DOI: 10.17117/na.2015.08.994

Поступила (Received): 15.08.2015

<http://ucom.ru/doc/na.2015.08.994.pdf>

Столяров М.В., Любовцева Л.А. Новообразование костной ткани челюсти с применением в дефекте материала «Остеоматрикс»

Stolyarov M.V., Lyubovtseva L.A.
A tumor of the jaw bone with the use of defect
in material "Osteomatrix"

В исследовании участвовало 20 человек от 20 до 46 лет с диагнозом хронический верхушечный периодонтит. После проведения зубосохраняющей операции в дефект костной ткани укладывался остеотропный препарат «Остеоматрикс» (ООО «Конектбиофарм»). Оценка восстановления костной ткани проводилась с помощью методов исследования с разницей во времени: 3, 7, 30, 90, 120, 150 и 360 дней после операции. К 150 дню послеоперационного периода был сделан вывод об основном, но не полноценном новообразовании челюстной кости

Ключевые слова: зубосохраняющая операция, дефект костной ткани, остеотропный материал

The study involved 20 people from 20 to 46 years with a diagnosis of chronic apical periodontitis. After toothprotecting operations in the jawbone tissue defect fit the osteotrophic material "Osteomatrix" (LLC "Conectbiofarm"). Evaluation of bone regeneration was performed using methods with the time difference: 3, 7, 30, 90, 120, 150 and 360 days after surgery. On the 150th day of the postoperative period was concluded that mainly, but not full-fledged growth of the jawbone

Key words: toothprotecting operation, bone defect, osteotrophic material

Столяров Максим Вениаминович

Ассистент

Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова

г. Чебоксары, Московский проспект, 45

Stolyarov Maxim Veniaminovich

Assistant

Chuvash state university named I.N. Ulyanov

Chuvash Republic, Cheboksary, Moskovsky ave., 45

Любовцева Любовь Алексеевна

Доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой

Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова

г. Чебоксары, Московский проспект, 45

Lyubovtseva Lubov Alekseevna

Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of Department

Chuvash state university named I.N. Ulyanov

Chuvash Republic, Cheboksary, Moskovsky ave., 45

По мнению многих исследователей, инфекционный очаг, не поддающийся медикаментозному лечению, должен быть удален из организма оперативным путем [3].

Методики хирургических вмешательств, позволяющих сохранять зубы с воспалительно-деструктивными изменениями в периапикальных тканях, получили название «зубосохраняющих операций».

Одной из важнейших проблем реконструктивной хирургии является оптимизация процессов регенерации костной ткани [5], которые зачастую зависят от концентрации биогенных аминов и гепарина [9].

Целью исследования является сопоставление содержания нейроаминов в клетках регуляторах и заживлением костной ткани челюсти при зубосохраняющих операциях с применением материала «Остеоматрикс». Ранее такие исследования не проводились.

Задачами данного исследования является:

1. Выявить состояние костной ткани и определить скорость ее восстановления;
2. Изучить динамику содержания биогенных аминов в структурах челюстной костной ткани человека после зубосохраняющих операций;
3. Определить степень зрелости гепарина в костной ткани у исследуемых пациентов.

В исследовании находилось 20 человек в возрасте от 20 до 46 лет. Материал «Остеоматрикс» (Производство: ООО «Конектбиофарм», г. Москва.) применялся в костном дефекте у 16 пациентов. В день операции проводилось исследование гранулемы. На 3-й и 7-й день биоптат получали с помощью кюретажной ложки. С 30 дня после операции проводили пункционную биопсию созревающей костной ткани с помощью иглы набора «Ostycut», производство Bard (США). Окрашивали нефиксированные криостатные срезы свежемороженого материала. В группу контроля входило 4 пациента в возрасте от 20 до 46 лет, им проводили биопсию здоровой костной ткани с помощью щипцов во время удаления ретинированных и дистопированных зубов по ортодонтическим показаниям.

Методы исследования применялись в динамике по схеме: 3, 7, 30, 90, 120, 150 и 360 дней после операции.

Были применены:

1. Люминесцентно-гистохимические методы: Falck-Hillarp [12] – для избирательного выявления катехоламинов и серотонина; С. Cross [11] – с целью идентификации гистамина. Не смотря на то, что люминесцентно-гистохимические методы Falck-Hillarp и С. Cross были разработаны еще в прошлом веке с модификацией Л.А. Любовцевой [7], при которой предлагалась замена водной среды на газовую, эти методы популярны и используются во всем мире. Содержание нейромедиаторов оценивали с помощью люминесцентного микроскопа МЛ-6 с применением фотометрической насадки ФМЭЛ-6, производитель: ОАО «ЛОМО», г. Санкт-Петербург. Показатели цифрового вольтметра определялись в условных единицах (у.е.).

