

Сравнительное изучение в эксперименте эффективности применения наноструктурированных, минеральных и природных компонентов при костных дефектах

Р. В. Мартиросян¹, А.Б. Шехтер², В.Н. Балин¹, Г.Д. Капанадзе³,
Л.В. Винокурова⁴

¹ – Национальный медико-хирургический центр им. Н.И.Пирогова Минздравсоцразвития России, Москва

² – Первый МГМУ им.И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России, Москва

³ – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

⁴ – ГБУЗ ГП №153 Департамента здравоохранения Москвы

Контактная информация: д.б.н. Гия Джемалиевич Капанадзе giyak@yandex.ru

Было проведено гистологическое изучение полученных материалов в эксперименте на лабораторных животных (кролики) по сравнительной эффективности раздельного и комбинированного применения наноструктурированных β-трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатита (минеральный компонент), комплексного гомеопатического препарата траумель С (природный компонент) и богатой тромбоцитами плазмы из аутокрови.

Ключевые слова: эффективность комбинации остеоматериалов, препарата траумель С и богатой тромбоцитами плазмы, кролики.

В современной стоматологической практике важным вопросом является выбор наиболее эффективного остеоматериала, или его комбинация с другими факторами, для повышения эффективности и ускорения репаративного остеогенеза в процессе заживления костных ран.

Целью нашей работы явилось изучение в эксперименте на лабораторных животных сравнительной эффективности раздельного и комбинированного применения минеральных (наноструктурированного гидроксиапатита и β-трикальцийфосфатной керамики) остеоматериалов и гомеопатического комплексного препарата траумель С [1] в сочетании с богатой тромбоцитами плазмой из аутокрови животного, а также гистологическое изучение полученных костных дефектов альвеолярных

дуг челюстей кроликов в временной динамике. Траумель С — комплексный гомеопатический препарат, содержащий микроэлементы и обладающий широким спектром фармакологического действия: противовоспалительным, антиэкссудативным, иммуностимулирующим, регенирующим, обезболивающим, антигеморрагическим, вентонизирующим [2].

Материалы и методы

В эксперименте использовали 14 самцов кроликов породы советская шиншилла в возрасте 6 мес., с живой массой 4,5±0,2 кг. Животные соответствовали категории SPF. Кролики содержались в индивидуальных клетках батарейного типа на решетчатых полах в виварии НЦБМТ РАМН. Для кормления использовали стандартный комбикорм грану-

лированный полнорационный для кроликов. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Из 14 животных было сформировано 6 групп. В группах I-IV по 2 кролика и в группах V-VI — по 3 кролика.

В качестве наркоза применяли ветеринарный препарат «Золетил 100», который вводили в дозе 15 мг/кг в ушную вену. Под общей анестезией делался наружный разрез длиной 2 см в средней части нижней челюсти с одной стороны, отслаивались мягкие ткани шаровидной фрезой при помощи хирургического физиодиспенсера. Формировали костный округлый несквозной дефект диаметром 0,5 см и глубиной 3-4 мм. Костные дефекты заполнялись различными остеопластическими материалами:

I группа. Контрольная (заполнение кровяным сгустком).

II группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированной β-трикальцийфосфатной керамики.

III группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированного гидроксиапатита.

IV группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированной β-трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатитом в соотношении 50/50 [3].

V группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированной β-трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатитом в соотношении 50/50, а также жидким раствором траумель С.

VI группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированной β-трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатитом в соотношении 50/50, жидким раствором траумель С, сверху — богатой тромбоцитами плазмой [4]. Для её получения из ушной вены кролика стерильным одноразовым шприцом брали около 5 мл крови, которая потом в течение 15 мин. подвергалась двойному центрифугированию в аппарате SmartPrep2 (HARVEST USA) [5].

