



Замещение костного дефекта после удаления корня зуба остеотропным материалом easy-graft® CRYSTAL с плазмой богатой факторами роста (PRGF) и аутогенной фибриновой мембраной

А.В. Павленко

В.Ф. Токарский

Г.Б. Проць

A. B.Sc. Ph.D.
Shterenberg

Проблема восстановления кости после нанесенных повреждений является одной из древнейших в медицине и, несмотря на её многовековую историю, остается далеко не решенной до настоящего времени.

Стремление клиницистов создать условия для восстановления костной структуры в каждом конкретном случае пока еще не всегда реализуются. Мы еще не научились управлять остеогенезом. Регенерация костной ткани происходит неоднотипно, и часто желаемый результат недостижим [1, 2, 3, 4].

Действительный интерес представляет целенаправленное воздействие на остеогенез, в результате чего, костные дефекты замещаются не фибрознохрящевой соединительной тканью, на основе которой позднее сформируется костная ткань, а замещаются собственной костной тканью, сформированной на поверхности резорбируемых, остеокондуктивных, костзамещающих материалов с последующим процессом ремоделирования [5, 6].

Важная роль в процессе регенерации костной ткани и в процессе заживления мягких тканей отводится тромбоцитам.

У тромбоцитов есть две основные задачи – это остановка кровотечения (гемостаз) и стимуляция процесса заживления поврежденных тканей, как мягкой, так и костной [8].

Тромбоциты циркулируют в кровяном русле, транспортируя факторы роста и высвобождая их вместе с факторами свертывания крови в тех участках, где ткани были повреждены.

Факторы роста синтезируются мегакариоцитами.

Они сохраняются, главным образом, в α-гранулах тромбоцитов.

Когда происходит активация тромбоцитов, они лопаются и из их протоплазмы вымываются белки, такие как – фибриноген, фибронектин и витронектин.

В тоже самое время выносятся множество факторов роста, включая:

- костный морфогенетический белок (BMP);
- трансформирующий фактор – (TGF-β);
- тромбоцитарный фактор (PDGF);
- инсулиноподобный фактор (IGF);
- фактор стимулирующий формирование эндотелия сосудов (VEGF);
- фактор роста стимулирующий фибробласты (FGF) и др. [9]

Факторы роста играют существенную роль в регулировании механизмов заживления раны и регенерации тканей [10, 11]. Появившиеся в последние годы научные разработки в области тканевой инженерии и регенеративной медицины основаны

на принципе поставки факторов роста и биологически активных белков к местам повреждения тканей, чтобы вызвать процесс заживления и регенерации [12].

В конце 90-ых, начинают появляться разработанные, в основном, хирургами-стоматологами технологии, позволяющие получать препараты, обогащенные тромбоцитами. Разработанные методики были направлены на улучшение регенераторных способностей тканей путем увеличения количества факторов роста и белков, находящихся в тромбоцитах в зоне повреждения [13, 14, 15, 16].

Терминология

Существует довольно широкий спектр биологических препаратов, которые получили название – «плазма богатая тромбоцитами (PRP)».

Термин «плазма богатая тромбоцитами» часто используется, чтобы идентифицировать эти препараты, даже если они приготовлены по различным протоколам и отличаются друг от друга количественно и качественно [17].

Павленко А.В., проф., директор Института стоматологии Национальной медицинской Академии последипломного образования им. П.Л. Шупика, профессор, г. Киев, Украина

Токарский В.Ф., к. м. н., доцент кафедры стоматологии, института стоматологии Национальной Медицинской Академии последипломного образования им. П.Л. Шупика, г. Киев, Украина

Проць Г.Б., к. м. н., доцент кафедры хирургической стоматологии Ивано Франковского Государственного Национального Медицинского Университета, Украина

Shterenberg A. B.Sc. Ph.D., к. м. н., практикующий хирург-стоматолог, консультант и лектор компании «Sunstar Guidor», (Zurich, Switzerland) по вопросам клинического применения остеотропных материалов в Восточной Европе

В литературе можно встретить такие названия, как «тромбоцитарный концентрат», «тромбоцитарный гель» или «высвобожденные тромбоциты» [21, 22, 23, 24].

