

Експериментально-гістологічне дослідження репаративного остеогенезу при артеріосклерозі у щурів

Experimental and Histological Study of Reparative Osteogenesis in Arteriosclerosis in Rats

Куц П.В., д.мед.н., проф.
Національний медичний
університет ім. О.О. Богомольця
Kuts P.V.
O.O. Bogomolets National Medical
University

Адреса для кореспонденції:
Куц Павло Валерійович
e-mail: kutsppv@gmail.com

Мета: Вивчити особливості розвитку клітинних і тканинних реакцій слизової оболонки ясен та кісткової тканини на тлі порушень місцевої гемодинаміки в умовах хронічного стресу та артеріосклерозу, особливості приживлення внутрішньокісткових імплантатів в умовах експериментальної патології у щурів. **Методи:** Експериментальні морфологічні дослідження проводили на 36 лабораторних білих щурах, яких за стандартизованими показниками здоров'я поділили на 2 групи: здорові тварини (n=18) увійшли до 1 групи; тварини з класичною експериментальною моделлю артеріосклерозу Менкеберга (n=18) – до 2 групи. Виконали морфологічні дослідження стану аорти, м'язів, паренхіматозних органів, слизової оболонки ясен та щік, а також кісткової тканини після операцій на стегнових кістках із вживленими титановими імплантатами. **Результати:** Морфологічні дослідження показали, що використана модель патології серцево-судинної системи призводить до розвитку патології органів і тканин-мішеней, зумовлюючи виникнення остеопорузу кісткової тканини піддослідних щурів. За гістологічними дослідженнями виявили, що встановлення імплантатів здоровим тваринам сприяло формуванню кісткової капсули з невеликим обсягом сполучної тканини, що межувала з кістковою капсулою та поверхнею імплантату. Це сприяло щільному з'єднанню, а отже, – повноцінній остеоінтеграції. На моделі артеріосклерозу Менкеберга внаслідок змодельованого порушення гемомікроциркуляції спостерігали як зміни формування кісткової тканини у терміни 30–60 діб, так і пізніше утворення кісткової капсули навколо імплантату упродовж 90 діб. Сформована капсула упродовж 90 діб була потоншеною та локалізувалася на зовнішній поверхні кістки. **Висновки:** Виявлені особливості перебігу репаративної регенерації у білих щурів з моделюванням серцево-судинної патології підтверджують її вплив на стан кісткової тканини, що зумовлює розвиток остеопорузу, внаслідок чого змінюється клітинна реакція та уповільнюється остеоінтеграція імплантатів.

Ключові слова: експериментальні тварини, артеріосклероз, морфологія ясен, експериментальне моделювання.

Purpose: To study the peculiarities of cell and tissue reactions of gingival mucosa and bone tissue on the background of local hemodynamics disorders in conditions of chronic stress and arteriosclerosis, peculiarities of intraosseous implants engraftment under experimental pathology in rats. **Methods:** Experimental morphological studies were performed on 36 laboratory white rats, standardized by health indicators that were

divided into 2 groups: 1 – healthy animals (n=18); 2 – animals with reproduced classical experimental model of Monckeberg's arteriosclerosis (n=18). Morphological studies of aorta, muscles, parenchymal organs, mucous membrane of cheeks and gums as well as bone tissue after operation of titanium implants placement on the femur were carried out. **Results:** Conducted morphological studies have shown that the used model of cardiovascular system pathology is adequate to the aim pursued, leads to development of pathology in organs and target tissues, which in its turn launches a model of osteoporosis of bone tissue in experimental rats. Conducted histological studies have revealed that the use of implants in healthy animals led to the formation of bone capsule with a small amount of connective tissue, which bordered with the bone capsule and implant surface, which contributed to a tight connection, i.e. complete osseointegration. On the background of Monckeberg's arteriosclerosis model reproduction due to simulated violation of hemomicrocirculation changes of bone tissue formation during period of 30–60 days as well as late (90 days) formation of bone capsule around the implant were found. Formed capsule was thinner and was located on the outer surface of the bone. **Conclusions:** Revealed peculiarities of reparative regeneration in white rats under conditions of cardiovascular pathology simulation indicate its impact on the state of bone tissue, which causes the development of signs of osteoporosis, which in its turn leads to changes in cellular reactions and delay of implants osseointegration.

Key words: experimental animals, arteriosclerosis, gingival morphology, experimental simulation.