В каждой группе материал забирался через 1 и 2 мес. Костные фрагменты альвеолярных дуг с участком дефекта фиксировались в нейтральном формалине, подвергались декальцинации с помощью препарата Биодек. После парафиновой заливки срезы толщиной 4-5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, просматривались на микроскопе Олимпус BX51, фотографировались с помощью камеры Sony и программы Launch Cam View.

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ), и в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986). Исследования выполнялись согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами (СОП) исследователя, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических

клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [6]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ РАМН.

Обработка материалов

I группа. Контрольная (заполнение кровяным сгустком).

1 месяц после операции.

В материале видны часть зуба, окружающая костная ткань альвеолярного отростка и участок дефекта кости. Дефект заполнен в основном плотной грубоволокнистой фиброзной соединительной тканью (рис. 1). Ткань состоит из коллагеновых волокон, фибробластов веретеновидной формы, немногочисленных лимфоцитов и макрофагов, относительно богата сосудистыми элементами. В самой ткани новообразованных костных трабекул не отмечается. Однако на границе между вышеописанной тканью и костью альвеолярного отростка отмечаются новообразования незрелых

костных трабекул частично остеонидной структуры. Эти трабекулы отличаются от зрелых трабекул ткани большим количеством остеоцитов, располагающихся как внутри трабекул, так и на их поверхности. Кроме того, на поверхности трабекул видны единичные остеокласты.

2 месяца после операции.

Полость костного дефекта в значительной степени заполнена молодой костной тканью. Часть бывшего дефекта занята фиброзной грубоволокнистой соединительной тканью, однако большая часть заполнена костными трабекулами, которые отличаются большей зрелостью, чем в предыдущий срок. В них уменьшено содержание остеоцитов. Остеонидная ткань отсутствует, по краям видны уже относительно зрелые оформленные костные трабекулы (рис. 2).

II группа. β -трикальцийфосфатная керамика.

1 месяц после операции.

Костный дефект в основном заполнен новообразованными умеренно зрелыми костными балками. Грубоволокнистая соединительная ткань отсутствует,

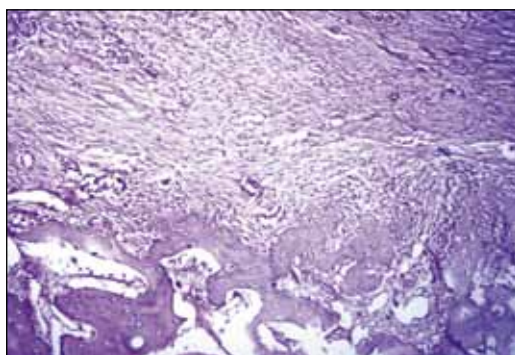


Рис. 1. Костный дефект в основном заполнен грубоволокнистой соединительной тканью (вверху), на границе с костью альвеолярного отростка видны остеонидные массы (справа) и новообразованные костные трабекулы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$.

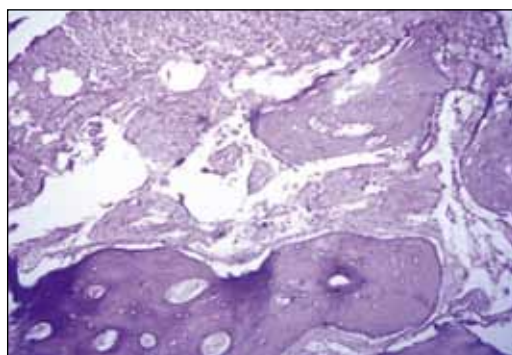


Рис. 2. В верхней части снимка волокнистая соединительная ткань, в средней части – созревающие костные трабекулы, в нижней части – зрелые трабекулы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$.

