

## ВОЗМОЖНОСТЬ УСКОРЕНИЯ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В КОСТНЫХ ТКАНЯХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПРИМЕНЕНИЯ ФИБРИНА

**Майбородин И.В., Колесников И.С., Козодий Д.М., Выборнов М.С.,  
Шевела А.И., Шевела А.А., Шеплев Б.В., Дровосеков М.Н.,  
Колмакова И.А., Тодер М.С.**

*Центр новых медицинских технологий Института химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,  
e-mail: imai@mail.ru*

Морфологическими и радиовизиографическими методами изучали процессы регенерации поврежденного участка кости нижней челюсти крыс после применения обогащенного тромбоцитами фибринового сгустка. При естественном ходе регенерации искусственно созданное отверстие кости сразу заполняется кровью и там формируется кровяной сгусток. Через 1 неделю в дефекте кости присутствуют отдельные островки молодой костной ткани, спустя 2–3 недели отверстие в кости нижней челюсти полностью замещено молодой костной тканью. После операции с последующим заполнением дефекта кости нижней челюсти фибриновым сгустком не происходит образования кровяного сгустка. Уже спустя 1 неделю весь дефект костной ткани заполнен слившимися островками вновь сформированной кости. Ко второй неделе после использования фибрина отмечено дальнейшее замещение дефекта костной тканью и формирование костной мозоли.

**Ключевые слова:** фибриновый сгусток, поврежденная кость, регенерация

**Введение.** Повреждение тканей приводит к разрыву кровеносных сосудов, что, в свою очередь, является первой ступенью активации тромбоцитов после контакта с коллагеном. Тромбоциты инициируют образование тромба через активацию коагуляционной системы, после образования тромбина фибриноген трансформируется в фибрин и это – первый шаг заживления раны. Препараты фибрина воспроизводят данный процесс и облегчают процессы репарации [10].

Первоначально фибрин и его препараты в стоматологии применяли для ускорения гемостаза после экстракции зубов, особенно при дефектах системы свертывания крови, и для закрытия дефектов костных тканей челюстно-лицевой области [9].

Затем фибриновые клеи стали использовать для прикрепления тканей во время различных видов пластики, вместо шовного материала и для улучшения приживления

имплантатов из искусственных и синтетических материалов [4].

Обогащенная тромбоцитами плазма или фибриновый сгусток (БТФС) – это модификация фибринового клея, приготовленная из аутологичной крови и содержащая множество цитокинов. Эти релизы вызывают миграцию и деление всех мезенхимальных (включая хондроциты и мезенхимальные стволовые клетки) и эпителиальных клеток, стимулируют синтез коллагена и матрикса соединительной ткани [8].

Продукты деградации фибрина вызывают миграцию остеогенных клеток и гингивальных фибробластов *in vitro* и более быструю регенерацию хирургических костных дефектов *in vivo* в эксперименте. Фибриновые клеи и пленки могут служить своеобразным субстратом для поддержки роста фибробластов и их функций. Таким образом, адгезивные материалы, содержащие фибрин и фибронектин, их мономеры

или продукты деградации, ускоряют заживление периодонтальных, в том числе и костных, тканей [7].

После применения БТФС, относительно естественного хода заживления, меньше выражены признаки острого и хронического воспаления в поврежденных тканях, более быстро фаза альтерации сменяется регенераторно-репаративными процессами. Показана целесообразность применения препаратов фибрина для ускорения регенерации тканей и ускорения приживления имплантатов в клинике и эксперименте [1–3].

Таким образом, в литературе содержится множество противоречивых и взаимоисключающих данных об эффективности использования препаратов фибрина в стоматологии. Однако, несмотря на это, явно недостаточно отражены результаты исследований регенерации костных тканей при лечении повреждений с использованием препаратов фибрина, в частности БТФС, приготовленного из аутологичной плазмы крови с тромбоцитами.

В связи с вышеизложенным морфологическими и радиовизиографическими методами сравнивали процессы регенерации поврежденного участка кости нижней челюсти при естественном ходе заживления и после применения БТФС в эксперименте.