Вступ

Необхідність проведення експериментального дослідження у клінічній стоматології зумовлена потребою конкретизації особливостей остеоінтеграції дентальних імплантатів у пацієнтів із соматичною патологією, зокрема захворюваннями серцево-судинної системи [3, 4, 7]. Підтвердженням поширеності цих захворювань є дані епідеміологічних звітів щодо загальної захворюваності та причин смертності. Кількість патологій зростає, відтак зростає й чисельність пацієнтів із загальними захворюваннями, які потребують стоматологічного лікування, зокрема імплантації внаслідок адентії. Водночас відомі ускладнення перебігу постімплантаційного періоду, що потребує додаткових поглиблених досліджень для обґрунтування показань та протипоказань до застосування імплантаційного лікування при відсутності

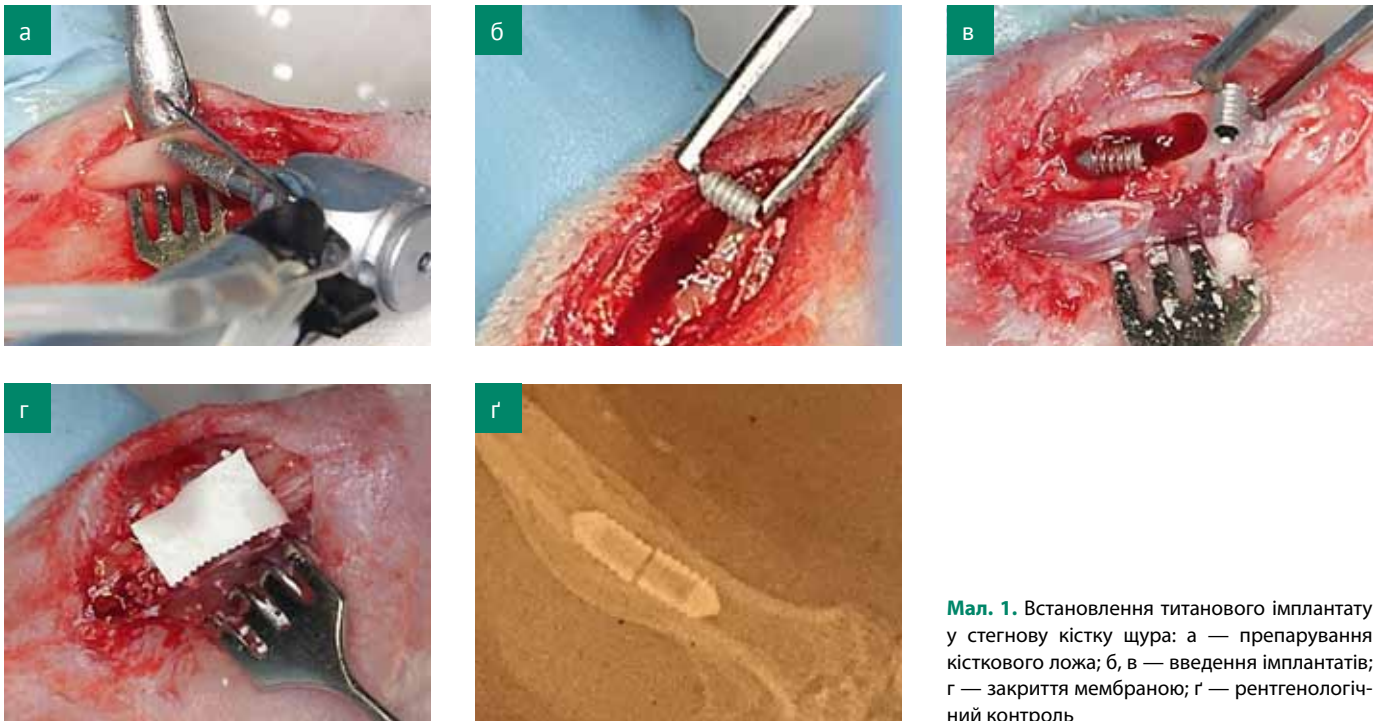
зубів. Мета роботи – вивчити специфіку розвитку клітинних і тканинних реакцій слизової оболонки ясен та кісткової тканини на тлі порушень місцевої гемодинаміки в умовах хронічного стресу та артеріосклерозу, особливості остеоінтеграції внутрішньокісткових імплантатів із застосуванням експериментальної патології щурів.

