

© Бурьянов О. А., Омельченко Т. Н., Ярмолюк Ю. А., Вакулич М. В.

УДК 616.71-003.93:577.95]:092.9

*Бурьянов О. А., *Омельченко Т. Н., **Ярмолюк Ю. А., *Вакулич М. В.

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АУТОГЕННОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ И ФИБРИНА, ОБОГАЩЕННОГО ТРОМБОЦИТАМИ

*Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца
(г. Киев)

**Национальный военно-медицинский клинический центр (г. Киев)

vakulichmyroslov@gmail.com

Работа является фрагментом НИР, выполняемой кафедрой травматологии и ортопедии Национального медицинского университета имени А. А. Богомольца по теме: «Система восстановительного лечения и реабилитации пациентов с последствиями поражений голеностопного сустава», № государственной регистрации 0115U000697.

Вступление. Данные, представленные в литературе по лечению переломов костей с использованием плазмы и фибрина, обогащенного тромбоцитами, не однозначные, а иногда и спорные [10]. Наряду с положительными результатами [6,8,9], в научной литературе представлены экспериментальные и клинические данные о неэффективности использования ПОТ для лечения переломов и осложнений после перелома [5,7]. С одной стороны, это связано с особенностями получения и использования различных концентраций плазмы обогащенной тромбоцитами, с другой – применением различных матриц совместно с плазмой (PRP) и фибрином (PRF), обогащенных тромбоцитами.

Цель исследования – изучить в эксперименте на кроликах морфологические особенности регенерации дефектов кости критического размера в условиях использования в качестве матриц трансплантатов из аутокости в сочетании с фибрином, обогащенным тромбоцитами (PRF).

Объект и методы исследования. Имплантация аутогенных трансплантатов (аутокость и аутокость совместно с фибрином, обогащенным тромбоцитами, PRF) в костные дефекты. Эксперимент был проведен на 9 кроликах с соблюдением требований «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используют в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986) и Закона Украины о гуманном отношении к подопытным животным [2,3]. Статья рассмотрена и рекомендована к печати комиссией по биоэтике при ГУ «ИТО НАМН Украины», протокол № 3 от 01.09.2016.

Хирургическое вмешательство проводили под кетаминным наркозом (100-150 мг) с местной анестезией 0,5% раствором новокаина. Стоматологическим бором в области большеберцовой кости воспроизводили транскортикальный дефект диаметром 3 мм. Контрольные дефекты оставляли незаполненными. Область оперативного вмешательства заполняли аутогенной костью или аутогенной костью в сочетании с фибрином, обогащенным тромбоцитами.

Животные всех серий были выведены из эксперимента на 39 сутки путем введения в одну из ушных вен 0,5-1.0 мл 10% раствора тиопентала натрия.

У всех кроликов выделяли большеберцовые кости с областью дефекта, которые фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, декальцинировали в 5% растворе азотной кислоты, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости (от 60° до 96°), а также в смеси этилового спирта с диэтиловым эфиром (в соотношении – 1:1). Образцы заключали в целлоидин, блоки уплотняли в густом целлоидине под парами хлороформа. Изготавливали срезы толщиной 7-10 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином [4]. Срезы (толщиной 7-9 мкм) были окрашены гематоксилином и эозином и исследованы под микроскопами «AxioStar Plus» и «MICROS».

Морфометрический анализ проводили для определения площади костной ткани, формирующейся в дефекте в различных сериях эксперимента. Исследовали относительную площадь новообразованной костной ткани в костном дефекте с помощью квадратно-сетчатой окулярной вставки (на площади 19600 мкм²) по методике Автандилова Г.Г., подсчитывая количество точек (пересечений квадратов), которые попадали на костную ткань [1]. Показатели выражали в процентах.

