

Морфологическая оценка костной ткани под коллагеновыми и титановыми мембранами в эксперименте

А. А. Долгалева, д.м.н., доцент кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии¹
И. С. Амхадов, аспирант кафедры хирургической стоматологии и имплантологии¹
Р. М. Атабиев, аспирант кафедры хирургической стоматологии и имплантологии¹
К. А. Цукаев, аспирант кафедры хирургической стоматологии и имплантологии¹
Н. Г. Аракелян, студентка стоматологического факультета²
Д. С.-А. Елдашев, аспирант кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии²

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского», г. Москва

²ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ставрополь

Morphological evaluation of bone tissue under collagen and titanium membranes in experiment

A. A. Dolgalev, I. S. Amkhadov, R. M. Atabiev, K. A. Tsukaev, N. G. Arakelyan, D. S.-A. Eldashev

Moscow Regional Research Clinical Institute n.a. M. F. Vladimirsky, Moscow; Stavropol State Medical University, Stavropol; Russia

Резюме

Целью данного исследования явилось проведение сравнительной оценки двух видов мембран для направленной костной регенерации. Сравнивалась пролиферативная активность титановой мембраны и мембраны изготовленной из коллагена. Работа выполнена на биопсийном материале челюстей баранов, которым проведена костная аугментация с применением двух разновидностей мембран. Морфологические и гистохимические исследования биоптатов показали высокую пролиферативную активность исследуемых образцов.

Ключевые слова: костная аугментация, мембраны, грануляционная ткань, воспаление, остеогенез, направленная костная регенерация.

Summary

The aim of this study was to perform a comparative evaluation of two types of membranes for guided bone regeneration. The proliferative activity of a titanium membrane and a membrane made of collagen. The work was performed on the biopsy material of the rams' jaws, which performed bone augmentation using two types of membranes. Morphological and histochemical studies of biopsy samples showed high proliferative activity of the samples under study.

Key words: bone augmentation, membrane, granulation tissue, inflammation, osteogenesis, guide bone regeneration

Введение

Направленная костная регенерация является наиболее актуальным вопросом современной медицины. Использование коллагеновых и титановых мембран дает хороший стойкий результат при восстановлении дефектов костной ткани [1, 2, 3, 4, 5].

Мембраны для регенерации костной ткани должны:

- быть биосовместимыми;
- обладать барьерными свойствами;
- удерживать пространство для формирования кости;
- быть достаточно прочными и одновременно гибкими, чтобы можно было формировать контур кости.

Цель исследования

Изучить процесс новообразования костной ткани в динамике и оценить эффект действия остеопластического материала «Ксенографт» на процесс репаративной регенерации, провести

сравнительную оценку степени восстановления костного дефекта при использовании остеопластического матрикса с различными мембранами.

Задачи исследования

1. Изучить в эксперименте на животных эффективность направленной костной регенерации с применением костнопластического материала XENOGRAFT и мембраны BioPLATE Barrier.
2. Провести клиническое сравнение процессов регенерации костной ткани с использованием различных мембран.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования явились следующие материалы:

- костный матрикс XENOGRAFT Collagen субтотальной деминерализации;

- биорезорбируемая коллагеновая мембрана серии bioPLATE Barrier;
- титановая мембрана.

Экспериментальные исследования

Доклиническое исследование проводили в виварии опытной станции Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. В эксперименте in vivo использовали шесть половозрелых овец северо-кавказской мясошерстной породы в возрасте полутора-двух лет с полностью сформированными корнями зубов. Масса тела животных составляла 35–40 кг. Овец содержали в вольерах на обычном пищевом рационе (рис. 1). Овцы были разбиты на три группы по две особи.

Опыты производили в соответствии с положением приказа № 775 МЗ СССР от 12.08.77. Все манипуляции выполняли под наркозом путем внутримы-

печного введения раствора тиопентала натрия в расчете 50 мг на 1 кг массы тела животного. Для премедикации применяли следующую комбинацию препаратов: дроперидол 0,25% — 0,2 мл/кг + реланиум 0,5% — 0,2 мл/кг + трамал 1,0 мл внутримышечно (рис. 2).

Имплантацию материалов проводили по следующей методике. Через наружные разрезы в поднижнечелюстных областях длиной 6–7 см осуществляли доступ к поверхностям правой и левой сторон тела нижней челюсти (рис. 3).