2. Окраска материала по методу А. Унна с полихромным толуидиновым синим для выявления числа тучных клеток и сульфатированности гепарина. Мы использовали микроскоп «Микромед 5» с иммерсионным объективом 100X, производитель: ООО «Оптические приборы», г. Санкт-Петербург. Чтобы результаты считались достоверными клетки подсчитывались в 10 полях зрения. Далее высчитывалось среднее число каждого вида клеток в 1 поле зрения с диапазоном разброса.

В работе применялись непараметрические методы статистики. Для определения направленности и выраженности статистических изменений применялся Т-критерий Вилкоксона. С его помощью определяли, является ли сдвиг показателей в одном направлении более существенным, чем в другом. Различия стали достоверными при $p < 0,05$.

На 3-й и 7-й день при исследовании материала, полученного из раны после заполнения ее препаратом «Остеоматрикс» и окрашенного по методу Falck-Hillarп видны и плазматические клетки около 6-7 на 1 поле зрения. Они имеют округлую форму с эксцентрично расположенным ядром. Встречаются макрофаги до 12 клеток на 1 поле зрения. В них люминесцируют в основном ядра. Тучные клетки имеют тусклое свечение, обнаруживаются до 15 клеток на 1 поле зрения.

На 30-й день после операции определяются плотно упакованные коллагеновые волокна, формируются тяжи грубоволокнистой костной ткани. Определяются 4 плазматические клетки на 1 поле зрения. Около 6-7 тучных клеток и столько же макрофагов.

Через 90 дней после операции заметно формирование костных пластинок, в них накапливаются катехоламины и серотонин. Остеобласты прилежат к костным балкам в большом числе. Между слабо люминесцирующими костными пластинками находятся около 2-х тучных клеток на 1 поле зрения, 2-3 макрофага и до 2-3 плазматических клеток в 1 поле зрения.

На 120-й день в проксимальной зоне дефекта видна хорошо развитая молодая костная ткань. В 1 поле зрения можно увидеть 1-2 плазматические клетки. Число тучных клеток и макрофагов остается таким же.

На 150-й и 360-й день костные пластинки люминесцируют больше, имеют плотную структуру. Костная ткань по форме, структуре пластинок и их свечению не отличается от здоровой костной ткани. Можно заметить единичную плазматическую клетку в нескольких полях зрения (Рис.1).

Рис. 1 Применение остеотропного материала «Остеоматрикс»:

1) Остеоноподобная структура; 2) Гаверсов канал;

3) Костные пластинки. Окраска по методу Falck-Hillarп (1969) [12].

Материал взят на 150 день после операции. Микроскоп МЛ-6. Увеличение 10х10

Количественный цитоспектрофлуометрический анализ дефекта костной ткани после зубосохраняющих операций показал, что в светящихся структурах содержатся в определенных концентрациях катехоламины и серотонин. Впервые дни после операции встречается наибольшее количество макрофагов и тучных клеток с высокой концентрацией в них нейроаминов. По мере образования костной ткани число этих клеток уменьшается. На 30-й день наблюдается максимальных пик катехоламинов и серотонина уже в межклеточном веществе, а далее происходит их снижение до уровня здоровых пациентов.

При исследовании формирующейся кости на гистамин нами было обнаружено, что на срезах материала на 3й день встречаются тучные клетки до 3-х на 1 поле зрения. При этом люминесцируют в них в основном ядра, цитоплазма имеет мелкую зернистость в виде люминесцирующего облака, которое светится зелено-желтым цветом. Определяются плазматические клетки до 6-7 на 1 поле зрения. На 7-й день люминесцируют эластические волокна, имеющие желтое свечение. Определяются макрофаги в количестве 3-4 клетки в 1 поле зрения. В материале видны до 6 плазматических клеток на 1 поле зрения.

На 30-й день можно отметить образование грубоволокнистой костной ткани. Определяются не люминесцирующие остециты. Находятся макрофаги 1-2 клетки в 1 поле зрения. Встречаются плазматические клетки до 3-4 на 1 поле зрения.

На 90-й день в материале заметны рыхло расположенные костные пластинки, встречается одна клетка макрофага на 2 поля зрения. Определяются плазматические клетки до 4 на 1 поле зрения.

На 120-й день остециты и остеобласты люминесцируют полностью, но очень слабо. Плазматических клеток 2 на 1 поле зрения.

На 150-й и 360-й день костные пластинки имеют плотную структуру и полностью люминесцируют. Не люминесцируют остециты образуя общий – единый каркас. Плазматические клетки заметны очень редко.

