

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ

УДК 616.716-008

О. С. Барило, Т. М. Канішина, А.В. Білошицька

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФІБРИНУ, ЗБАГАЧЕНОГО ТРОМБОЦИТАМИ (PLATELET RICH FIBRIN, PRF), НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ТКАНИН ПАРОДОНТА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

Вступ

Багато сучасних досліджень присвячені вивченню можливості використання факторів росту і клітинної диференціації. Фактори росту – це поліпептиди, здатні стимулювати клітинну диференціацію, ріст, проліферацію [1]. До факторів росту, які відіграють певну роль у процесі регенерації тканин, можна віднести плазму, збагачену тромбоцитами (Platelet Rich Plasma, PRP), і фібрин, збагачений тромбоцитами (Platelet Rich Fibrin, PRF). Відомо, що саме тромбоцити, крім їхньої основної ролі (участь у гемостазі), є природним джерелом факторів росту. Також наукові дослідження вказують на важливу роль тромбоцитів і фібрину в репаративних процесах. Тромбоцити – це фрагменти крупних клітин кісткового мозку (мегакаріоцитів), вони не мають ядра і в циркулюючій крові виглядають як овальні двояковипуклі диски. При електронній мікроскопії в цитоплазмі тромбоцитів виявлені альфа-гранули (виглядають як зерна у світловий мікроскоп) і система трубочок, зв'язаних із поверхнею клітини. Альфа-гранули за природою є секреторними і містять ферменти, а також поліпептиди, названі факторами росту. При ушкодженні стінки кровоносної судини тромбоцити прилипають до внутрішньої поверхні стінки, кількість тромбоцитів збільшується – цей процес називається агрегацією тромбоцитів, він супроводжується утворенням нерозчинного білка фібрину з його попередника (фібриногену). Унаслідок адгезії тромбоцитів відбувається реакція вивільнення альфа-гранул через систему трубочок, зв'язаних із поверхнею клітини. Речовини, які виділяються з альфа-гранул, сприяють аглютинації нових тромбоцитів, ретракції кров'яного згустку. Тромбоцити в згустку дегенерують, у згусток проникають фібробласти і капіляри, сам згусток заміщується сполучною тканиною. Це називається організацією тромбу. Механізм утворення й організації тромбу важливий для розуміння регенерації тканин пародонта.

Дослідниками розроблені протоколи отримання

фібрину, збагаченого тромбоцитами, шляхом центрифугування венозної крові пацієнта. Це дає можливість доставки тромбоцитів і фібрину до місця ушкодження. Такі клітинні технології вже широко використовуються в різних галузях медицини: в хірургії для лікування хронічних виразок, у гінекології для стимулювання загоювання ерозій слизової, в урології для відновлення слизової при циститах. Але експериментальні дослідження щодо використання PRF для стимуляції регенерації тканин на рівні доказової медицини відсутні [2].

Мета дослідження - в експерименті на щурах дослідити вплив фібрину, збагаченого тромбоцитами (Platelet Rich Fibrin, PRF), на регенерацію тканин пародонта.

Матеріали і методи дослідження

Експериментальне дослідження виконували на базі віварію Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. Досліди проводили з дотриманням основних положень Хельсинської декларації про гуманне ставлення до тварин (1964-2000 рр.), після отримання дозволу комітету з біоетики згідно з «Положенням про використання тварин в біомедичних дослідках». Проведена серія дослідів на 14 щурах обох статей віком 12-24 місяців і вагою 170- 210 г. Тварини були поділені на 2 групи: 1 група – контрольна (5 тварин) і 2 група – дослідна (9 тварин). Для моделювання рани пародонта тваринам під загальним знеболюванням видаляли лівий нижній різець за допомогою щипців, зігнутих по ребру малого розміру. Щічками щипців охоплювали шийку зуба, просували їх максимально вниз, фіксували зуб і вивихували його вестибулярно. При цьому різець зазвичай ламався на рівні згину кореня зуба. Великим кулястим бором рану трохи поглиблювали, згладжували гострі краї лунки. Таким способом отримували рану слизової оболонки, періодонта, цементу, альвеолярної кістки і тканин зуба. У тварин контрольної групи рана загоювалася самостійно. Для отримання фібринового згустку з латеральної хвостової вени