Кортикальная пластинка трепанировалась фрез-трепаном диаметром 8 мм, им же создавалось по две искусственных костных полости округлой форм на правой и левой половинах нижней челюсти (рис. 4).

После медикаментозной обработки костные дефекты заполняли костным материалом, и накладывали мембраны (рис. 4, 5).

Мягкие ткани послойно ушивали резорбируемым шовным материалом, на коже — нерезорбируемые швы (рис. 6).

Методика забора материала для гистологического исследования

Овец выводили из эксперимента через 1, 3 и 6 месяцев. Забор материала для морфологического исследования проводили с помощью остеотомов, дисковой пилы, костных кусачек.

Перед подготовкой к гистологическому исследованию проводили сканирование полученных блоков с помощью конусно-лучевой компьютерной томографии.

Образцы тканей фиксировали в нейтральном 7-процентном формалине, подвергали декальцинации, проводили через серию спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали: гематоксилином и эозином; по методу Вейгерта — Ван Гизона; Сириусом красным. Используя микроскоп с цифровой фотонасадкой Sony разрешением 12 мегапикселей, с каждого гистологического препарата было получено по пять фотографий. На микрофотографиях с использованием программ ImageView, ImageTool v.2.00 проводили оценку воспалительной реакции,



Рисунок 1. Один из этапов операции.

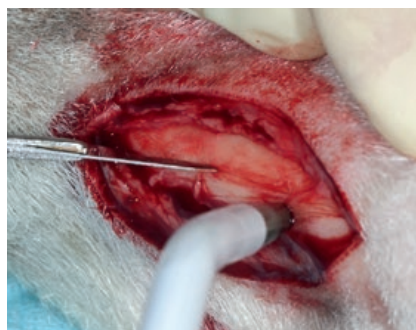


Рисунок 2. Этап операции. Разрез мягких тканей и скелетирование поверхности нижней челюсти.

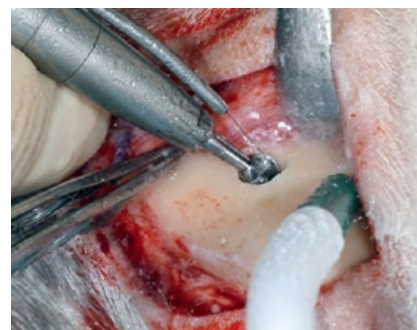


Рисунок 3. Формирование костного дефекта.



Рисунок 4. Костный матрикс XENOGRAFT Collagen субтотальной деминерализации; биорезорбируемая коллагеновая мембрана серии bioPLATEBARRIER; титановая мембрана.



Рисунок 5. Костные дефекты заполнены аутоментом. Установлены мембраны.

клеточного состава, коллагеновых и эластических волокон; выявляли процентное соотношение типа коллагена.

Микроскопирование гистологических препаратов и микрофото съемку проводили с помощью микроскопа Leica DM 1000, фотодокументирование осуществляли цифровой камерой DFC 420 с программным обеспечением.



Рисунок 6. Этапы ушивания раны.

Таблица 1
Фрагменты из области эксперимента с костной тканью под мембраной. А. Окраска гематоксилином и эозином, ув.200×. Б. Окраска по методу Вейгерта — Ван Гизона, ув. 200×