### Материал и методы

В качестве модели были использованы самцы крыс линии Wag весом 180–200 г возрастом 6 месяцев. Все манипуляции с животными осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На каждую точку исследования было не менее 10 животных.

В данном случае было решено остановиться на создании дефекта костной ткани, который в меньшей степени имеет индивидуальные различия (особенности прохождения сосудов и нервов) и практически не смещается при работе мышц. Нижняя че-

люсть была выбрана вследствие того, что здесь достаточная прочность и ширина кости сочетается с легкостью доступа, кроме того, далее животное не сможет преждевременно избавиться от швов.

**Приготовление БТФС.** При декапитации нескольких крыс данной линии в стерильные стеклянные пробирки собирали 2–7 мл крови, которую центрифугировали при 2800 оборотах в минуту в течение 12 минут [1, 3]. После этого из пробирок отбирали верхнюю часть (БТФС – богатый тромбоцитами фибриновый сгусток или фибриновый сгусток с тромбоцитами), помещали в стерильные чашки Петри, хранили до нескольких часов в термостате при 37 °С до использования. Непосредственно перед применением стерильными ножницами от БТФС отрезали нужный по размерам фрагмент.

**Модель дефекта костной ткани и применения БТФС в эксперименте.** Под общим ингаляционным эфирным наркозом, в условиях чистой операционной, при соблюдении правил асептики и антисептики, после обработки кожи спиртом, скальпелем производили разрез кожи длиной 1,5–2 см по нижнему краю нижней челюсти. Тупым способом при помощи распатора отслаивали жевательную мышцу и обнажали поверхность кости нижней челюсти в области ее угла. Стоматологическим бором при определенных оборотах (одинаковый размер, ровные края, контроль глубины, одинаковая скорость вращения и, следовательно, нагрев тканей, возможность охлаждения) делали сквозное круглое отверстие диаметром 2 мм в кости угла нижней челюсти, с полостью рта дефект кости не сообщался. В группе крыс со спонтанным заживлением участка повреждения кости нижней челюсти (контроль) после прикрывания костного дефекта жевательной мышцей ушивали кожную рану непрерывным викриловым швом и снова обрабатывали кожу спиртом. В группе с использованием фибрина в круглый дефект кости пинцетом вводили БТФС, размер которого был незначительно больше диаметра отверстия. После плотно-

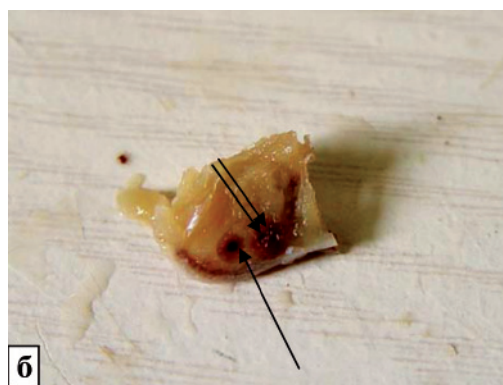
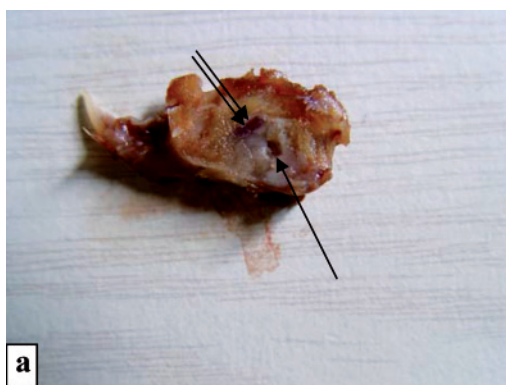
го заполнения отверстия кости его прикрывали жевательной мышцей, ушивали кожу викриловым швом и обрабатывали кожу спиртом. Все имплантированные материалы были стерильными.

Животных выводили из эксперимента через 1, 2, 3, 4 и 5 недель после операции. Объектом исследования служила костная ткань нижней челюсти с искусственно созданным дефектом.

Фрагменты нижней челюсти фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 часов. После фиксации удаляли кожу, подкожную клетчатку и жевательные мышцы, декальцинировали в растворе «Биодек R» (Bio Optica Milano, Италия) в течение 24 часов,

обезжировали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, изучали на световом микроскопе Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз.