Матеріал і методи

Експериментальні морфологічні дослідження проводили на 36 лабораторних білих самцях і самках щурів масою 150–200 г. Тварин утримували у віварії. До експерименту провели стандартизацію за показниками здоров'я. У роботі дотримувались вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) та «Науково-практичних рекомендацій з

утримання лабораторних тварин та роботи з ними» (Київ, 2002 р.) [6].

Піддослідних щурів розподілили на 2 групи: до 1 групи увійшли здорові тварини, до 2 групи – тварини з класичною експериментальною моделлю артеріосклерозу Менкеберга (J.G. Mönckeberg, 1903 р.), яку відтворювали внутрішньовенним введенням 0,18% розчину адреналіну гідротартрату із дозуванням 50 мкг/кг маси тіла упродовж 14 діб [1, 2]. В обох групах провели морфологічні дослідження стану аорти, м'язів, паренхіматозних органів (печінки, селезінки, нирок, легень, підшлункової залози), слизової оболонки ясен та щік, а також кісткової тканини після операцій на стегнових кістках із вживленими титановими імплантатами. У кожній групі виокремили підгрупи А та Б (табл. 1). Тваринам підгруп А хірургічного втручання не виконували; тваринам підгруп Б встановлювали титанові імплантати.



Мал. 1. Встановлення титанового імплантату у стегнову кістку щура: а — препарування кісткового ложа; б, в — введення імплантатів; г — закриття мембраною; г' — рентгенологічний контроль

Підставою для використання моделі артеріосклерозу був хронічний стрес як один зі значних факторів ризику розвитку пародонтиту [1, 5, 8]. При введенні адреналіну у щурів спостерігали генералізовані порушення гемодинаміки з різким спазмуванням судин та подальшим розширенням, виникненням стазів, крововиливами у паренхіматозні органи, відкриттям капілярів та неоангіогенезом. Це підтвердило недостатність оксигенації тканин та розвиток гіпоксії, що призвело до виникнення прогресивних дистрофічних процесів. Дистрофічні зміни також відбувалися у тканинах ясен, щік та кістковій тканині щурів. Дистрофічні зміни у кістковій тканині мають значення з огляду на дослідження ймовірного встановлення внутрішньокісткових імплантатів пацієнтам з остеопорозом.

Ефективність експериментальної моделі оцінювали за станом легенів та стінки аорти, які є органами-мішенями при використанні розчинів адреналіну. У піддослідних тварин, яким ін'єкційно вводили розчин адреналі-

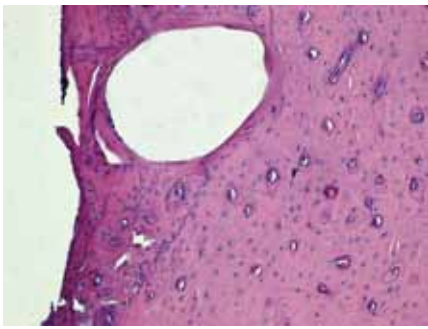
ну гідротартрату упродовж 14 днів, спостерігали виражені множинні осередки крововиливів у легенях, проникнення рідини у просвіти альвеол, вогнищеву макрофагальну та інтерстиційну реакцію, нерівномірне кровонаповнення і стази у капілярах міжальвеолярних перетинок. У стінці аорти відзначили суттєве порушення структури еластичного каркасу — зменшення кількості і щільності еластичних мембран, нерівномірне потоншення та розширення стінки аорти, повнокрів'я і новоутворення судин. За даними експерименту, досягли стандартних морфологічних змін для цього типу стресового впливу.

З метою вивчення структурних закономірностей остеоінтеграції внутрішньокісткових імплантатів у щурів контрольної групи та при артеріосклерозі (після відтворення моделі і підтвердження характерних змін), виконували операції зі встановлення імплантатів.