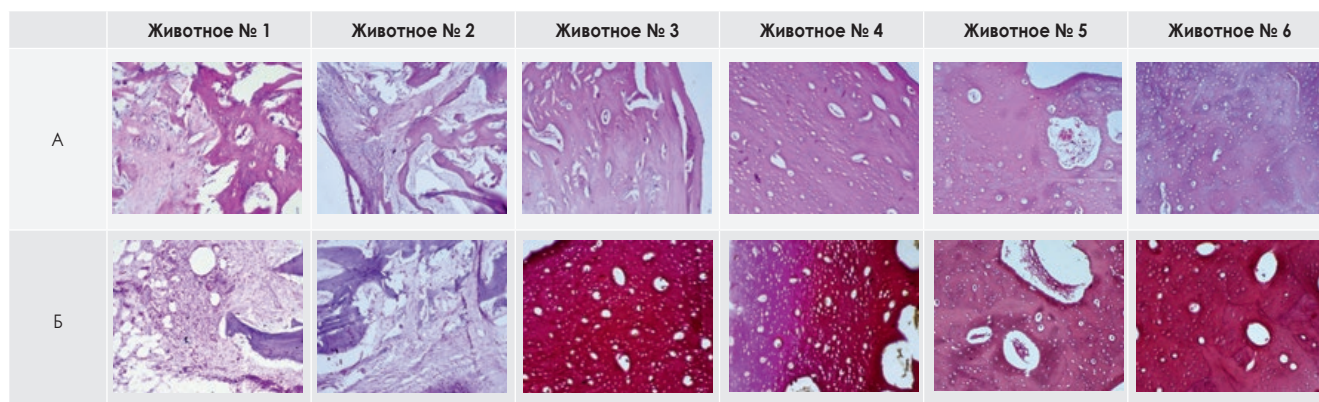


Таблица 2
Фрагменты из области эксперимента с костной тканью под мембраной, окраска Сириусом красным, при проведении поляризационной микроскопии, ув. 200×

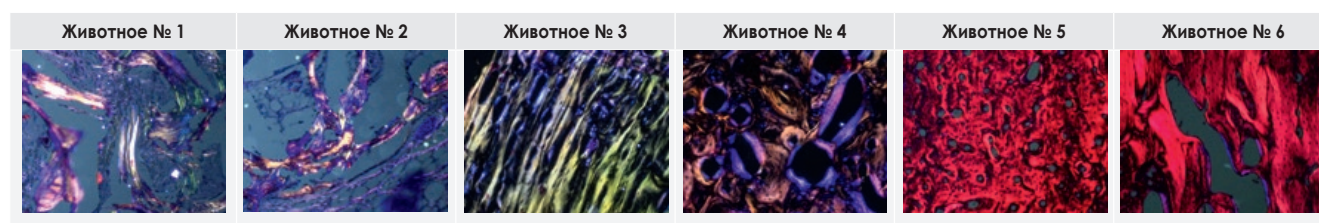


Таблица 3
Процентное соотношение типов коллагена

Образец	Тип коллагена	Min, %	Max, %	Среднее значение, %
Спустя 1 месяц Животное № 1	I тип	5,49	21,91	16,50
	III тип	7,91	20,62	12,73
Спустя 1 месяц Животное № 2	I тип	39,80	43,53	41,61
	III тип	14,63	24,61	21,45
Спустя 3 месяца Животное № 3	I тип	4,14	28,03	14,70
	III тип	14,48	34,02	22,52
Спустя 3 месяца Животное № 4	I тип	12,70	23,67	19,12
	III тип	6,65	15,01	10,37
Спустя 6 месяцев Животное № 5	I тип	67,80	90,10	80,05
	III тип	0,90	4,10	2,08
Спустя 6 месяцев Животное № 6	I тип	70,70	84,90	77,63
	III тип	3,80	8,20	5,80

Результаты исследования

1. Морфологическое исследование фрагментов из области эксперимента с костной тканью под коллагеновой мембраной через 1 месяц (животные № 1, 2), 3 месяца (животные № 3, 4), 6 месяцев (животные № 5, 6).

Оценка стекол, окрашенных по методу Вейгерта — Ван Гизона, выявила преимущественное расположение аргирофильных (животные № 1, 2) и коллагеновых (животные № 3, 4, 5, 6) волокон. Эластические волокна не встречались (табл. 1).

При исследовании гистологических стекол, окрашенных Сириусом красным (Sirius Red), выявлено исходное процентное соотношение коллагеновых волокон I и III типов. При исследовании данных гистологических стекол в поляризованном свете коллаген I типа подсвечивается красным спектром света, коллаген III типа — зеленым спектром (табл. 2).

При проведении спектрального исследования с подсчетом пикселей красного цвета (I тип) и пикселей зеленого цвета (III тип) получены

следующие средние величины: через месяц после начала эксперимента среднее значение коллагена I типа в препарате составило порядка 16%, через 3 месяца — около 19%, через 6 — около 80%. Значения коллагена III были следующие: через 1 месяц — порядка 14%, через 3 — около 10%, через 6 — порядка 4% (табл. 3).

При общей оценке микроскопического исследования, выполненного на препаратах, полученных через 1, 3 и 6 месяцев, отмечается, что созревание костной ткани под коллагеновой мембраной начинается на третьем месяце после имплантации и подходит к завершению к шестому месяцу. Эта тенденция наблюдается как в ангиогенезе, так и в остеогенезе (табл. 4).

2. Фрагмент из области эксперимента с костной тканью под титановой мембраной через 1 месяц (животные № 1, 2), 3 месяца (животные № 3, 4), 6 месяцев (животные № 5, 6).

