых в определенной мере сопоставима со степенью дистрофических изменений сосудистой стенки. Значительная часть сосудов имеет суженные просветы за счет утолщения стенки вследствие плазматического пропитывания. Часто наблюдаются набухание и десквамация эндотелиальных клеток, перивазальные инфильтраты. Капилляры в основном паралитически расширены, с резким истончением эндотелия. Дополнительно к этому, определялись обширные поля грануляционной ткани с хаотично расположенными тонкими коллагеновыми волокнами, отеком и гиперемией сосудов.

В 1 экспериментальной группе животных в костном ложе, среди участков отека и серозно-фибринозного пропитывания костных структур, на фоне выраженной периостальной реакции и полнокровия сосудов определялись очаги дезорганизации костных балок и перегородок в сочетании с их местной резорбцией, о чем свидетельствовало формирование узурированных лакун с краевым скоплением остеокластов. В различных участках, преимущественно в периваскулярном пространстве располагались крупные остеобласты овальной и неправильной формы. Отмечалось формирование гаверсовых каналов (рис. 1).

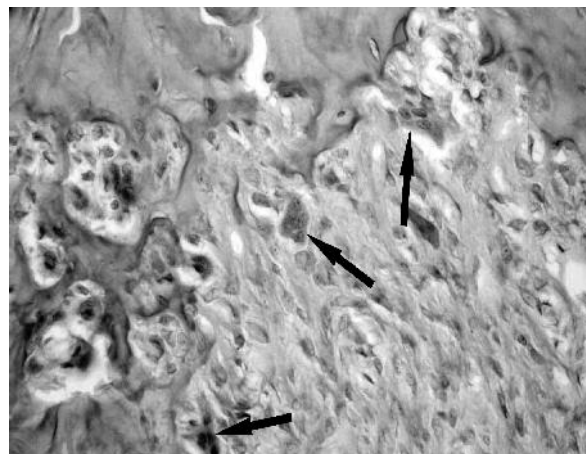


Рис.1. Микрофотография препарата крысы. 1-я экспериментальная группа. 10-е сутки. Выявлены узурированные лакуны с краевым скоплением остеокластов (указано стрелками). Декальцинация. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x 400.

Однако во 2 группе сравнения участки костной ткани выглядят мало, либо – почти неизменными. Гистологически определяется большое количество узких сосудов с иногда встречающимися гаверсовыми каналами несколько большего диаметра, чем в окружающей костной ткани. Костные балки отличаются формой и размером. В отдельных участках

наблюдается замещение очагов резорбции преимущественно фиброзной тканью, богатой коллагеновыми волокнами, среди которых залегают многочисленные фибробласты, имеющие разнообразную форму.

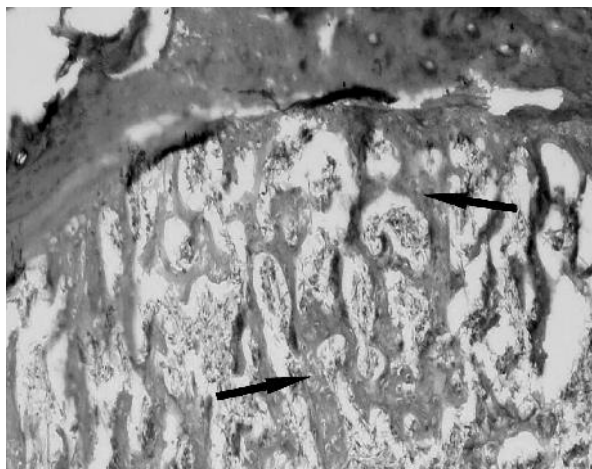


Рис. 2. Микрофотография препарата крысы. 2-я экспериментальная группа. 10-е сутки. Определяются хаотично расположенные новообразованные костные балки и перегородки (указаны стрелками), остеобласты и фиброзная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 200.

Главным морфологическим отличием, выявленным в указанной группе явилось появление хаотично расположенных новообразованных костных балок и перегородок с большим количеством остеобластов по периферии от них, среди разросшейся фиброзной ткани в области зубодесневого соединения (рис. 2). По нашему мнению, такие гистологические изменения являются свидетельством активного остеопластического действия PRP и Биомин ГТЛС. Кроме того, среди гомогенизированных коллагеновых волокон (интенсивно розового цвета) выявляется значительное количество расширенных и полнокровных кровеносных сосудов артериального и венозного типа. Коллагеновые волокна, иногда набухшие, местами сохраняли явления глыбчатого распада.

Гистологическое исследование материала на 30 сутки эксперимента свидетельствует о завершении восстановительных процессов в обеих экспериментальных группах, что проявляется полной эпителизацией слизистой оболочки поврежденного участка десны, отсутствием признаков воспалительной инфильтрации и восстановлением микроциркуляции. Наблюдается усиление кератинизации эпителия, что свидетельствует о восстановлении защитных его свойств. Однако, в некоторых случаях, в обеих экспериментальных группах отмечается наличие папилломатозных выростов МПЭ, что связано, по нашему мнению, с остаточными явлениями воспаления.