Статистический анализ был выполнен с использованием программных пакетов Microsoft Excel XP. Для определения различий между группами применяли t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Аутокость. Дефекты, воспроизведенные в области кортекса большеберцовой кости, были заполнены новообразованной костной тканью, перемежающейся с фрагментами аутокости (**рис. 1**). Регенерат отличается от прилежащей кости, хаотичным расположением костных трабекул и их различной зрелостью.

Отличительной особенностью регенератов, сформировавшихся в области дефекта, была их ширина – наряду с узкими полосками костной ткани, соединяющей фрагменты кортекса материнской кости, у других животных обнаружены регенераты, плотно заполняющие межкортикальную область. По всей вероятности, формирование регенератов зависело от плотности заполнения области дефекта аутокостью.

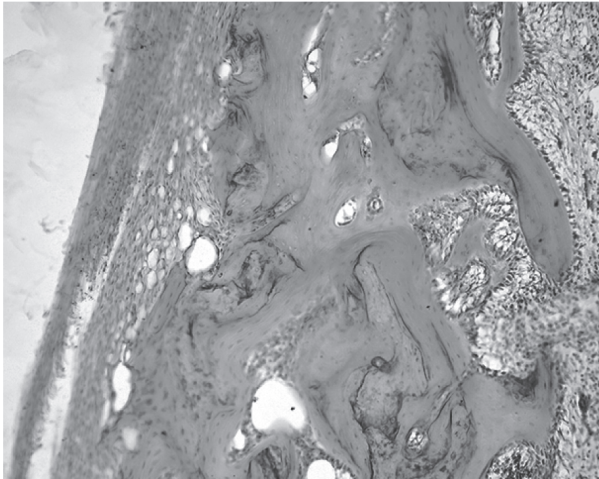


Рис. 1. Регенерат в области кортекса большеберцовой кости. Сеть из костных трабекул различной зрелости. Плотность остеоцитов неравномерная. Небольшие фрагменты неперестроившейся аутокости. Гематоксилин и эозин. Ув. 100.

На поверхности костных трабекул, формирующих регенерат, плотность остеоцитов была неравномерная, обнаружены участки костной ткани с высокой плотностью клеток и бесклеточные области. Новообразованная костная ткань располагалась между небольшими фрагментами аутокости, которые отличались от новообразованной костной ткани областями повышенной базофилии и на участках – повышенной клеточностью, что свидетельствует об их перестройке. В регенерате между костными трабекулами обнаружены кровеносные сосуды различного калибра.

Со стороны костномозгового канала на костных трабекулах отмечалась повышенная плотность остеобластов. В этой области располагалась фиброретикулярная ткань с высокой плотностью клеток фибробластического дифферона.

В костномозговом канале присутствовали фрагменты аутокости с признаками слабо выраженной перестройки. Признаков воспалительной реакции в костномозговом канале, вблизи имплантированной аутокости и на расстоянии от области дефекта, не выявлено.

Над областью дефекта сформировался периост, представленный коллагеноволоконистой тканью рыхлой и плотной структуры.

Кортекс, прилегающий к области дефекта, с признаками реактивной перестройки. Сосудистые каналы расширены, зафиксировано формирование резорбтивных полостей и полей без остеоцитов.

Аутокость и фибрин, обогащенный тромбоцитами. Как и в предыдущей серии эксперимента, в области дефекта сформирован костный регенерат, который плотно спаян с кортексом, но отличается неупорядоченным расположением генераций пластинчатой костной ткани и сосудистых каналов, идущих в различных направлениях (рис. 2). В новообразованной костной ткани присутствовали фрагменты не лизированных костных трансплантатов с признаками перестройки. По сравнению с серией эксперимента, в которой дефекты были заполнены только костной стружкой, выявлены значи-