Наиболее низкая концентрация гистамина приходится на гранулему. На 3-й и 7-й день в материале встречается наибольшее количество макрофагов и тучных клеток с высоким содержанием гистамина. На 30-й день люминесцирует полностью весь кусочек ткани, что говорит о том, что гистамин располагается не в клетках, а расположен диффузно в формирующейся костной ткани, тут наблюдается максимальный пик этого вещества. С 90-го дня количество тучных клеток и макрофагов уменьшается. И далее происходит снижение содержания гистамина в них и межклеточном веществе.

С целью изучения популяции тучных клеток нами применялся метод Унна, позволяющий оценить состояние тканевых мукополисахаридов и гепарина.

В костной ткани здоровых пациентов обнаруживается 1 тучная клетка на 2 поля зрения с γ-метахромазией и без признаков дегрануляции. Это говорит о том, что гепарин, входящий в состав тучных клеток зрелый, а значит, имеет от 4 до 5 сульфатных групп [6].

При исследовании одонтогенной гранулемы число тучных клеток увеличивается в среднем до 2-х клеток 1 поле зрения, окрашены ортохромно. В отличие от тучных клеток здоровых пациентов, заметны признаки их деграну-

ляции. Легкую метакромазию имеют макрофаги и лимфоциты, по современным данным этот факт говорит о щетинге [10].

На 3-й и 7-й день происходит прогрессирование воспалительного процесса, в материале обнаруживаются тучные клетки до 16 в 1 поле зрения, в цитоплазме просматриваются одинаковой формы ортохромные гранулы, часть которых находится за пределами неповрежденной цитоплазматической мембраны. На 30-й день обнаруживается формирование остеонов. Костные пластинки окрашены не равномерно. Определяются дегранулированные β -метахроматичные тучные клетки в количестве 6-7 клеток на 1 поле зрения. Цитоплазматическая мембрана этих клеток разорвана, и большая часть гранул находится за пределами клетки. Имеется ортохромное окрашивание материала с легкой метакромазией. Появление метахроматичности в тучных клетках связано с созреванием гепарин (Рис.2).

Рис. 2 Окраска препарата по методу А. Унна на 30 день после операции

1) Остеоноподобная структура; 2) Демаркационная линия образования костной ткани; 3) Гаверсов канал; 4) Костные пластинки. Микроскоп МЛ-6. Увеличение 10x10

На 90-й день материал окрашен ортохромно. Определяется 2 тучные клетки в среднем на 1 поле зрения β -метахроматичной окраски веретенообразной формы, сужающиеся к концу и расширяющиеся к середине клетки. На некоторых препаратах тучных клеток не обнаружено, но заметно множество β -метахроматичных гранул, это говорит о том, что клетки полностью дегранулировали и свидетельствует об ускоренном сульфатировании гепарина. На 120-й день материал окрашен ортохромно, число тучных клеток не изменилось, обнаружены костные пластинки остеонов, которые в количестве 5-6 окружают концентрически Гаверсов канал. Имеют плотную структуру. Окрашены β -хроматично с легкой γ -метахромазией. На 150-й и 360-й день определяется до 3-х γ -метахроматичных тучных клеток на 2 поле зрения в основном округлой формы.

Анализируя данные исследований установлено, что впервые дни после оперативного вмешательства происходит увеличение количества тучных клеток, активация процессов их дифференцировки и повышение функциональной

активности, возможно, это связано с тем, что они являются огромным по емкости депо медиаторов [1]. Увеличение числа тучных клеток совпадает с ускорением процессов дифференцировки фибробластов, что выражается в образовании на 30-й день ретикулофиброзной костной ткани. Впервые дни после операции, когда идет усиленный приток сюда клеток воспаления, нейроамины в большом количестве выделяются из разрушенных сосудов в костный матрикс. Вместе с макрофагами утилизируют излишки нейроаминов и тучные клетки [8]. Благодаря секретиции гистамина, серотонина и катехоламинов тучные клетки регулируют проницаемость сосудов и участвуют в поддержании биоаминного гомеостаза [2].

В острых и хронических воспалительных процессах участвуют нейроамины и гепарин тучных клеток. Под влиянием антигена нейроамины начинают выделяться из тучных клеток, участвуют в поддержании гипоксии, выражающейся в увеличении внутриклеточного кальция, активации мембральных фосфолипаз, повышении проницаемости мембран, снижении уровня АТФ и деструкции митохондрий иммунокомпетентных клеток [8]. Лишь после 30 суток идет снижение количества нейроаминов до показателей здоровых пациентов, что происходит к 150 дню, в связи с формированием новой костной ткани. У здоровых пациентов на 150-й и на 360-й день после операции можно заметить лишь единичные тучные клетки в нескольких полях зрения.

К 150-му дню во всех исследуемых клетках происходит стабилизация содержания биогенных аминов. Мы предполагаем, это объясняется тем, что процесс новообразования костной ткани челюсти подходит к завершению. В костных пластинках содержание нейроаминов снижается и доходит до содержания в здоровой альвеолярной костной ткани. Мы считаем, что снижение содержания нейроаминов объясняется факторами их контролирующими, в частности, гепарином.