В классификации представленной Ehrenfest et al., автор разделил препараты с различной концентрацией тромбоцитов на четыре категории, в зависимости от содержания фибрина и лейкоцитов.

1 категория: чистая плазма богатая тромбоцитами (PPRP);

2 категория: плазма богатая тромбоцитами + лейкоциты (LPRP);

3 категория: чистая плазма богатая фибрином (PPRF);

4 категория: плазма богатая фибрином + лейкоциты (LPRF) [13].

Доктор Eduardo Anitua et al. рекомендует использовать следующую терминологию. Он называет такие препараты – «плазма богатая факторами роста» или «PRGF». Этим термином дается определение того, что собственная кровь пациента, в которой сконцентрированы тромбоциты, подвергается одноэтапному центрифугированию с добавлением цитрата натрия в качестве антикоагулянта и хлористого кальция в качестве активатора, и в полученном препарате исключается содержание лейкоцитов [5].

Доктор Bertram Zarins, et al. предлагает в тех случаях, когда речь идет о плазме с высокой концентрацией тромбоцитов, использовать название препарата «плазма богатая тромбоцитами» или «PRP». Когда речь идет о препарате со ссылкой на описание, предложенное доктором Eduardo Anitua et al., использовать термин «плазма богатая факторами роста» или «PRGF».

В то же самое время, плазма богатая тромбоцитами (PRP) представляет собой порцию плазмы, полученной при центрифугировании крови, в которой концентрация тромбоцитов выше обычного уровня [21].

Однако, «плазма богатая тромбоцитами» (PRP) содержит не только высокий уровень концентрации тромбоцитов. Она также имеет полный комплект факторов, отвечающих за свертывание крови, которые позднее возвращаются к своему нормальному, физиологическому уровню.

Конечно, в идеале, должно быть универсальное соглашение относительно определений и терминологии. По крайней мере, природа исследований по получению тромбоцитарных препаратов, однозначно, должна быть точно описана. [20, 23, 25, 26].

Тромбоциты: природа и морфология

Тромбоциты – это круглые или овальной формы клетки, которые образуются в костном мозге и имеют диаметр около 2 μ m.

По своей природе тромбоциты являются цитоплазматическими фрагментами мегакариоцитов (одна из разновидностей белых кровяных клеток) [4–26].

Тромбоциты лишены ядра, они содержат органеллы и структуры, такие как, митохондрии, микротрубочки и гранулы. Гранулы – трех видов: α , β , и γ . [11, 25, 26].

В каждом тромбоците содержится от 50 до 80 – гранул, и каждая гранула покрыта уникальной оболочкой. Диаметр α – гранулы, приблизительно, от 200 до 500 nm и содержит более 30 биоактивных белков, многие из которых играют фундаментальную роль в остановке кровотечения и заживлении тканей [13, 23].

В норме концентрация тромбоцитов в кровяном русле составляет, приблизительно, от 140 000 до 400 000 в одном кубическом миллиметре. Такая концентрация тромбоцитов в крови сохраняется в течении 10 дней, после чего старые тромбоциты разрушаются макрофагами и на их место приходят новые [21, 26].

Функция тромбоцитов в гемостазе и заживлении ран

Функционально тромбоциты участвуют в процессе гемостаза и в заживлении ран. Однако, это может рассматриваться как следующие друг за другом звенья одной цепи, поскольку, гемостаз является первым этапом заживления.

Роль тромбоцитов в гемостазе

После того, как произошла травма и появились поврежденные сосуды, тромбоциты попадают в контакт с коллагеновыми волокнами, которые являются основой стенок капилляров. Такое взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой приводит к их накоплению в зоне травмы и приводит к изменению их формы.