тварини забирали 1 мл крові, для цього щура поміщали в камеру Когана, хвіст тварини нагрівали в посудині з теплою водою (40°C -45°C), після дезінфекції проводили венепункцію за допомогою голки-метелика, з'єднаної катетером із вакуумною пробіркою (рис. 1А). Отриману кров центрифугували 12 хвилин зі швидкістю 3000 обертів за хвилину. Кров у пробірці розподіляли на три шари: верхній – плазма з дефіцитом тромбоцитів, серед-

ній – фібриновий згусток, збагачений тромбоцитами, нижній шар – згусток червоних кров'яних тілець. Фібриновий згусток виймали з пробірки пінцетом, скальпелем відрізуали червоні кров'яні тільця і переміщали в рану (рис. 1Б). Тваринам дослідної групи в рану поміщали фібриновий згусток, отриманий у цієї ж тварини, фіксували п-подібним швом із поліамідної нитки.

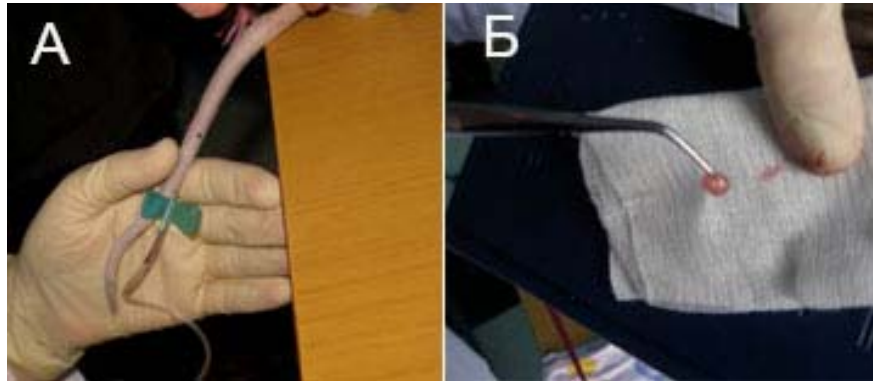


Рис. 1. А - забір крові з латеральної хвостової вени щура;
Б - транспортування фібрину, збагаченого тромбоцитами (PRF), у рану

Результат експерименту оцінювали на 3, 7 і 14 доби. Щурів виводили з експерименту шляхом дислокації шийних хребців під загальним знеболюванням. Видаляли фрагмент нижньої щелепи. Для оцінки морфологічних змін готували декальциновані блоки, які містили зуб, періодонт, прилеглу альвеолярну кістку; робили зрізи в мезіодистальному напрямку. З метою декальцинації матеріал обробляли в розчині, до складу якого входили хлоралгідрат, 960 етиловий спирт, концентрована азотна кислота і дистильована вода. Виготовляли зрізи препарату фібринового згустку і фарбували на фібрин: оранжевий–червоний–голубий за Зербіно Д.Д., Лукасевич Л.Л. (модифікований метод Martius-Scarlet-Blue) [3].

Зрізи гістологічних препаратів виконували в мезіодистальному напрямку (5-7 мкм), фарбували гематоксилін-еозином і пікрофуцином за Ван Гізоном.

Мікроскопію і фотографування гістологічних препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа «OlympusBX41» при збільшенні в 40, 100, 200, 400 і 1000 разів.

Результати дослідження та їх обговорення

На початку дослідження ми провели гістологічну оцінку фібринового згустку (Platelet Rich Fibrin, PRF). При мікроскопії зрізів фібринових згустків виявлені клітини без ядра – тромбоцити (їх ще називають кров'яними пластинками), розміщені між нитками білка фібрину (рис. 2А). При фарбуванні препаратів за Зербіно Д.Д., Лукасевич Л.Л. нитки фібрину виявляються на різних стадіях дозрівання (колір змінюється від оранжевого до голубого), що відповідає стадіям ретракції кров'яного згустку (рис. 2Б).