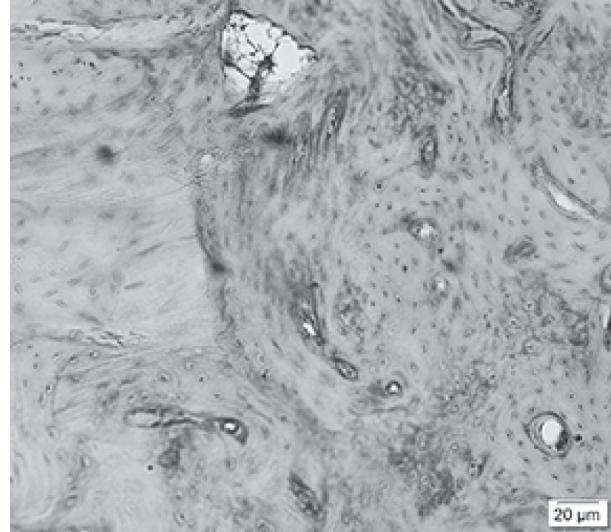


Рис. 2. Фотоотпечаток препарата. Регенерат плотно спаян с прилегающей костной тканью кортекса. Новообразованная костная тканью с узкими сосудистыми каналами в области дефекта. Высокая плотность остеоцитов. Небольшие участки не лизированных костных трансплантатов. Гематоксилин и эозин. Ув. 200.

тельно меньшие по площади участки, занимаемые трансплантатами, что может свидетельствовать о повышении остеогенных потенций трансплантатов и их перестройке за счет дополнительного введения в дефект фибрина (PRF). Вероятно, PRF путем сорбции на поверхности костных трансплантатов, способствует ускорению их перестройки, сопровождающейся замещением трансплантатов новообразованной костной тканью.

Костная ткань в регенерате отличалась от материнской кости высокой плотностью остеоцитов, имеющих базофильные ядра, которые были окружены цитоплазмой небольшого объема. Клетки располагались в узких лакунах, что свидетельствует об отсутствии остеоцитарного остеолиза.

На поверхности кортекса, прилегающего к области дефекта, отмечена высокая плотность остеоцитов. Зафиксировано формирование небольших очагов перестройки костной ткани с высокой плотностью остеобластов. Обнаружено формирование остеонов. В целом, деструктивных нарушений, отмеченных в предыдущей серии эксперимента на аналогичных областях кортекса, не выявлено.

В контрольной серии в незаполненных дефектах располагалась в основном губчатая костная и соединительная ткани. В прилегающей к дефекту костной ткани выявлены очаги rarefакции и бесклеточные области.

Для объективизации полученных данных проведено морфометрическое исследование (рис. 3).

Трабекулярная костная ткань присутствовала только в контрольной серии и у животных, дефекты которых были заполнены аутокостью, однако в этой серии площадь ее была меньше на 37,2% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем. Соединительной ткани было на 27% ($P < 0,001$) меньше в дефектах животных в серии эксперимента с аутокостью по сравнению с животными контрольной серии. Фрагменты

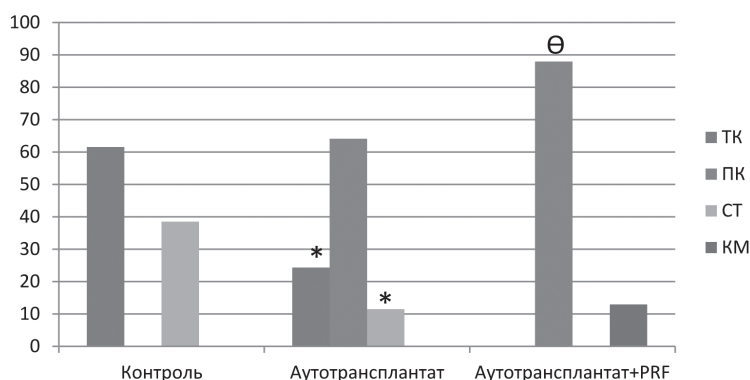


Рис. 3. Относительная площадь (%) новообразованной костной ткани в смоделированных костных дефектах кроликов в различных сериях эксперимента. Обозначения: ТК – трабекулярная костная ткань, ПК – пластинчатая костная ткань, СТ – соединительная ткань, КМ – костный мозг. * – сравнение показателей с контролем; Θ – сравнение показателей серий «аутоотрансплантат – аутоотрансплантат+PRF».