Оценка стекол, окрашенных по методу Вейгерта — Ван Гизона, выявила преимущественное расположение аргирофильных волокон через 1 месяц, сформированных коллагеновых волокон через 3 и 6 месяцев. Эластические волокна не встречались (табл. 5).

Таблица 4
Сравнительная таблица микроскопических результатов

Признак	Группа образцов					
	Спустя 1 месяц		Спустя 3 месяца		Спустя 6 месяцев	
	Животное № 1	Животное № 2	Животное № 3	Животное № 4	Животное № 5	Животное № 6
Описание фиброретикулярной ткани						
Отмечается разрастание фиброретикулярной ткани. Отмечается пролиферация остеобластов в области дефекта. В остеогенной фиброретикулярной ткани происходит отложение остеоида и появляются остеобласты	Множественные малообызвестленные костные балочки. Множественные остеобласты. Остеогенез от краев дефекта к центру	Единичные малообызвестленные костные балочки. Единичные остеобласты. Остеогенез от краев дефекта к центру	Множественные обызвестленные костные балочки. Небольшое количество остеобластов. Фиброретикулярная ткань имеет небольшую площадь. Остеогенез от краев дефекта к центру		Множественные обызвестленные костные балочки. Основной объем заполнен остеомидом и сформированной костной тканью. Процессы структуризации костной ткани подходят к завершению	
Васкуляризация	Групповые недифференцированные новообразованные сосуды синусоидного типа		Дифференцированные новообразованные сосуды синусоидного типа		Сформированные кровеносные сосуды, кровоток характерный для патологически не измененной костной ткани	
Остеоидные балочки	Большое количество диффузно по всей поверхности дефекта. Поверхность костных балок покрыта слоем остеобластов	Небольшое количество ближе к краю дефекта. Поверхность костных балок покрыта единичными остеобластами	Часть располагается диффузно по всей поверхности дефекта, а часть структурируется		Большая часть структурированная	Образование в полости бывшего костного дефекта обызвестленных остеоидных балок и сформированной костной ткани
Интенсивность процесса остеогенеза. Интенсивная дифференцировка коллагеновых волокон и сосудов	Большая	Средняя	Снижение. Активация процессов структуризации костной ткани	Выражены процессы структуризации костной ткани	Низкая	Снижение, завершение процессов структуризации костной ткани

Таблица 5
Фрагменты из области эксперимента с костной тканью под титановой мембраной.
А. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 200х. Б. Окраска по методу Ван Гизона, ув. 200х

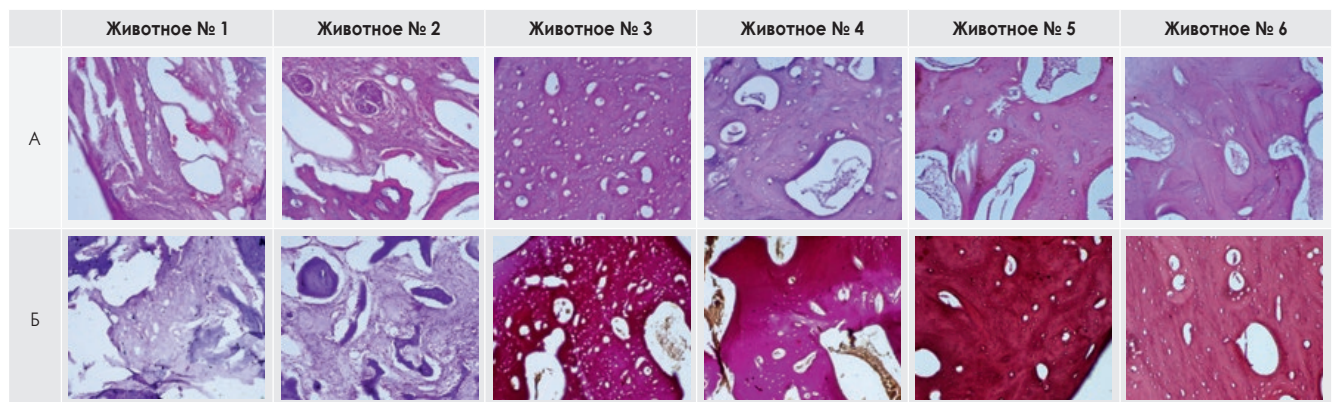


Таблица 6
Фрагменты из области эксперимента с костной тканью под титановой мембраной, окраска Сириусом красным, при проведении поляризационной микроскопии, ув. 200х