Они теряют свою округлую форму, и у них появляются большие липкие отростки.

Этот процесс получил название – активация. Во время активации α –гранулы склеиваются с мембраной тромбоцита и выпускают в окружающее пространство белки. Эти белки способствуют переходу жидкого белка крови фибриногена в фибрин. При повреждении малых кровеносных сосудов такое скопление тромбоцитов и их белков, бывает достаточным для остановки кровотечения. Если дефект большого размера, как правило, формируется кровяной сгусток. [12, 14].

Роль тромбоцитов в регенерации костной ткани

При удалении корня зуба или создания ложа под имплантат наносится самая обычная травма костной ткани. Кровь вытекает из поврежденных сосудов, и костный дефект заполняется кровью. Через некоторое время формируется кровяной сгусток, который состоит в основном из тромбоцитов и фибриновых волокон, которые образуют своеобразную сеть. В последующем эта сеть представляет собой биологическую матрицу для миграции и пролиферации остеогенных клеток. [5, 16].

В течение первого часа после формирования кровяного сгустка наступает его ретракция, сгусток сжимается. Происходит сдавливание тромбоцитов. Они активизируются и лопаются. Активация клеток, как известно – это дегрануляция. Из протоплазмы тромбоцитов высвобождаются α -гранулы, несущие факторы роста. Факторы роста присоединяются к рецепторам мембран соответствующих клеток и стимулируют их к дифференциации, миграции и пролиферации.

Мезенхимальные клетки дифференцируются в остеобласты, фибробласты, хондробласты и другие клетки, необходимые для регенерации соответствующего вида ткани.

В регенерации костной ткани различают три основные фазы.

Первая и самая важная фаза – это фаза остеокондукции.

Она характеризуется призывом остеогенных клеток к миграции в сторону дефекта.

Вторая фаза – это построение остеобластами новой костной матрицы.

И наконец, третья фаза – это фаза ремоделирования костной ткани.

Приготовление плазмы

Плазму богатую факторами роста, получают из небольшого количества (20 см³) периферической венозной крови. При заборе крови используются специальные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта 3,8% цитрата натрия. Полученная кровь подвергается центрифугированию в течение 8 минут при скорости вращения 580 G в оборудовании, специально разработанном для этих целей (Рис. 3).

После центрифугирования в каждой пробирке получают четыре фракции.

Первая фракция используется для смачивания лунки удаленного корня или имплантата перед его внедрением в созданное ложе.

Вторая фракция – для приготовления фибриновой мембраны

Третья фракция – в виде белой полоски, это скопление лейкоцитов.

Четвертая – это красные кровяные клетки.

Очень аккуратно немедленно после центрифугирования первая и вторая фракции собираются в отдельные стеклянные бюксы.

Самое главное – избежать попадания лейкоцитов

в любую из фракций, потому, что присутствие лейкоцитов всегда является риском возникновения воспалительного процесса.

Стеклянный бюкс, содержащий плазму, подвергается инкубации в течение 5 минут при температуре 37 °С.

Вторая фракция подвергается активации и ретракции для получения фибриновой мембраны, в течение 30 минут при температуре 37 °С. В качестве активатора используется хлористый кальций, в отличие от предыдущих технологий, где применялся коровий тромбин.

PRGF – это фибриновая матрица, полученная строго из собственной крови пациента, содержащая большое количество факторов роста.

Фибрин богатый тромбоцитами (PRF) был получен во Франции *Choukroun* и др. (2001). Это, как бы, второе поколение препаратов содержащих повышенную концентрацию тромбоцитов, которые широко используются для ускорения регенерации мягких и твердых тканей. Его преимущества перед более известной плазмой богатой тромбоцитами (PRP): легкость приготовления и применения, минимальный забор крови, не требуется никакой биохимической модификации. Но самое существенное преимущество (PRGF) в том, что для его активации не используется бычий тромбин. Сегодня применение бычьего тромбина в Европе, США и Канаде запрещено. В качестве активатора используется хлористый кальций.