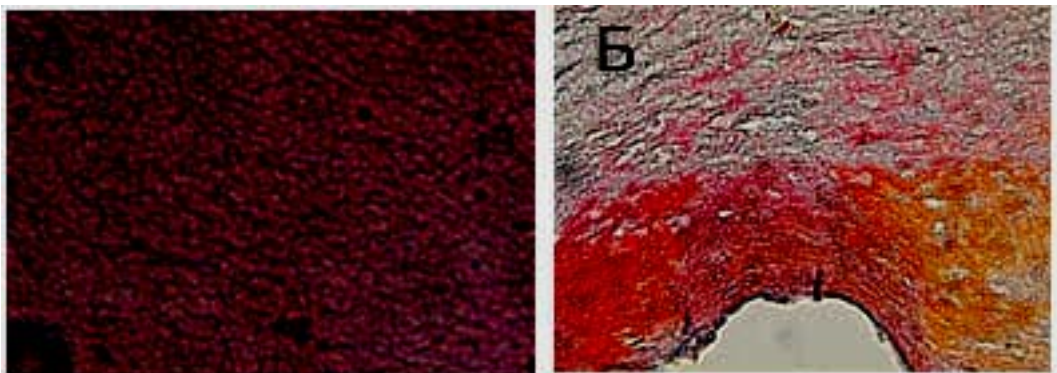


Рис. 2. А - фібриновий згусток: нитки фібрину, 1-тромбоцити; забарвлення – гематоксилін-еозин, зб. – x400;
Б - фібриновий згусток на різних стадіях дозрівання (колір змінюється від жовтого до червоного та голубого).
Метод фарбування на фібрин – оранжевий-червоний-голубий за Зербіно Д.Д., Лукасевич Л.Л.
(модифікований метод Martius-Scarlet-Blue). Зб. – x400

Охарактеризуємо результати мікроскопічного дослідження препаратів тканин пародонта щурів. На 3-й день лікування навколо PRF у краях рани була помітно виражена лейкоцитарна інфи-

льтрація (рис. 3А), тоді як лейкоцитарна інфільтрація в рані контрольної групи щурів була менше вираженою (рис. 3Б).

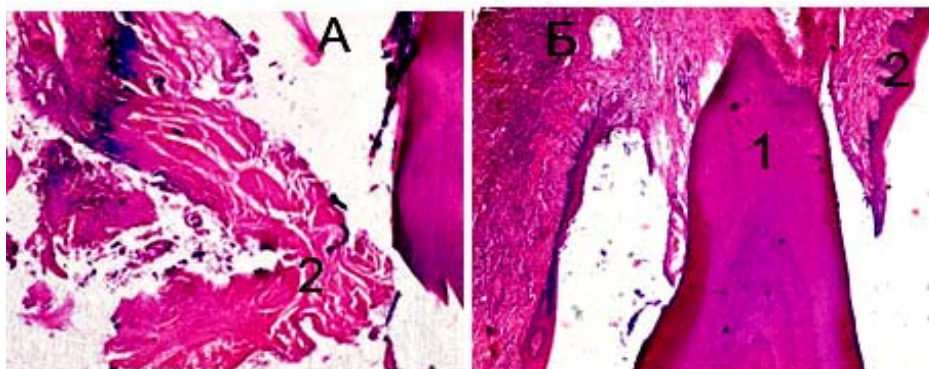


Рис.3. А - зуб, лейкоцитарна інфільтрація по краях рани (1), фібриновий згусток (2), забарвлення гематоксилін-еозином, зб. х 100; Б - зуб (1), багат шаровий плесканий епітелій (2), забарвлення гематоксилін-еозином, зб. х 100

На 7-й день від початку експерименту в препаратах дослідних щурів нами виявлені макрофаги (рис. 4А). Їхні розміри були різними (від маленьких клітин до великих неправильної форми). Поряд із макрофагами в препаратах, забавлених за Ван Гізоном, з'явилися волокна колагену (рис. 4Б).