костной стружки были плотно спаяны с пластинчатой костной тканью и перестраивались с замещением костной тканью. Выделить границы микрофрагментов не представлялось возможности, в связи с этим была оценена общая площадь. Пластинчатая костная ткань располагалась только в дефектах, заполненных костным аутоотрансплантатом ($64,1 \pm 1,8$), а также аутокостью в сочетании с PRF ($87,93 \pm 2,38$),

в которой была повышена на 23,9% ($P < 0,001$). Полученные данные свидетельствуют, что заполнение костных дефектов аутокостью в сочетании с PRF, стимулирует репаративный остеогенез.

Выводы

1. В дефектах, воспроизведенных в области большеберцовой кости кроликов, новообразованная костная ткань была плотно спаяна с фрагментами аутокости, которая к исследованному сроку полностью не перестроилась. В зависимости от плотности заполнения дефектов аутокостью, объемы регенератов в области кортекса различались по площади.

2. Заполнение дефекта аутокостью в сочетании с PRF способствует стимуляции репаративного остеогенеза. В области травматического повреждения располагалась зрелая пластинчатая костная ткань, спаянная с костными стружками, которые формировали единый массив.

Перспективы дальнейших исследований.

Расширение показаний для стимуляции репаративного остеогенеза путем использования PRP и PRF на основе выбора и оценки различных матриц

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М., Медицина. 1990. — 356 с.
2. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – (Міжнародний документ Ради Європи). – Режим доступу до документа: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137.
3. Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Стаття 26).
4. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
5. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion? / H.T. Hee, M.E. Majd, R.T. Holt [et al.] // Eur Spine J. – 2003. – Vol. 12. – P. 400-407.
6. Platelet-rich plasma promotes healing of osteoporotic fractures / L. Chen, X. Yang, G. Huang [et al.] // Orthopedics. – 2013. – Vol. 36, № 6. — P. 687-694.
7. Platelet-rich plasma for long bone healing Plasma rico em plaquetas para consolidação de ossos longos / M. Lenza, S. Ferraz, D.C.M. Viola [et al.] // Einstein. – 2013. – Vol. 11, № 1. – P. 122-127.
8. Role of platelet-rich plasma in acceleration of bone fracture healing / R. Simman, A. Hoffmann, R.J. Bohinc [et al.] // Ann Plast Surg. – 2008. — Vol. 61, № 3. — P. 337-344.
9. Stanton T. High-concentrate PRP Promotes Healing in Long-Bone Nonunions / T. Stanton. [Electronic resource] – Режим доступа: URL: http://www.aaos.org/News/The_Daily_Edition_of_AAOS_Now/2012/.
10. The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration / R. Civinini, A. Macera, L. Nistri, B. Redl // Innocenti Clin. Cases Miner. Bone Metab. – 2011. – Vol. 8, № 1. – P. 25-31.

УДК: 616.71-003.93.:577.95]:092.9

РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКИ ПРИ ВИКОРИСТАННІ АВТОГЕННОЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ТА ФІБРИНУ, ЗБАГАЧЕНОГО ТРОМБОЦИТАМИ

Бур'янов О. А., Омельченко Т. Н., Ярмолюк Ю. А., Вакулич М. В.

Резюме. Дані, представлені в літературі з лікування переломів кісток з використанням плазми та фібрину, збагаченого тромбоцитами, неоднозначні, а іноді й спірні. В роботі, на підставі вивчення в експерименті на кроликах регенерації дефектів кістки критичного розміру в умовах використання в якості матриць трансплантатів з автокістки в поєднанні з фібрином, збагаченим тромбоцитами, встановлено, що в області травматичного ушкодження розташовувалася зріла пластинчаста кісткова тканина, спаяна з кістковими трансплантатами у вигляді стружки, які були з ознаками активної перебудови. Морфометричний аналіз регенерації кістки у тварин без заповнення дефекту або заповнення тільки кістковим аутоотрансплантатом, свідчить про стимуляцію репаративного остеогенезу при сполученні автокістки та фібрину, збагаченого тромбоцитами.