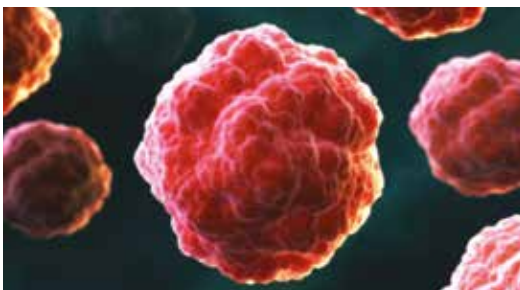


Рис. 1. Тромбоциты

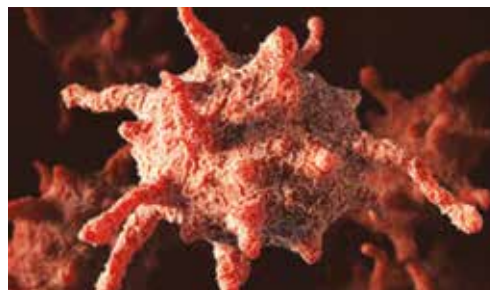


Рис. 2. Вид тромбоцита после активации



Рис. 3. Центрифуга для получения плазмы богатой факторами роста

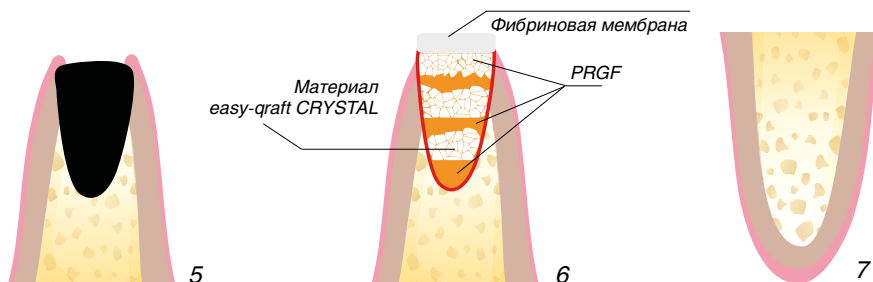


Рис. 4. Схематическое изображение получения фракций после центрифугирования

Рис. 5. Лунка удаленного корня зуба

Рис. 6. Послойное заполнение лунки PRGF и материалом easygraft® CRYSTAL (Фибриновая мембрана)

Рис. 7. Заживление мягких тканей и регенерация костной ткани



Клинический пример

Пациентка Я. в возрасте 20 лет, обратилась в клинику с жалобами на припухлость и боли в области 36 зуба. Клинически было установлено: значительное разрушение коронковой части 36 зуба, присутствует установленная пломба. Ранее на зубе проводилось эндодонтическое лечение.

На ортопантограмме и на КТ обнаружено значительное разрушение костной ткани в области бифуркации и верхушек корней 36 зуба.

После согласования с пациенткой был принят следующий план лечения:

Удаление 36 зуба и заполнение лунок двух корней и костного дефекта в области бифуркации остеотропным материалом *easy graft® CRYSTAL*.

Через 6 месяцев после контрольной ортопантограммы, забор костной ткани из области 36 зуба с установкой имплантата.

После периода остеоинтеграции имплантата оконча-

ние реабилитации пациентки, посредством изготовления металлокерамической коронки, которая будет фиксироваться на имплантат.

Перед удалением зуба у пациентки было взято 20 мл. венозной крови и методом центрифугирования в специальной центрифуге были получены плазма богатая факторами роста (PRGF) и фибриновая мембрана.

В целях профилактики атрофии альвеолярного отростка и сохранения адекватного объема костной ткани для дальнейшего внедрения имплантата мы использовали следующую технологию.