У контрольній групі макрофаги по краях рани були поодинокими, клітинна інфільтрація не виражена (рис. 4В).

У контрольній групі макрофаги по краях рани були поодинокими, клітинна інфільтрація не виражена (рис. 4В).

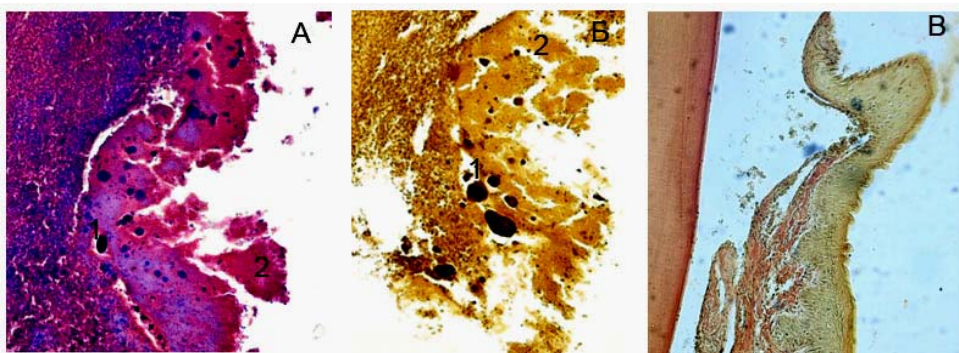


Рис.4. А - макрофаги (1), фібриновий згусток (2), забарвлення гематоксилін-еозином, зб.х 200; Б - макрофаги з детритом згустку (1), фібриновий згусток (2), забарвлення за Ван Гізоном, зб.х 200; В - край рани контрольної тварини, забарвлення за Ван Гізоном, зб.х 200

Висновок

Отримані нами результати дослідження відповідають даним літератури про етапність зміни клітин-учасників запального процесу: спочатку у вогнищі запалення з'являються нейтрофільні гранулоцити (їх ще називають мікрофагами), потім до них приєднуються макрофаги і, нарешті, фібробласти [4]. Основна функція макрофагів – поглинання та резорбція чужорідних структур. Разом із тим макрофаги переводять запальну реакцію на фібробластичну стадію, активуючи проліферацію фібробластів, які синтезують позаклітинний матрикс, зокрема колаген [5].

Отже, гістологічні дослідження свідчать про те, що використання PRF у лікуванні ран пародонта сприяє швидкому пригніченню гнійного запалення, що прискорює процеси репаративної регенерації.

Література

1. Джіано Риччі. Диагностика и лечение заболеваний пародонта / Джіано Риччі, Марио Аймет-

ти. – М.: Издательский дом «Азбука», 2015. – С.539-551.

2. Walid Ahmed Abdullah. Evaluation of bone regenerative capacity in rats claverial bone defect using platelet rich fibrin with and without beta tri calcium phosphate bone graft material / SaudiDent J.-2016, Jul.-Vol. 28(3).- P. 109–117.
3. Методики морфологічних досліджень : монографія / [Багрій М.М., Діброва В.А., Попадинець О.Г., Гришук М.І.] ; за ред. М.М.Багрія, В.А.Діброви.- Вінниця : Нова Книга, 2016.-157 с.
4. Хем А. Гистология / Хем А., Кормак Д.; пер. с англ.- М.: Мир, 1983. - Т.2. – С.117-125.
5. Радьога Я.В. Поєднання клітинних технологій та мінінвазивної хірургії в лікуванні хронічної виразки шлунку (експериментально-клінічне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.03 «Хірургія» / Радьога Ярослав Володимирович.- Вінниця, 2015. – С. 27-32, 58-61.

Стаття надійшла
04.05.2017 р.

Резюме

Останнім часом у стоматології та інших галузях медицини широко використовується фібрин, збагачений тромбоцитами (Platelet Rich Fibrin, PRF).