Рентгенологические исследования проводили для наблюдений за репаративными процессами в кости нижней челюсти экспериментальных животных в различные сроки после ее повреждения, использовали препарированные фрагменты нижней челюсти с удаленной кожей и подкожной клетчаткой (рис. 1 а, б), оценивали плотность ткани в самом дефекте и в аналогичном участке контрлатеральной области.



*Рис. 1. Макропрепарат нижней челюсти крысы с удаленными жевательными мышцами через 1 неделю после ее повреждения:*

*а – естественная репарация. Признаков гнойного воспалительного процесса нет. Одной стрелкой указано искусственно созданное отверстие, заполненное кровяным сгустком. Две стрелки – корень центрального резца; б – после применения БТФС. Искусственно созданное отверстие не имеет макроскопических признаков воспаления, заполнено и находится на уровне окружающих тканей. Одной стрелкой указано искусственно созданное отверстие, заполненное БТФС. Две стрелки – корень центрального резца*

Статистическую обработку результатов проводили на прикладной статистической программе MS Excel (Microsoft, USA), определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Различия между средними считали достоверными при  $p \leq 0,05$ , использовали критерий Стьюдента.

### Результаты исследования

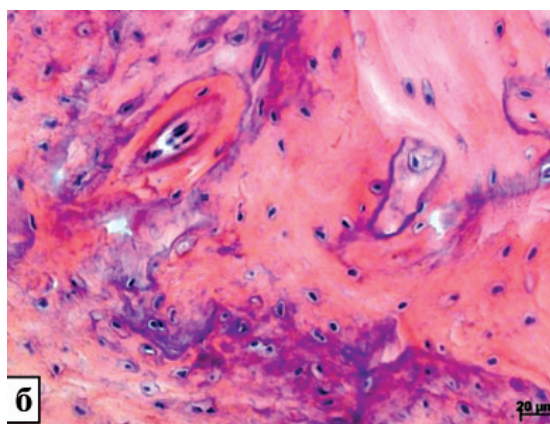
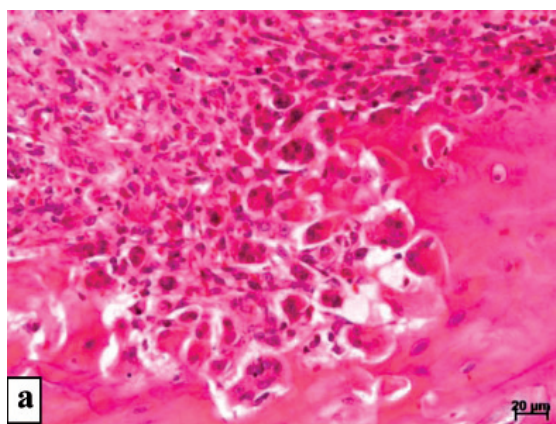
Через 1 неделю после повреждения кости нижней челюсти при спонтанной регенерации было найдено, что отверстие частично заполнено кровью, на некоторых участках в дефекте кости уже присутствовали фрагменты рыхлой волокни-

стой соединительной ткани и грануляции (рис. 2а). Следует отметить начало образования кости в дефекте (формирование отдельных островков молодой кости и хряща среди грануляций) (рис. 2а).

Через 2 недели отверстие было полностью закрыто молодой костной тканью с большим числом полнокровных кровеносных сосудов по краю дефекта. Среди вновь образованных костных структур также при-

существовала хрящевая ткань, особенно в центре искусственного отверстия.

На 3-й неделе отверстие было полностью закрыто вновь образованной костной тканью. О месте операции можно было судить по оставшимся крупным сосудам и хаотично расположенным костным балкам (костная мозоль). К этому моменту появились полностью сформированные полости с костным мозгом.



*Рис. 2. Регенерация поврежденной кости нижней челюсти при естественном ходе репаративного процесса. Окраска гематоксилином и эозином:*

*а – начало образования структур кости на периферии поврежденного участка нижней челюсти спустя 1 неделю после операции; б – хаотично расположенные балки костной ткани в костной мозоли через 4 недели после хирургического вмешательства*

Через 4 и 5 недель в большинстве случаев самостоятельного заживления только по следам костной мозоли можно было найти место операции (рис. 2б).