Таблица 7
Процентное соотношение типов коллагена

Образец	Тип коллагена	Min, %	Max, %	Среднее значение, %
Спустя 1 месяц Животное № 1	I тип	6,80	22,70	17,81
	III тип	8,01	20,11	13,58
Спустя 1 месяц Животное № 2	I тип	7,56	24,71	15,89
	III тип	6,89	19,28	12,87
Спустя 3 месяца Животное № 4	I тип	25,77	36,16	30,68
	III тип	19,79	33,14	26,97
Спустя 3 месяца Животное № 4	I тип	24,63	35,59	28,56
	III тип	13,49	19,08	15,50
Спустя 6 месяцев Животное № 5	I тип	73,50	86,40	80,90
	III тип	4,80	10,10	7,08
Спустя 6 месяцев Животное № 6	I тип	84,00	94,00	87,83
	III тип	1,50	4,90	3,55

При исследовании гистологических стекол, окрашенных Сириусом красным (Sirius Red), выявлено исходное процентное соотношение коллагеновых волокон I и III типов.

При исследовании данных гистологических стекол в поляризованном свете: коллаген I типа подсвечивается красным спектром света; коллаген III типа — зеленым спектром (табл. 6).

При проведении спектрального исследования с подсчетом пикселей красного цвета (I тип) и зеленого (III тип) получены следующие средние величины: через месяц после начала

Таблица 8
Сравнительная таблица микроскопических результатов

Признак	Группа образцов					
	Спустя 1 месяц		Спустя 3 месяца		Спустя 6 месяцев	
	Животное № 1	Животное № 2	Животное № 3	Животное № 4	Животное № 5	Животное № 6
Описание фиброретикулярной ткани	Пролиферация остеобластов в области дефекта, происходит отложение остеоида и появляются единичные мало обызвествленные костные балочки. Процессы остеогенеза от краев к центру			Практически отсутствует. Выявляются единичные остеобласты. Процессы остеогенеза от краев к центру	В области бывшего дефекта обызвествленные костные балочки. Небольшое количество остеобластов	Небольшое количество остеобластов. Процессы структуризации костной ткани подходят к завершению
Отмечается разрастание новообразованной костной ткани. При исследовании гистологических стекол, окрашенных гематоксилином и эозином, воспалительного процесса, лейкоцитарной инфильтрации не выявлено		Основной объем заполнен остеоидом и сформированной костной тканью				
Васкуляризация	Групповые недифференцированные новообразованные сосуды синусоидного типа, сосуды расширенные, что можно трактовать как усиленный кровоток в области эксперимента			Полностью сформированные кровеносные сосуды	Сформированные кровеносные сосуды расширенные, что можно трактовать как кровоток, характерный для патологически не измененной костной ткани	
Остеоидные балочки	Малообызвествленные ближе к краю дефекта. Поверхность костных балок покрыта единичными остеобластами		Обызвествленные. Часть располагается диффузно по всей поверхности дефекта, а часть структурируется		Образование в полости бывшего костного дефекта обызвествленных остеоидных балок и сформированной костной ткани	
Интенсивность процесса остеогенеза. Интенсивная дифференцировка коллагеновых волокон и сосудов	Выраженная		Снижение. Активация процессов структуризации костной ткани		Завершение процессов структуризации костной ткани	

эксперимента среднее значение коллагена I типа в препарате составило порядка 18 %, через 3 месяца — около 29 %, через 6 месяцев — около 86 %. Значения коллагена III были следующими: через 1 месяц — порядка 13 %, через 3 — около 19 %, через 6 — порядка 4 % (табл. 7).

При общей оценке микроскопического исследования, выполненного на препаратах, полученных через 1, 3 и 6 месяцев, отмечается, что созревание костной ткани под титановой мембраной начинается на третьем месяце после имплантации и полностью заканчивается к шестому. Это тенденция просматривается как в ангиогенезе, так и остеогенезе (табл. 8).

3. Фрагмент из области эксперимента с костью над титановым имплантатом через 1, 3 и 6 месяцев.

При оценке макропрепаратов, взятых из зоны применения титановой мембраны, выявлено нарастание костной ткани на поверхность титановой сетки (рис. 8, 9) начиная с первого месяца после имплантации.