Відомо, що тромбоцитарні фактори росту здатні позитивно впливати на репаративний процес. Та серед лікарів триває дискусія про ефективність використання PRF у лікуванні. У статті наведені результати експериментального дослідження про вплив PRF на регенерацію тканин пародонта.

Ключові слова: тромбоцит, фактори росту, регенерація, експеримент.

Резюме

В последнее время в стоматологии и других отраслях медицины широко используется фибрин, обогащенный тромбоцитами (Platelet Rich Fibrin, PRF). Известно, что тромбоцитарные факторы роста положительно влияют на репаративный процесс. Среди врачей вопрос об эффективности PRF в лечении остается дискуссионным. В статье представлены результаты экспериментального исследования влияния PRF на регенерацию тканей пародонта.

Ключевые слова: тромбоцит, факторы роста, регенерация, эксперимент.

UDC616.716-008

RESEARCH OF EFFECT OF PLATELET RICH FIBRIN, PRF ON PARADONTOSIS TISSUES REGENERATION DURING THE EXPERIMENT

O. S. Barylo, T. M. Kanishyna, A.V. Biloshytska

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya

Summary

The usage of Platelet Rich Fibrin, PRF means the possibility to apply growth factors in medicine.

Growth factors are polypeptides which can stimulate cytodifferentiation, growth, proliferation, and participate in the process of tissue regeneration. Thrombocytes are the natural sources of growth factors. Platelet Rich Plasma PRP, Platelet Rich Fibrin, PRF is used in different branches of medicine. However, there isn't sufficient number of experimental studies related to the usage of PRF to stimulate regeneration of tissue.

Purpose

To examine the effect of Platelet Rich Fibrin, PRF on the regeneration of paradontal tissues in the experiments with rats.

Materials and research methods

The set of experiments with 14 rats of both sexes at the age of 12 to 24 months, weigh 170 to 210 g. The animals have been divided into the control group with 5 rats and the experimental group with 9 rats.

In the control group the imitated wound of paradontosis has healed on itself, in the experimental group PRF was used. PRF was received by extraction of venous blood of those animals. Blood sampling was conducted on the venous caudal vein. Blood in vitro was distributed into three segments: the upper segment was plasma with insufficient number of platelets, the middle one was rich with platelets fibrin cake, the lower one was cake of red blood cells. The fibrin was removed from the tube with forceps; red blood cells were cut by a scalpel and placed into the wound.

The result of the experiment was evaluated on the 3rd, 7th, 14th days. The morphological research was conducted for PRF efficiency rate. Histological preparations made of PRF and fragments of the lower jawbone, were examined under microscope and photos of them were made.

Results

The analysis done under microscope of rat's paradontosis tissues has revealed that there is difference between the control and experimental groups. On the 3rd day of treatment around the place of PRF there could be seen the leukocytic infiltration on the wound edges while the leukocytic infiltration of the wound in the control group was less significant. On the 7th day of the experiment the macrophages in the preparations of the rats has appeared, size differed (from small to big cells of irregular form). In addition, in the preparations coloured according to Van-Gizon there appeared collagen tissues. In the control group the macrophages in the wound edges were single, cellular infiltration was not significant. The number of macrophages in the preparations of experimental group of animals was significantly more than in the control group.

Conclusion

Gradual change of cells-participants is typical for inflammatory process: at first, neutrophilic granulocytes appear in the inflammatory tissue (which also called microphages), then macrophages appear and in the end fibroblasts arise. The main function of macrophages is absorption and resorption of foreign structures. In addition, macrophages transport the inflammatory reaction into fibroblastic stage activating fibroblast proliferation, which generate local matrix, in particular, collagen. Therefore, histological examinations give evidence that the usage of PRF during the course of paradontal treatment leads to fast inhibition of purulent inflammation that promotes the reparative regeneration process.

The experiment has been carried out with the small number of animals. Therefore, it was not possible to obtain reliable results. For the further study of this issue the increased number of animals should be engaged into the research.

Key words: thrombocyte, growth factors, regeneration, experiment.