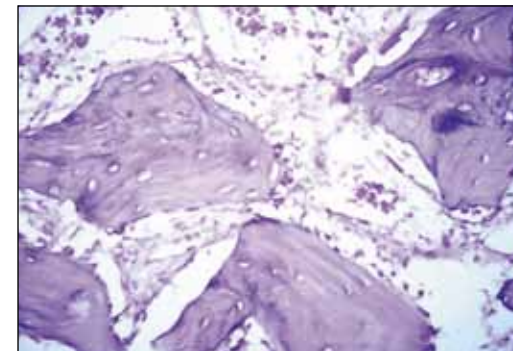


Рис. 3. В костном дефекте видны новообразованные костные балки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

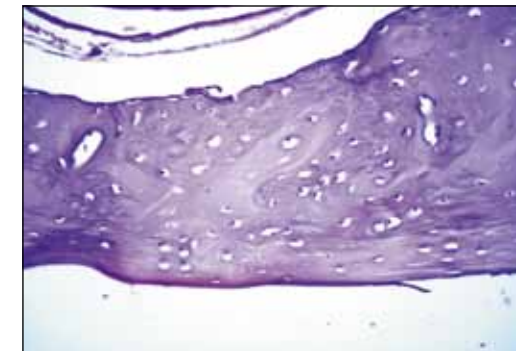


Рис. 4. Дефект заполнен относительно плотной костной тканью. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$.

между балками выявляется костный мозг (рис. 3).

2 месяца после операции.

Большая часть бывшего костного дефекта заполнена относительно зрелыми трабекулами, которые местами компактизируются (рис. 4).

III группа. Гидроксиапатит (ГАП).

1 месяц после операции.

Часть костного дефекта занята относительно зрелыми новообразованными костными балками, другая часть — плотной фиброзной грубоволокнистой

тканью. В последней видны гранулы ГАП разных размеров. Гранулы окружены капсулой с высоким содержанием извести (базофилы при окраске ГЭ) (рис. 5). Кроме того, в просвете видна очень крупная гранула (по-видимому, из слившихся мелких гранул). На границе этой крупной гранулы, между ней и соединительной фиброзной тканью формируется костная ткань (рис. 6).

2 месяца после операции.

Костный дефект в основном заполнен относительно зрелой новообразованной

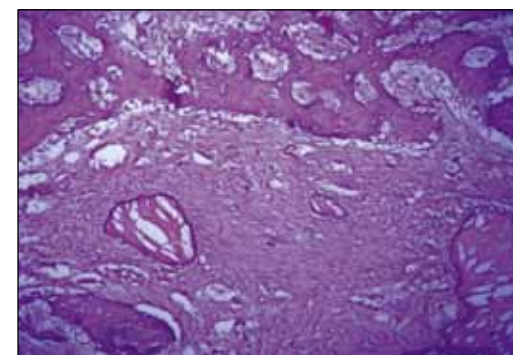


Рис. 5. Вверху – новообразованные костные балки с началом формирования костного мозга, внизу – грубоволокнистая соединительная ткань с гранулами ГАП. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$.

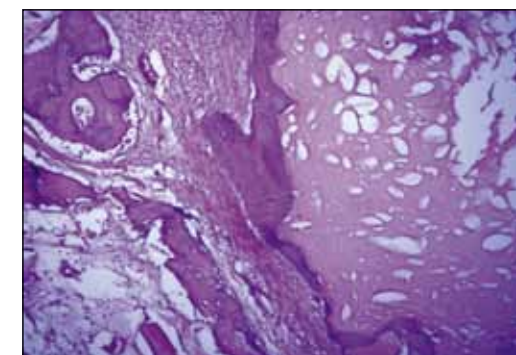


Рис. 6. Справа — часть крупной гранулы ГАП, в середине снимка на границе этой гранулы идёт формирование костной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$.

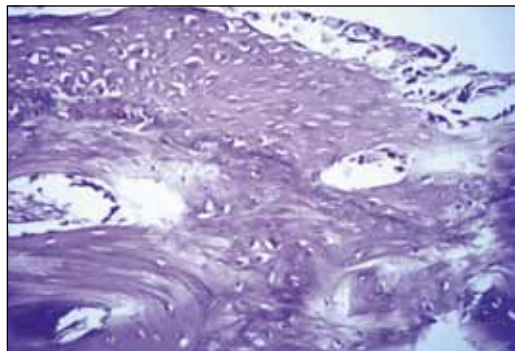


Рис. 7. Новообразованная компактизирующаяся костная ткань в дефекте с увеличенным количеством остеоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 400.