Спустя 1 неделю после повреждения кости и заполнения дефекта БТФС отверстие было полностью заполнено слившимися островками вновь сформированной кости (рис. 3а), то есть регенерация кости после применения БТФС уже к 1-й неделе привела к полному заполнению искусственного дефекта.

В большинстве случаев через 2 недели после повреждения кости и заполнения дефекта БТФС отверстие так же, как и при спонтанной регенерации, было закрыто вновь образованной костной тканью с большим числом полнокровных кровеносных сосудов на периферии дефекта и хрящевой тканью в центре.

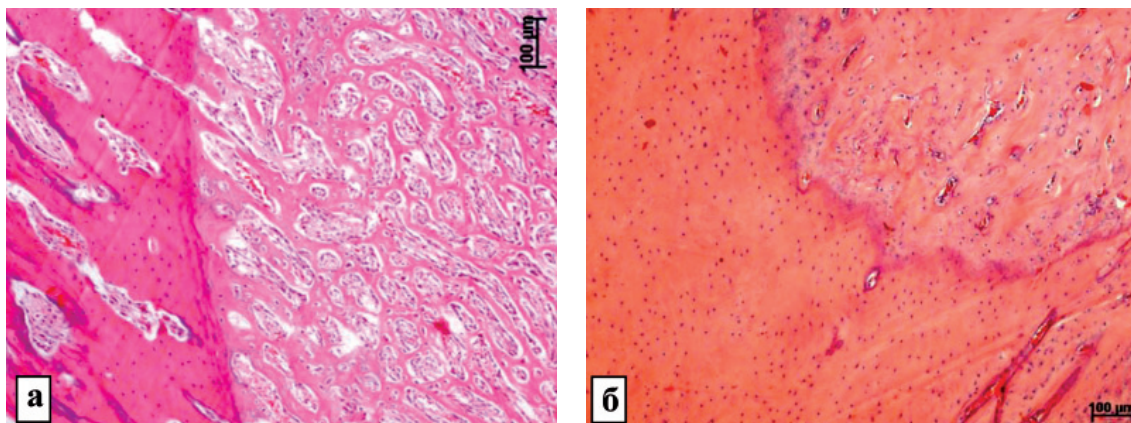
Спустя 3, 4 и 5 недель после повреждения кости нижней челюсти и применения БТФС, так же как и без использования фибрина, отверстие было полностью закрыто вновь образованной костной тканью с хаотично расположенными костными балками сформированной костной мозоли и полостями с костным мозгом (рис. 3б).

После статистической обработки данных денситометрии процессов регенерации дефекта кости нижней челюсти крыс при естественном заживлении и после применения БТФС было обнаружено отсутствие достоверных различий плотности тканей в очаге между сравниваемыми группами животных на каждую точку исследования. Однако плотность тканей при естественном ходе репаративных процессов статистически значимо отличалась от



здоровой кости на контрлатеральной стороне в течение 3 недель, а на фоне использования БТФС – только на 1-й и 2-й неделях (рис. 4а, б) (таблица), то есть плотность

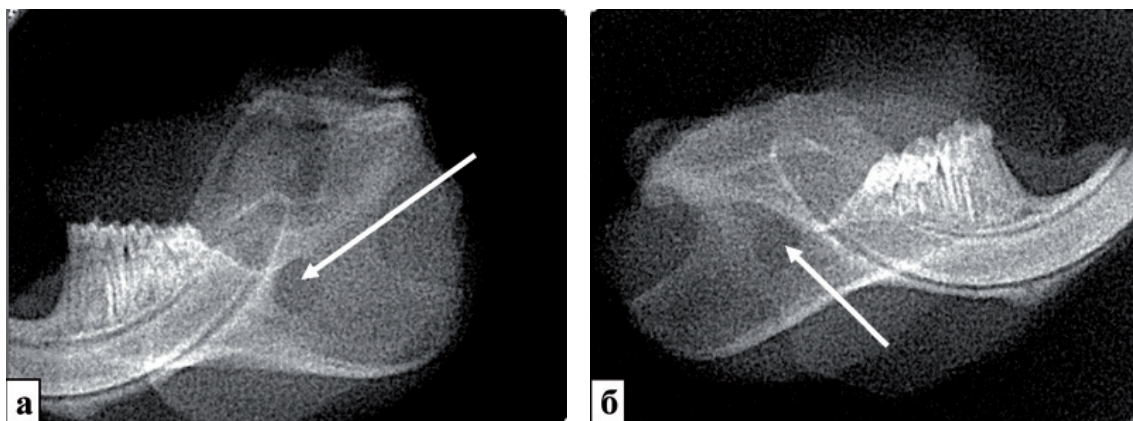
тканей в участке повреждения после применения фибрина была выше и раньше происходила нормализация значения этого показателя.