Оценка стекол, окрашенных по методу Вейгерта — Ван Гизона, выявила наличие небольшого количества ар-

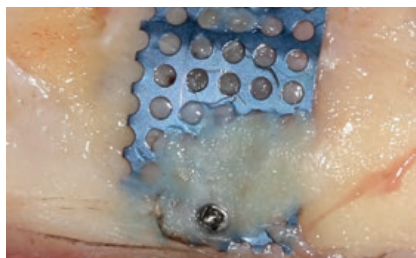


Рисунок 8. Через 1 месяц после имплантации.

гиروفильных волокон. Эластические волокна не встречались (табл. 9).

При исследовании гистологических стекол, окрашенных Сириусом красным (Sirius Red), выявлено исходное процентное соотношение коллагеновых волокон I и III типов. При исследовании данных гистологических стекол в поляризованном свете: коллаген I типа подсвечивается красным спектром; коллаген III типа подсвечивается зеленым спектром света (табл. 10).

При проведении спектрального исследования с подсчетом пикселей красного цвета (I тип) и пикселей зеленого цвета (III тип) получены следующие средние величины: через месяц после начала эксперимента среднее значение коллагена I типа в препарате составило порядка 6 %, через 3 месяца — около 27 %, через

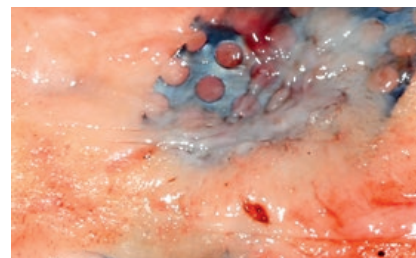


Рисунок 9. Через 3 месяца после имплантации.

6 месяцев — около 84 %. Значения коллагена III были следующими: через 1 месяц — порядка 8 %, через 3 — около 20 %, через 6 — порядка 3 % (табл. 11).

При общей оценке микроскопического исследования, выполненного на препаратах, забранных через 1, 3 и 6 месяцев, отмечается, что созревание костной ткани под титановой мембраной начинается на третьем месяце после имплантации и подходит к завершению к шестому. Эта тенденция просматривается как в ангиогенезе, так и остеогенезе (табл. 12).

Выводы

Процесс новообразования кости по таким показателям, как завершение дифференцировки остеобластов (за-

Таблица 9

Фрагменты из области эксперимента с костью над титановым имплантатом.

Через 1 месяц

А. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 200×. Б. Окраска по методу Вейгерта — Ван Гизона, ув. 200×

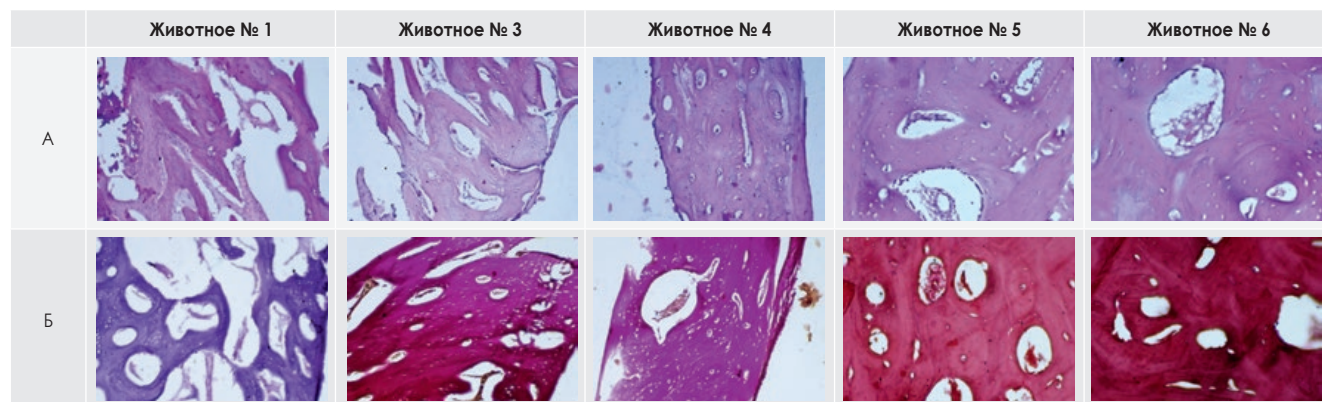


Таблица 10

Фрагменты из области эксперимента с костью над титановым имплантатом, окраска Сириусом красным, при проведении поляризационной микроскопии, ув. 200×