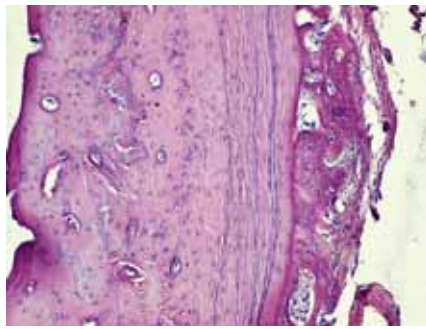
Хірургічні втручання на стегнових кістках білих щурів проводили у стерильних умовах після обробки операційного поля під загальною анестезією, яку виконували внутрішньочеревним введенням розчинів оксибутирату та тіопенталу натрію. Шкіру, підшкірно-жирову клітковину, м'яз та окістя задньої поверхні стег-

Таблиця 1. Терміни спостережень і розподіл лабораторних тварин на групи

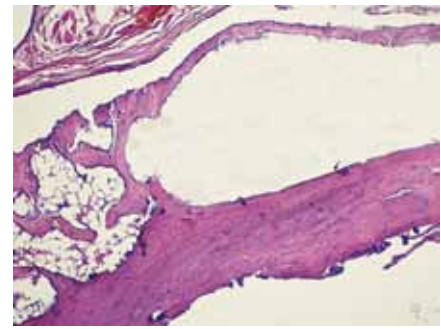
Терміни спостережень, діб	Здорові тварини, 1 група, n=18		Тварини з моделлю артеріосклерозу, 2 група, n=18	
	А	Б	А	Б
0	1	1	1	1
7	2	2	2	2
30	2	2	2	2
60	2	2	2	2
90	2	2	2	2



Мал. 2. Стегнова кістка щура через 90 діб після імплантації, 1 група: зріла кісткова капсула, сформована навколо титанового імплантату; забарвлення гематоксилін-еозином; збільшення $\times 100$



Мал. 3. Стегнова кістка щура, 2 група: ознаки остеопору за моделювання артеріосклерозу Менкеберга; зміни у тканинах окістя з утворенням хрящової тканини; забарвлення гематоксилін-еозином; збільшення $\times 100$



Мал. 4. Стегнова кістка щура через 90 діб після імплантації, група 2: формування тонкої кісткової капсули навколо титанового імплантату; на зовнішній поверхні кістки утворилися трабекули; забарвлення гематоксилін-еозином; збільшення $\times 50$

на розсікали, оголюючи кістку. За допомогою фізодиспенсера кулястим бором виконували поздовжнє надпилювання стегнової кістки довжиною 3,5 мм глибиною 0,5 мм. У сформоване кісткове ложе встановлювали стерильний титановий імплантат (підгрупа Б). М'язову та шкірну тканину пошарово ушивали атравматичною поліамідною ниткою. Після операції розташування імплантатів контролювали за допомогою рентгенограм (мал. 1). Лабораторних тварин виводили з експерименту передозуванням 10% розчину тіопенталу натрію. Дослідження кісткової тканини проводили у терміни 7, 30, 60 і 90 діб після операції.

Після завершення експериментів усунені фрагменти тканин аорти, м'язів, паренхіматозних органів, слизової оболонки щік, ясен та кісток фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. М'які тканини обробляли за загальноприйнятою схемою. Для виготовлення препаратів із кісткової тканини матеріал після фіксації у 10% розчині нейтрального формаліну декальцинували упродовж 2 діб. Для цього його утримували в 1% розчині мурашиної кислоти 6 діб, який змінювали щодні дві доби. Після промивання у проточній воді декальцинований кістковий матеріал ущільнювали у парафін. На ротаційному мікротомі Leica

RM-2025 виготовляли серійні зрізи товщиною 8 мкм. Для загальних досліджень усі отримані парафінові зрізи товщиною 5–8 мкм забарвлювали гематоксилін-еозином та азур II-еозином, для вивчення стану колагенових волокон – пікрофуксином за методом Ван Гізона, для оцінки проявів дистрофічних процесів виявлення глікогену проводили за допомогою ШИК-реакції за Мак-Манусом з контролем амілазою. Особливого значення надавали стану епітелію, сполучної тканини, кровоносних мікросудин, їхньому кровонаповненню та кількості. Дослідження проводили з використанням мікроскопів Jenaval (Німеччина) та Olympus BX-41 (Японія) зі збільшенням ок. $\times 10$ і об. $\times 4$, $\times 20$, $\times 40$. Для вивчення структурних закономірностей остеоінтеграції внутрішньокісткових імплантатів перед фіксацією матеріалу за загальноприйнятою методикою гістологічної проводки металеві дентальні імплантати виймали з ложа для забезпечення технічної можливості виготовлення гістологічних зрізів. Тому на гістологічних препаратах замість імплантатів спостерігали порожнину, яку оточувала новосформована кісткова капсула, особливості її мікроскопічної будови підтверджували ймовірний вплив соматичної патології на стан остеоінтеграції.