*Рис. 3. Репарации поврежденной кости нижней челюсти после применения БТФС.*

*Окраска гематоксилином и эозином:*

*а – спустя 1 неделю после операции дефект кости заполнен слившимися островками молодой костной ткани с большим числом сосудов; б – структуры костной мозоли на месте отверстия в кости нижней челюсти спустя 4 недели после операции*



*Рис. 4. Участок повреждения кости нижней челюсти операции по данным радиовизиографического исследования. Искусственно созданное отверстие указано стрелкой:*

*а – естественный ход регенерации. Через 3 недели дефект кости сохраняется; б – плотность тканей в дефекте костной ткани после применения БТФС выше*

Кроме этого необходимо отметить, что во все сроки наблюдения плотность тканей в патологическом очаге после применения БТФС была несколько больше, чем при естественном ходе репарации (рис. 4а, б),

хотя такая разница и была недостоверна. Максимальные различия плотности тканей были отмечены в период со 2-й по 4-й неделю, к 5-й неделе эти различия несколько сглаживаются (см. таблицу).

Плотность кости в дефекте нижней челюсти относительно окружающих неповрежденных тканей ( $M \pm m$ )

Срок после операции	Репаративный процесс		Разность плотности (фибрин-контроль) в дефекте
	Естественное течение	После применения БТФС	
1 неделя	0,892 ± 0,053*	0,913 ± 0,017*	0,021 ± 0,05
2 недели	0,922 ± 0,038*	0,953 ± 0,021*	0,031 ± 0,033
3 недели	0,914 ± 0,033*	0,949 ± 0,036	0,035 ± 0,051
4 недели	0,912 ± 0,059	0,942 ± 0,048	0,03 ± 0,043
5 недель	0,913 ± 0,064	0,924 ± 0,063	0,011 ± 0,008

Примечание: \* – величины, достоверно отличающиеся от интактной кости контралатеральной стороны ( $p \leq 0,05$ ); <sup>2,3</sup> – величины, достоверно различающиеся между собой в данных колонках ( $p \leq 0,05$ ).

### Обсуждение полученных данных

После повреждения кости нижней челюсти в эксперименте в тканях развивается острая воспалительная реакция. Этот процесс возникает как ответ на прямое повреждение тканей в результате хирургического вмешательства. Со временем стихает воспалительная реакция, вызванная операцией, и начинается восстановление поврежденных тканей.

При повреждении кости нижней челюсти и спонтанном заживлении отверстие сразу после травмы заполняется кровью и там формируется сгусток из фибрина с большим числом эритроцитов. Постепенно этот сгусток лизируется фагоцитами (сначала нейтрофилами, потом макрофагами) и по мере его удаления туда мигрируют остеогенные клетки. За счет функционирования этих остеобластов начинается формирование молодой костной ткани с краев дефекта. Постепенно эти островки молодой кости становятся шире, сливаются, и практически во всех случаях к 2–3 неделе у крыс происходит полная регенерация кости в искусственно созданном дефекте. Следует отметить, что морфологические данные о регенерации кости к указанным срокам подтверждены результатами денситометрии.