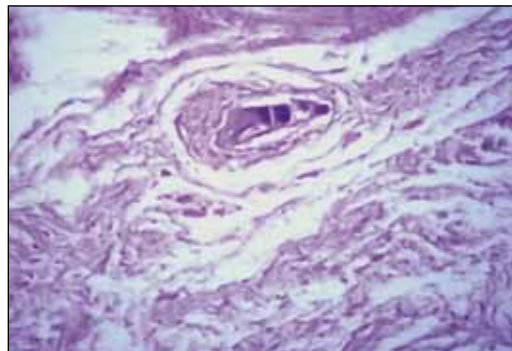


Рис. 8. Мелкие гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой. Окраска гематоксилином и эозином x 400.

костной тканью, в которой костные балки компактизируются, но, в отличие от интактной кости, она богата клеточными элементами (остеоцитами) (рис. 7). В этой кости гранулы ГАП уже не обнаруживаются, однако в соединительной ткани на краю дефекта видны резко уменьшившиеся в размере гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой (рис. 8).

IV группа. β -трикальцийфосфатная керамика+гидроксиапатит

1 месяц после операции.

Костная полость заполнена в основном новообразованными созревающими костными балками и в меньшей степени грубоволокнистой соединительной тканью. Отмечаются также участки кровоизлияний (рис. 9). Гранул ГАП в данном препарате не обнаружено.

2 месяца после операции.

В препарате не обнаруживается бывшей костной полости, имеется лишь зуб в окружающей костной ткани. Если препарат взят на месте бывшего дефекта,

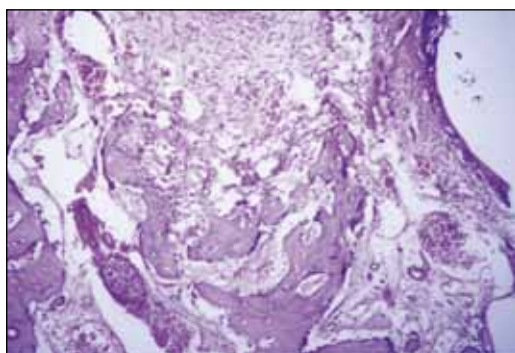


Рис. 9. Вверху – участки грубоволокнистой соединительной ткани, внизу – формирующиеся новообразованные костные балки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

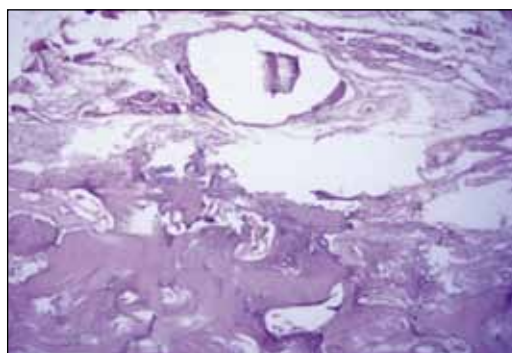


Рис. 10. Вверху – гранулы ГАП, видны лишь частично в полости, окружённой соединительнотканной капсулой. Внизу – созревающая и компактизирующаяся костная ткань. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

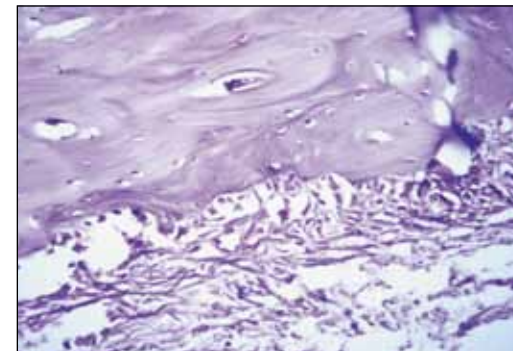


Рис. 11. Вверху – зрелая компактная костная ткань с типичной структурой гаверсовых каналов. Внизу – грубоволокнистая соединительная ткань. Окраска гематоксилином и эозином x 400.