Результати та їх обговорення

Дослідження репаративної регенерації кісткової тканини при внутрішньокістковій імплантації у здорових щурів (1 група)

На 7 добу після операції навколо титанового імплантату спостерігали ознаки формування сполучнотканинної капсули. Капсулу утворювали тангенціально розташовані 5–10 рядів фібробластів і тонкі колагенові волокна. У ділянці імплантації навколишня кісткова тканина на цьому етапі експерименту не відновлювалась, остеомаатрикс був пухкий з чіткими контурами волокнистого компонента. Крім того, виявили дрібні вільні фрагменти кісткової тканини (стружка, що залишилась в операційній рані). Ознаки запалення були слабо виражені. Через 30 діб після операції титановий імплантат оточувала тонка капсула неправильної форми, утворена кістковою тканиною. Очевидно пухка тканина, що розташовувалась між кістковою капсулою та поверхнею імплантату зазнала ушкоджень при його видаленні. Навколо капсули імплантату у кістковій тканині виявили мінералізовані острівці хрящової тканини, оточені тонким прошарком кісткової тканини. Між утвореними кістковими трабекулами

локалізувалися тонкі прошарки пухкої сполучної тканини. Ознак запалення у ділянці імплантації не спостерігали. Через 60 діб над збереженою при операційному втручанні кістковою тканиною спостерігали формування чітких ліній цементації, що відмежовували кісткову капсулу, сформовану навколо імплантату. У кістковій тканині, що утворювала капсулу та оточувала імплантат, простежували невеликі базофільні ділянки менш зрілої кісткової тканини. Через 90 діб навколо титанового імплантату сформувалася капсула зі зрілої кісткової тканини. Внутрішня поверхня капсули концентричними шарами повторювала контури імплантату. Капсула відмежовувалася лінією цементації від глибше локалізованої кісткової тканини. Лінія цементації, що утворилася за 90 діб була тонкою, у деяких ділянках малопомітною, на відміну від утвореної упродовж 60 діб (мал. 2).

Відповідно до гістологічних досліджень, встановлення імплантатів у здорових тварин зумовлювало формування кісткової капсули з невеликим обсягом сполучної тканини, яка межувала з кістковою капсулою та поверхнею імплантату, що сприяло щільному з'єднанню, тобто повноцінній остеоінтеграції.

Особливості репаративної регенерації кісткової тканини при імплантації у тварин з моделлю артеріосклерозу Менкеберга (2 група)

Після створення моделі артеріосклерозу Менкеберга у білих щурів простежували зміни кісткової тканини, які проявлялися помірними ознаками остеопорозу та утворенням острівців хрящової тканини на зовнішній поверхні кістки, що, очевидно, було зумовлене порушенням гемомікроциркуляції у судинах окістя (мал. 3).

Через 7 діб після операції навколо імплантатів починала формуватися менш упорядкована, ніж у тварин 1 групи, сполучнотканинна капсула. Між імплантатом та внутрішньою поверхнею капсули утворився гомогенний еозинофільний прошарок. У кістковій тканині навколо ділянки імплантації простежували ознаки резорбції. Через 30 діб у більшості білих щурів 2 групи, на відміну від здорових тварин, формування замкненої кісткової капсули не відзначали. Імплантат був оточений досить товстою сполучнотканинною капсулою. У кістковій тканині зберігались ознаки остеопорозу, що підтверджувало наявність пікринофілії остеомаатриксу. Через 60 діб навколо імплантатів відзначали формування капсули зі сполучної тканини та тонкого прошарку кісткової тканини. Капсула не заглиблювалася у кісткову тканину, а локалізувалася на зовнішній поверхні кістки. У деяких випадках простежували формування незамкненої хрящової капсули, навколо зовнішньої поверхні імплантату – щільну сполучну тканину. Через 90 діб у більшості тварин навколо імплантату сформувалася тонка кісткова капсула. На поверхні навколишньої кісткової тканини утворювались кісткові трабекули, між якими спостерігали пухку сполучну тканину (мал. 4). Підтвердженням процесу дозрівання кісткової тканини був недосконалий остеогенез.

У білих щурів на тлі моделі артеріосклерозу Менкеберга внаслідок змодельованого порушення гемомікроциркуляції простежували як зміни формування кісткової тканини у терміни 30–60 діб, так і пізніше утворення кісткової капсули навколо імплантату упродовж 90 діб. Сформована капсула була тоншою і локалізувалася на зовнішній поверхні кістки.