Выявленные нами тучные клетки здоровой костной ткани в основном располагаются вблизи остеонподобных структур и имеют γ-метахромазию, что говорит о высокой сульфатированности гепарина. Это можно объяснить тем, что в костной ткани имеется большое количество хондроитин сульфата, который стимулирует синтез гликозаминогликанов, в том числе гепарина. Хондроитин сульфат замедляет резорбцию костной ткани, ускоряет процессы репарации костной ткани, оказывает противовоспалительное действие [4].

При исследовании гранулемы обнаруживается небольшое количество тучных клеток. При окраске толуидиновым синим эти клетки имеют ортохромное окрашивание, что свидетельствует о наличии незрелого гепаринмоносульфата. Тучные клетки выглядят опустошенными. Возможно, это связано с хроническим воспалительным процессом, что приводит к «старению» популяции тучных клеток и истощению нейромедиаторной системы человека.

С первых суток после операции мы видим массовую дегрануляцию ортохромных тучных клеток. Гранулы свободно лежат в тканях (гранулы единичные, или определяется скопление большого количества гранул). Такое морфологическое и функциональное состояние тучных клеток позволяет предположить, что воспалительная реакция в дефекте костной ткани в наших исследо-

ваниях протекала на фоне выхода гистамина из тучных клеток без связывания его гепарином. На 30-й день послеоперационного периода появляются β -метахроматичные тучные клетки, что связано с созреванием гепарина и увеличением сульфатных групп в нем. При полноценном восстановлении дефекта костной ткани и окончательном формировании костных пластинок появляется γ -метахромазия тучных клеток. Поскольку гепарин тучных клеток участвует в инактивации нейтрофилов полученные результаты косвенно свидетельствуют об увеличении уровня медиаторов при воспалении, что подтверждается нашими данными.

Проведенное нами исследование дает качественную и количественную характеристику распределения нейтрофилов в послеоперационном дефекте костной ткани челюстей, улучшает понимание их биологической роли, открывает перспективы изучения механизмов направленного влияния биогенных аминов на новообразование костной ткани после зубосохраняющих операций.

Итак, получены положительные результаты применения костнопластического материала «Остеоматрикс», что дает основания рекомендовать его для применения при зубосохраняющих операциях.

Список используемых источников:

1. Быков В.Л. Гистология и эмбриология органов полости рта человека. СПб., СОТИС. 2008. 224 с.
2. Гордон Д.С., Любовцева Л.А., Олангин О.И. и др. Иммуноцитохимическая люминесцентно-морфологическая идентификация клеток органов иммунной системы // Российские морфологические ведомости. 1999. № 1-2. С. 55.
3. Гуцан А.Э., Бернадский Ю.И., Годорожа П.Д. Челюстно-лицевые операции. Витебск: Белмедкнига, 1997. 400 с.
4. Гичев Ю.Ю., Гичев Ю.П. Руководство по микронутриентологии. Роль и значение биологически активных добавок к пище. М.: Триада-Х, 2006. 264 с. С. 151.
5. Иорданишвили А.К., Гололобов В.Г., Усиков Д.В. Оценка эффективности применения современных имплантационных материалов // Terra Medical стоматология. 2003. №2. С. 28-32.
6. Лукашин Б.П., Гребенюк А.Н. Глюкозаминогликаны: биологическая роль в системе межклеточных взаимодействий // Успехи современной биологии. 2010. Т.130. №2. С. 165-179.
7. Любовцева Л.А. Люминесцентно-Гистохимическое исследование аминокислотосодержащих структур костного мозга, тимуса и крови при действии нейромедиаторов и антигенов: Автореф. дисс...докт. биол. наук. М. 1994.
8. Мордашова О.Н., Лукьянова Я.С. Роль катехоламинов и биогенных аминов в развитии бронхиальной астмы // Современные наукоемкие технологии. 2005. № 1 С. 71-72.
9. Мулендеев С.В. Биологически активные вещества в структурах десны человека при перимплантатах: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Саранск, 2007.
10. Полетаева А.В., Добродеева Л.К. Соотношение содержания растворимых и мембранных форм кластеров дифференциации лимфоцитов // Вестник Уральской медицинской академической науки. Екатеринбург. 2011. №2-1(35). С. 62-63.
11. Cross S.A., Ewen S.W., Rost E.W. A study of methods available for cytochemical localisation of histamine by fluorescence induced with ophtaldehydepractaldehyde. Histochem J 1971. №3(6). P. 471-476.
12. Falck B., Hillarp N.A., Thieme G., Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J Histochem Cytochem. 1969. №10. P. 348-354.