Ключові слова: регенерація кістки, фібрин, збагачений тромбоцитами, аутоотрансплантат, кролі.

УДК: 616.71-003.93.:577.95]:092.9

РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АУТОГЕННОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ И ФИБРИНА, ОБОГАЩЕННОГО ТРОМБОЦИТАМИ

Бурьянов О. А., Омельченко Т. Н., Ярмолюк Ю. А., Вакулич М. В.

Резюме. Данные, представленные в литературе по лечению переломов костей с использованием плазмы и фибрина, обогащенного тромбоцитами, неоднозначные, а иногда и спорные. В работе на основании изучения в эксперименте на кроликах регенерации дефектов кости критического размера, в условиях применения в качестве матриц аутоотрансплантатов в сочетании с фибрином, обогащенным тромбоцитами, показано, что в области травматического повреждения располагалась зрелая пластинчатая костная ткань, спаянная с костными трансплантатами, которые были с признаками активной перестройки. Морфометрический анализ регенерации кости у животных без заполнения или заполнения дефектов только костным аутоотрансплантатом, свидетельствует о стимуляции репаративного остеогенеза при сочетании аутокости и фибрина, обогащенного тромбоцитами.

Ключевые слова: регенерация кости, фибрин, обогащенный тромбоцитами, аутоотрансплантат, кролики.

UDC: 616.71-003.93.:577.95]:092.9

BONE REGENERATION USING AUTOGENOUS BONE AND PLATELET-RICH FIBRIN

Buryanov O. A., Omelchenko T. N., Yarmolyuk Y. A., Vakulich M. V.

Abstract. The data presented in the literature for the treatment of bone fractures with the use of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin (PRP and PRF), platelet-enriched, not unambiguous, and sometimes, controversial. In the scientific literature along with the positive results there are experimental and clinical data inefficient use of PRP and PRF for the treatment of fracture and its complications.

Objective: to study in experiments on rabbits morphological features repair of bone critical size defects in terms of use as a graft of autologous bone matrix in combination with PRF.

The experiment was conducted on 9 rabbits in compliance with International requirements and the Law of Ukraine on the humane treatment with experimental animals. Transcortical defect (diameter of 3 mm) was reproduced on distal parts of tibia. Three series of experimental investigation was performed. Control defects were left unfilled. In experimental rabbits defects was filled with autogenous bone or autologous bone in combination with platelet rich fibrin. Animals were killed on 39 day experiment by introducing into the ear veins of 0,5-1.0 ml of 10% solution of sodium thiopental. Tibia with defect was isolated and after histological wiring was examined under microscopes «AxioStar Plus» and «MICROS». Morphometric analysis by the method Avtandilov G.G. was performed to determine the area of bone into the defect in different series experiment.

Defects reproduced in the tibia in control animals were filled with connective tissue and cancellous bone. The cancellous bone was present only in control defects and defects animals, which were filled with autologous bone, but in this series has its area was reduced by 37.2% ($P < 0.001$) compared to controls. Connective tissue was on 27% ($P < 0.001$) less into bone defects in animals with autologous bone as compared to control series. Fragments of bone chips were tightly fused with the laminar bone and reconstructed with replacement of bone tissue. The border of bone chips not differentiated, in this regard, has been estimated the total area. Lamellar bone tissue was located only into defects filled with autogenous bone (64.1 ± 1.8), as well as in combination with autologous bone+ PRF ($87,93 \pm 2,38$), area which was increased by 23.9% ($P < 0.001$). The findings suggest that the filling of bone defects by autogenous bone combined with the PRF, stimulates reparative osteogenesis.

Keywords: bone regeneration, platelet-rich fibrin, autologous bone, rabbits.

Рецензент — проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 30.01.2017 року