Фибрин в тканях, согласно литературным данным, уменьшает выраженность

воспалительного процесса [1–3] и ограничивает распространение инфекции [5], то есть при введении фибринового сгустка в полость раны, видимо, можно защитить окружающие ткани как от распространения микроорганизмов, так и от излишнего воздействия лизосомальных ферментов фагоцитов. Происходит ограничение деструкции и в связи с этим раньше начинаются регенераторные процессы, в тканях оказывается меньший объем антигенов и детрита, происходит более быстрое очищение раны.

Кроме этого, фибриновый сгусток является матрицей, по которой мигрируют лейкоциты (нейтрофилы), эндотелиоциты и фибробласты [7, 8]. Тромбоспондин-1 из тромбоцитов стимулирует тубулогенез (начальную стадию ангиогенеза) эндотелиоцитами [6].

Мигрируя по фибрину [8], нейтрофилы более быстро достигают всех участков раны, даже покрытых наслоениями гноя и детрита и, таким образом, ткани более быстро очищаются от антигенных веществ (микроорганизмы и тот же детрит). Кроме того, при передвижении по фибриновому сгустку нейтрофилы частично «разжижают» его своими ферментами и даже плотный сгусток становится похожим на сеть.

Фибробласты, располагаясь в фибриновой сети [7, 8], начинают синтез коллагена

не только со дна раны, но и из ее полости, таким образом более быстро на месте формируется рубцовая ткань.

Следует отметить, что фибрин не только облегчает миграцию фибробластов, но и сам по себе ускоряет синтез соединительной ткани [1–3, 8].

Эндотелиоциты, также стимулированные к миграции фибрином [8], более быстро начинают процессы ангиогенеза [6] и вновь образованные сосуды располагаются не только в грануляциях по дну раны, но и в объеме фибриновой сети. Более быстрый рост сосудов в свою очередь облегчает миграцию лейкоцитов из сосудистого русла и синтез компонентов соединительной ткани.

Спустя 1 неделю после операции с последующим заполнением отверстия в кости нижней челюсти БТФС не происходит заполнения дефекта костной ткани кровяным сгустком, нет необходимости тратить время на лизис и элиминацию эритроцитов посредством фагоцитоза. В большинстве случаев уже к этому сроку весь дефект костной ткани был заполнен слившимися островками вновь сформированной кости, то есть регенерация кости после применения БТФС уже к 1-й неделе привела к практически полному заполнению искусственного дефекта.

Ко второй неделе после использования БТФС происходило дальнейшее постепенное заполнение дефекта вновь образованной костной тканью с большим числом полнокровных кровеносных сосудов на периферии и формирование костной мозоли, которая полностью закрывала отверстие кости уже к 3-й неделе, к этому же сроку было отмечено образование в месте хирургического вмешательства полостей с красным костным мозгом. Указанные изменения той или иной степени выраженности сохранялись и в последующие сроки наблюдения.

Основным отличием в данном случае будет являться наличие большого числа эритроцитов в естественном сгустке. Фибрин, присутствующий в нем, также будет облегчать миграцию нейтрофилов, эндотелиоцитов, макрофагов, остеобластов и

других клеточных элементов. Однако эритроциты в петлях фибриновой сети будут препятствовать этому процессу. Кроме того, часть потенциала фагоцитов будет расходоваться не только на поглощение детрита, но и на фагоцитоз эритроцитов из сгустка.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно заключить, что начало репарационных процессов при применении БТФС проходит интенсивнее, чем при спонтанном заживлении. Отверстие в кости быстрее заполняется островками костной ткани, которые раньше сливаются. Видимо, формирование молодой кости начинается сразу после операции без потери времени на лизис и удаление кровяного сгустка с большим числом эритроцитов.

В связи с тем, что после использования БТФС происходит более интенсивная регенерация участка повреждения кости, по-видимому, целесообразно применение препаратов фибрина, приготовленных из аутологичной крови, для ускорения репаративных процессов костных тканей в стоматологии, хирургии и травматологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 21.31 «Разработка технологий управления процессами регенерации костных тканей с применением биodeградируемых полимеров»).