Через 1 месяц



Таблица 11
Процентное соотношение типов коллагена

Образец	Тип коллагена	Min, %	Max, %	Среднее значение, %
Спустя 1 месяц Животное № 1	I тип	3,45	8,44	6,25
	III тип	3,87	8,99	7,29
Спустя 3 месяца Животное № 3	I тип	6,04	65,60	30,02
	III тип	6,08	40,14	18,08
Спустя 3 месяца Животное № 4	I тип	10,36	40,48	25,20
	III тип	16,96	27,92	22,41
Спустя 6 месяцев Животное № 5	I тип	72,70	78,40	75,48
	III тип	2,40	7,50	4,30
Спустя 6 месяцев Животное № 6	I тип	84,60	92,60	89,08
	III тип	2,70	6,30	3,65

Таблица 12
Сравнительная таблица микроскопических результатов

Признак	Группа образцов				
	Спустя 1 месяц	Спустя 3 месяца		Спустя 6 месяцев	
	Животное № 1	Животное № 3	Животное № 4	Животное № 5	Животное № 6
Описание фиброретикулярной ткани	Отмечается разрастание фиброретикулярной ткани	Пролиферация остеобластов в области дефекта. Образование мало обызвествленных костных балок. Выявляются многочисленные остеобласты	Особенно по краям. Образование обызвествленных костных балок. Выявляются немногочисленные остеобласты	В области бывшего дефекта выявляются обызвествленные костные балочки. Основной объем заполнен сформированной костной тканью	
В данной области имеется разрастание новообразованной костной ткани. При исследовании гистологических стекол, окрашенных гематоксилином и эозином, воспалительного процесса, лейкоцитарной инфильтрации, не выявлено					
Васкуляризация	В фиброретикулярной ткани имеются групповые недифференцированные новообразованные сосуды синусоидного типа, сосуды расширенные. Происходят активные процессы остеогенеза по всей толщине			Сформированные кровеносные сосуды расширенные, что можно трактовать как кровоток, характерный для патологически не измененной костной ткани. Процессы структуризации костной ткани подходят к завершению	
Остеоидные балочки	Малообызвествленные	Признаки костеобразования по всей толще фрагмента. Поверхность костных балок покрыта остеобластами		Образование в полости бывшего костного дефекта обызвествленных остеоидных балок и сформированной костной ткани	
Интенсивность процесса остеогенеза. Интенсивная дифференцировка коллагеновых волокон и сосудов	Выраженная	Активация процессов остеогенеза		Снижение и завершение процессов структуризации костной ткани	

вершение остеогенеза), завершение ангиогенеза, процентное содержание коллагена I и III типов, отмечается при применении как коллагеновой, так и титановой мембраны.

Наиболее интенсивно и быстро процесс костеобразования происходит под титановой мембраной и полностью завершается к концу шестого месяца.

При использовании коллагеновой мембраны к концу шестого месяца процесс костеобразования близится к завершению, но до конца не заканчивается.

При использовании титановых мембран в эксперименте наблюдается рост костной ткани извне с нарастанием кости на поверхность титановой мембраны.

Список литературы

1. Долгалева А. А., Зеленский В. А., Базиков И. А. Перспективы развития заместительного восстановления органо-тканевых дефектов челюстно-лицевой области / Медицинская профилактика, реабилитация и курортная медицина на рубеже III — го тысячелетия: сборник статей международной научно-практической конференции / под общей редакцией В. И. Кошель. — Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2016. — С. 116.

2. Chen G., Ushida T., Tateish T. Scaffold design for tissue engineering. *MacromolBiosci* 2002; 2: 67–77.
3. Gloria A., Causa F., Russo T., Battista E., Della Moglie R., Zeppetelli S., De Santis R., Netti P. A., Ambrosio L. Three-dimensional poly (ϵ -caprolactone) bioactive scaffolds with controlled structural and surface properties. *Biomacromolecules* 2012; 13(11): 3510–3521.
4. Lin Xiao, Bo Wang, Guang Yang and Mario Gauthier. Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications // *Biomedical Science, Engineering and Technology*. InTech. p. 247–248. — 2012.
5. Stella J. A., D'Amore A., Wagner W. R., Sacks M. S. On the biomechanical function of scaffolds for engineering loadbearing soft tissues. *ActaBiomater* 2010; 6(7): 2365–2381, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.001>.