Сохраняется инфильтрация плазматическими клетками, лимфоцитами, макрофагами. Отмечено наличие очагового фиброза в подслизистом слое. В области зубо-десневого соединения определяются поля новообразованной зрелой грубоволокнистой соединительной ткани с единичными разнонаправленными костными балками и перегородками, располагающимися преимущественно вблизи надкостницы.

Эти явления более выражены во 2-й экспериментальной группе. При этом отмечается наличие оформленной грубоволокнистой соединительной ткани с параллельно ориентированными пучками коллагеновых волокон и с большим количеством остеобластов, расположенных в периостальном пространстве. Появившиеся в прошлые сроки костные балки и перегородки формируют структуры по типу остеона с хорошо визуализирующимися гаверсовыми каналами. Надкостница имеет нормальную плотность и толщину. Костная ткань обычного гистологического строения с системой остеонов, гаверсовых каналов и костных балок. Однако выявляются и некоторые структурные особенности, в сравнении с нормой. В частности, размер и форма остеонов, количество и диаметр сосудов гаверсовых каналов не упорядочены, что является, по нашему мнению, следствием продолжающихся восстановительных процессов (рис. 3).

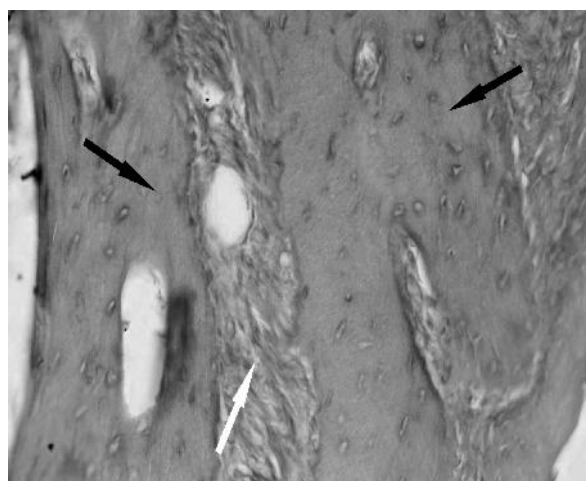


Рис. 3. Микрофотография препарата крысы. 2-я экспериментальная группа. 30-е сутки. Визуализируются костные балки (указаны черными стрелками) и фиброзная ткань (указана белой стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 400.

ВЫВОДЫ

Анализ результатов инъекционного применения остеопластических материалов в эксперименте позволил установить, что уже на 7-е сутки в участках ведения возникают слабовыраженные местные воспалительные и дистрофические изменения, к 10-м – развиваются восстановительные реакции в надкостнице, кости и даже в периодонте. На 30-е и 60-е

сутки формируется новообразованная грубоволокнистая соединительная ткань с усилением постепенных признаков минерализации и стимуляции ее роста, что проявляется в формировании новых костных структур по типу остеона и гаверсовых каналов. Продуктивность перечисленных изменений более выражена во 2-й экспериментальной группе, где PRP применяли в комплексе с серебросодержащим остеопластическим препаратом (Биомином ГТЛС).

Литература

1. 16th Annual Meeting Academia Osseointegration, 2001, March 22-24. 2001, Toronto, Canada, P. – 354.
2. Marx R. Plateletrich plasma. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts / Marx R., Carlson E., Eichstaedt R. [et al.] // J. Oral Maxillofac. Surg. – 1998. – Vol. 85. – P. 638-646.
3. Виноградова Т.П. Диагностика костно-суставной патологии по биопсиям / Т.П. Виноградова.- М.: Медицина, 1964. – 192 с.
4. Гигаури В.С. Этические требования к работе с экспериментальными животными / Гигаури В.С., Долгов В.В., Павлова Т.Н.- М.: ЦОПИУВ, 1988. – 28 с.
5. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, Г.А. Сайфетдінова. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
6. Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике: Руководство / П.Г. Мальков, Г.А. Франк, Л.В. Москвин, Н.В. Данилов, Л.Э. Завалишина.; под ред. П.Г. Малькова, Г.А. Франка. – М., 2011. – 108 с.
7. Павленко А.В. Применение остеопластических материалов и обогащенной тромбоцитами плазмы в целях повышения эффективности лоскутных операций при лечении генерализованного пародонтита/ А.В. Павленко, И.А. Бугоркова // Современная стоматология. – 2006. – № 3. – С. 45 - 48.
8. Робустова Т.Г. Имплантация зубов (хирургические аспекты): Монография / Т.Г. Робустова.- М.: Медицина, 2003. – 560 с.
9. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника: Монография / Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. - М.: Медицина, 1996. – 544 с.