Висновки

Проаналізувавши результати експериментально-морфологічних досліджень щодо закономірностей репаративного остеогенезу та остеоінтеграції імплантатів встановили низку особливостей розвитку тканинних реакцій, пов'язаних із виникненням у білих щурів загальносоматичних захворювань серцево-судинної системи. У здорових тварин до 7-ї доби після імплантації розпочиналося формування сполучнотканинної капсули з подальшим розвитком (до 30 діб) тонкої кісткової капсули з внутрішнім шаром пухкої сполучної тканини; до 60 діб кісткова капсула навколо імплантату дозрівала зі збереженням дрібних острівців незрілого базофільного остеомаатриксу, а через 90 діб формувалася зріла кісткова капсула, внутрішню поверхню якої заповнювали концентрично розташовані волокна та зрілий остеомаатрикс.

Під час дослідження внутрішньокісткової імплантації з моделюванням артеріосклерозу Менкеберга встановили особливості перебігу репаративного остеогенезу як на ранніх, так і на пізніх етапах експерименту: на 7-му добу сполучнотканинна капсула була нерівномірної товщини з менш упорядкованими пучками колагенових волокон і фібробластів; до 30 доби спостереження формування кісткової тканини уповільнилось, а зовнішня поверхня капсули імплантату була представлена прошарком щільної сполучної тканини. На 60 добу експерименту кісткова тканина навколо імплантату залишалася потоншеною, порівняно з піддослідними тваринами 1 групи, у деяких випадках спостерігали формування хрящової тканини; на 90 добу навколо імплантату простежували менш зрілу кісткову тканину з нечіт-

ким внутрішнім контуром, представленим сполучною тканиною. На всіх етапах експерименту у кістковій тканині виявляли ознаки помірно вираженого остеопорозу, що відображає порушення гемомікроциркуляції та трофіки у зв'язку розвитком артеріо-

склерозу Менкеберга. Виявлені особливості перебігу репаративної регенерації у білих щурів при моделюванні серцево-судинної патології підтверджують її вплив на стан кісткової тканини з ознаками остеопорозу, що призводить до зміни клітин-

них реакцій та затримки остеоінтеграції імплантатів. Тому для покращання процесів остеоінтеграції у післяімплантаційному протоколі пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями доцільно проводити остеотропну терапію.

Список використаної літератури

1. Атаман О.В. Артеріосклероз Менкеберга / О.В. Атаман. — Суми: СумДУ, 2010.
2. Биць Ю.В. Сучасні уявлення про патогенез артеріосклерозу менкебергівського типу / Ю.В. Биць, О.В. Голдобіна, В.Є. Досенко, М.О. Дудко, Н.А. Ларіонова / Фізіологічний журнал. — 2000. — Т. 46, №2. — С. 64–72.
3. Виноградов А.В. Анализ эффективности алгоритмизированных профилактических мероприятий, проводимых пациентам с соматической патологией перед дентальной имплантацией: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / А.В. Виноградов. — М., 2009. — 110 с.
4. Гунько М.В. Особенности диагностики и комплексной терапии при использовании метода дентальной имплантации у больных с системным остеопорозом: автореф. дис. ... на соиск. науч. степени канд. мед. наук: спец. 14.00.21 «Стоматология» / М.В. Гунько. — М., 2009. — 25 с.
5. Зайчик А.Ш. Патохимия (эндокринно-метаболические нарушения): учебник для студентов медицинских вузов, 3-е изд. // А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. — СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2007. — 768 с.
6. Кожем'якін Ю.М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, Г.А. Сайфетдінова. — Київ: Авіцена, 2002. — 156 с.
7. Кузнецов С.В. Дентальная имплантация у пациентов с соматической патологией: автореф. дис. ... на соиск. науч. степени канд. мед. наук: спец. 14.00.21 «Стоматология» / С.В. Кузнецов. — М., 2009. — 24 с.
8. Саркисов Д.С. Приспособительные и компенсаторные процессы. В кн.: Общая патология человека, 2-е изд. / Под ред. А.И. Струкова, В.В. Серова, Д.С. Саркисова. — Т. 2. — М.: Медицина, 1997. — С. 199–322.

Стаття надійшла в редакцію 28 квітня 2015 року