### Выводы

1. После повреждения кости нижней челюсти у крыс в естественном ходе регенерации дефект костной ткани заполняется кровью и там формируется сгусток с большим числом эритроцитов. Спустя 1 неделю в участке повреждения кости среди фрагментов кровяного сгустка и грануляций уже присутствуют отдельные островки молодой костной ткани. Через 2–3 недели отверстие в кости нижней челюсти полностью замещается молодой костной тканью.

2. После операции с последующим заполнением дефекта кости нижней челюсти БТФС не происходит образования кровя-



ного сгустка. Уже спустя 1 неделю весь дефект костной ткани заполнен слившимися островками вновь сформированной кости. Ко второй неделе после использования БТФС отмечено дальнейшее замещение дефекта костной тканью и формирование костной мозоли.

**Список литературы**

1. Майбородин И.В., Колесников И.С., Шеплев Б.В. и др. // Морфологические ведомости. – 2007. – № 3–4. – С. 116–118.
2. Майбородин И.В., Колесников И.С., Шеплев Б.В., Рагимова Т.М. Применение фибрина и его препаратов в стоматологии // Стоматология. – 2008. – Т. 87, № 6. – С. 75–77.
3. Майбородин И.В., Колесников И.С., Шеплев Б.В. и др. Морфология подлежащих тканей десны после дентальной имплантации с применением препаратов фибрина // Стоматология. – 2009. – Т. 88, № 1. – С. 9–13.
4. Choukroun J., Diss A., Simonpieri A. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. – 2006. – Vol. 101, № 3. – P. e56–e60.
5. Choukroun J., Diss A., Simonpieri A. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. – 2006. – Vol. 101, № 3. – P. 299–303.

6. Kellouche S., Mourah S., Bonnefoy A. et al. Platelets, thrombospondin-1 and human dermal fibroblasts cooperate for stimulation of endothelial cell tubulogenesis through VEGF and PAI-1 regulation // Exp. Cell. Res. – 2007. – Vol. 313, № 3. – P. 486–499.

7. McDougall S., Dallon J., Sherratt J., Maini P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications // Philos Transact. A Math. Phys. Eng. Sci. – 2006. – Vol. 364, № 1843. – P. 1385–1405.

8. Schwartz-Arad D., Levin L., Aba M. The use of platelet rich plasma (PRP) and platelet rich fibrin (PRF) extracts in dental implantology and oral surgery // Refuat Hapeh Vehashinayim. – 2007. – Vol. 24, № 1. – P. 51–55, 84.

9. Spotnitz W.D., Prabhu R. Fibrin sealant tissue adhesive – review and update // J. Long Term Eff. Med. Implants. – 2005. – Vol. 15, № 3. – P. 245–270.

10. Valbonesi M. Fibrin glues of human origin // Best Pract. Res. Clin. Haematol. – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 191–203.

**Рецензенты:**

Бгагова Наталия Петровна, д.б.н., профессор, зав. лабораторией ультраструктурных исследований НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН;

Склянов Юрий Иванович, д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии ГОУ ВПО Новосибирского государственного медицинского университета Росздрава.

**THE POSSIBILITY OF ACCELERATION OF REPARATIVE PROCESS IN BONE TISSUES AT RESULTS OF FIBRIN CLOT APPLICATION**

**Maiborodin I.V., Kolesnikov I.S., Kozody D.M., Vybornov M.S., Shevela A.I., Shevela A.A., Sheplev B.V., Drovosekov M.N., Kolmakova I.A., Toder M.S.**

*The Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, e-mail: imai@mail.ru*

The processes of regeneration of the damaged rat bottom jaw bone after application of enriched thrombocytes a fibrin clot were studied by morphological and radiovisiographic methods. At a natural course of regeneration the artificial aperture of bone is filled with blood and there the blood clot is formed. After 1 week the separate bone islets of a young tissue are occur in bone defect. In 2-3 weeks the aperture in a bottom jaw bone is completely closed by a young bone tissue. After operation with filling of bone bottom jaw defect by fibrin clot there is no formation of a blood clot. Already after 1 week the bone tissue defect is filled by the merged islets of again generated bone. By second week after fibrin use the further formation of bone tissue in defect and formation of a bone callosity is noted.

**Keywords: fibrin clot, damaged bottom jaw bone, regeneration**