это означает, что дефект заполнен зрелой костной тканью, которая уже не отличается от интактной.

V группа. β -трикальцийфосфатная керамика+гидроксиапатит+траумель С.

1 месяц после операции.

Костный дефект частично заполнен фиброзной грубоволокнистой соединительной тканью, но в основном — зрелой компактизирующейся костной тканью. В кости гранулы ГАП отсутствуют. В фиброзной ткани остаются гранулы, окру-

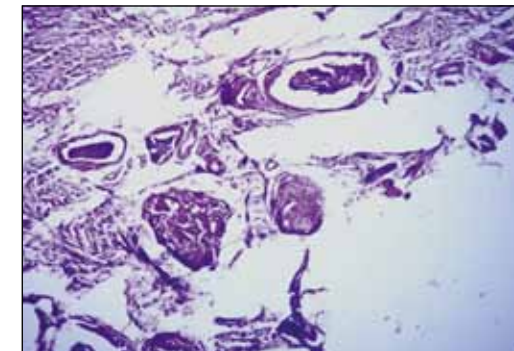


Рис. 12. Многочисленные гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой, в мягких тканях десны. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

жённые соединительнотканной капсулой (рис. 10).

2 месяца после операции.

Большая часть полости замещена компактизирующейся зрелой костной тканью (рис. 11). В рыхлой соединительной ткани десны остаются ещё гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой (рис. 12). По-видимому, гранулы ГАП во время операции частично выпадают из костного дефекта.

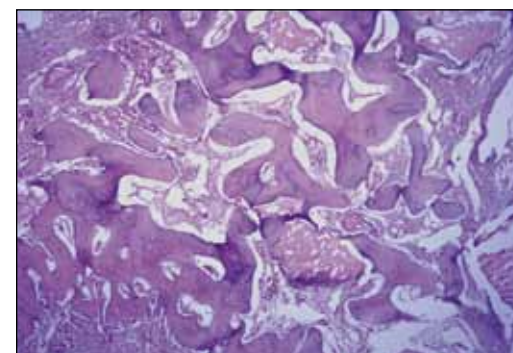


Рис. 13. Зрелые костные балки и гранулы ГАП между ними. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

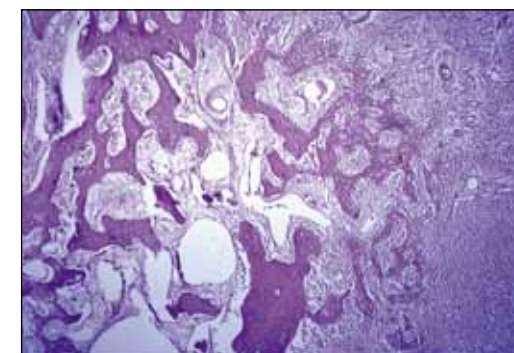


Рис. 14. Слева – зрелая губчатая кость, справа – фиброзная грубоволокнистая ткань, между ними незрелые костные балки и гранулы ГАП с лизисом содержимого. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

VI группа. β -трикальцийфосфатная керамика + гидроксипатит + траумель С + богатая тромбоцитами плазма.

1 месяц после операции.

Практически вся полость бывшего костного дефекта заполнена новообразованной губчатой костью, состоящей из зрелых трабекул. Между трабекулами виден костный мозг и остающиеся гранулы ГАП (рис. 13).

2 месяца после операции.

Полость бывшего дефекта замещена в основном зрелой губчатой костью, среди которой остаются лишь небольшие гранулы ГАП. При этом ГАП в гранулах подвергается лизису и резорбции (рис. 14). Частично полость занята фиброзной грубоволокнистой тканью. Между этими двумя тканями (т.е. на краю формирующейся губчатой кости) видны незрелые костные балки.

Выводы

Гистологическое изучение дефектов костной ткани альвеолярных дуг челюстей кроликов, заполненных остеопластическими материалами (β -трикальцийфосфатной керамики, гидроксипатита (ГАП), траумель С, богатой тромбоцитами плазмой и сочетанием этих материалов) в динамике заживления дефектов (1 и 2 мес.) позволяет определить особенности репаративных процессов.

В контрольной группе, где костные дефекты были заполнены кровяным сгустком (аутокровью), репаративный остеогенез через 1 месяц после операции только начинался. Дефект был заполнен в основном грубоволокнистой остеогенной соединительной тканью и только на краях появлялись незрелые остеонидные трабекулы. Через 2 месяца репаративный остеогенез усиливался: большая часть

дефекта была заполнена ещё незрелыми костными трабекулами.

При использовании β -трикальцийфосфатной керамики (2 группа опытов) уже через 1 месяц репаративный остеогенез имел такой же характер, как на 2 месяца в контрольной группе. Через 2 месяца в этой группе большая часть дефекта была заполнена относительно зрелой костной тканью, которая местами компактизируется.

Применение ГАП через 1 месяц в меньшей степени усиливает остеогенез, чем в случае β -трикальцийфосфатной керамики, так как на этот срок пространство ещё занято гранулами ГАП. Однако костные трабекулы и в этот срок более зрелые, чем в контроле. Через 2 месяца костная ткань в бывшем дефекте по зрелости уже не отличается от предыдущей группы.

Сочетание β -трикальцийфосфатной керамики с ГАП (4 группа опытов), а также сочетание этих материалов с траумель С (5 группа) ускоряют остеогенез в дефекте кости как через 1, так и через 2 месяца наблюдения. Наибольшая активность репаративного остеогенеза отмечается в 6 группе опытов, где те же материалы сочетались с богатой тромбоцитами плазмой. У животных этой группы уже через 1 месяц костный дефект был заполнен зрелой губчатой костью, в которой ещё обнаруживаются гранулы ГАП, а ко второму месяцу опыта ГАП уже, в основном, резорбируется.

Список литературы

1. **Зорян Е.В., Зорян А.В.** Гомеопатический метод лечения и возможность его использования в стоматологической практике // Клиническая стоматология. 2002. № 3. С.48-52.
2. **Зорян Е.В.** Очерки по гомеопатии для

стоматологов. М. Арнебия. 2005. 160 с.

3. **Балин В.Н., Черныш В.Ф.** Опыт клинической апробации материалов на основе биокерамики в стоматологии // Стоматология. 1996. № 5 С. 45-46.
4. **Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmel S.R., Strauss J.E., Georgeff K.R.** Platelit-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg // Oral med Oral Pathol

Oral Radiol Endod.1998;85:638-646.

5. **Landesberg L.A. et al.** PVP-Observed Private Practice Protocol (Harvest Technologies Corp., Plymouth MA) // G. Oral Maxillofac Surg. 2000;58:247.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. М.: Профиль. 2С. 2010. 358 с.

Experimental modeling with the aim of histology studying of bone defects of alveolar arches of rabbits in dynamics by filling them with osteoplastic materials

R.V. Martirosyan, A.B. Shehter, V.N. Balin, G.D. Kapanadze, L.V. Vinokurova

Histologic studying of the received materials in experiment on laboratory animals (rabbits) by comparative efficiency of the separate and combined application nanostructure β -Ca₃(PO₄)₂ ceramics and a hydroxyapatite (a mineral component), a complex homeopathic preparation Traumel C (a natural component) and rich thrombocytes plasmas from autoblood has been spent.

Key words: efficiency of a combination of osteomaterials, Traumel C and rich thrombocytes plasmas, rabbits.