В качестве наполнителя использовался синтетический, костзамещающий материал *easy graft® CRYSTAL* швейцарской компании «Sunstar Guidor», Zurich.

Это бифазный, остеокондуктивный материал, где каждая гранула состоит из двух материалов: 60% искусственный гидроксиапатит (ГА) и 40% β-три кальций фосфат (ТКФ).

Когда материал вводится в костный дефект, он попадает в контакт с жидкостью раны (кровь, слюна, межтканевая жидкость) и спустя некоторое время после контакта с жидкостью, он начинает твердеть. Поэтому использовать материал *easygraft® CRYSTAL* в сочетании с плазмой богатой факторами роста (PRGF) и фибриновой мембраной путем простого смешения этих компонентов не представляется возможным.

Плазма богатая факторами роста, как и фибриновая мембрана, содержат большое количество жидкости, которая вызовет твердение материала и не позволит хорошо уложить его в костный дефект.

В данном клиническом случае мы применили методику послойного заполнения костного дефекта лунки удаленного зуба. Схема заполнения дефекта после удаления корня зуба, представлена на (рис. 5–7).

Протокол проведенного лечения:



Рис. 8. КТ исходной ситуации

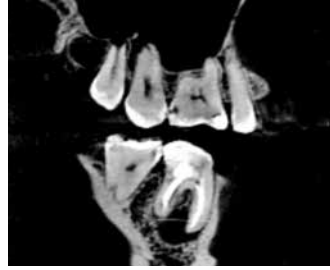


Рис. 9. Ситуация после удаления



Рис. 10. Приготовление PRGF и мембраны



Рис. 11. Материал вносится в костный дефект



Рис. 12. Накладывание мембраны



Рис. 13. Мембрана, закрывающая дефект



Рис. 14. Ушивание раны



Рис. 15. Заживление раны через 24 часа



Рис. 16. Ортопантограмма через 6 месяцев перед забором кости и установкой имплантата



Рис. 17. Сохраненный альвеолярный отросток



Рис. 18. Забор костной ткани 3.3 мм трепаном для гистологического исследования



Рис. 19. Ложе под имплантат



Рис. 20. Установка имплантата



Рис. 21. Ортопантограмма имплантата спустя 6 месяцев после проведенного лечения

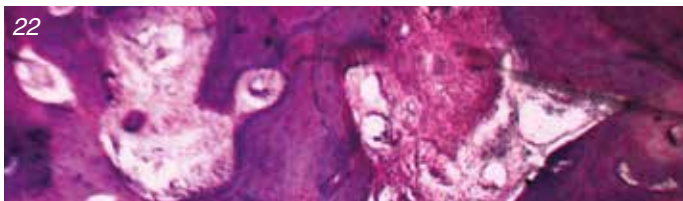


Рис. 22–23. Гистологические препараты. Окраска гематоксилинэозин. Ув.х 40 и 100. Резорбирующийся материал между вновь сформированной костью

Результаты

Заживление раны прошло без каких-либо осложнений. Через 6 месяцев в том месте, где планировалась установка имплантата, был произведен забор костной ткани.

Остеотомия осуществлялась через слизистую оболочку трепаном с наружным диаметром 3.3 мм. Во время сверления было установлено, что сопротивление костной ткани аналогично сопротивлению зрелой кортикальной кости. Полученный в виде столбика образец состоял из мягкой ткани, остатков костзамещающего материала и, в апикальной трети, из собственной костной ткани. После забора костной ткани полученное от трепана отверстие было использовано для формирования ложа под имплантат. Был установлен имплантат «Super Line» – 4.0 мм. диаметр, длина 10 мм (*Dentium, Корея*).

Гистологические исследования

При малом увеличении наблюдалась вновь сформированная, утолщенная трабекулярная костная ткань, располагающаяся вокруг резорбируемого материала *easy graft® CRYSTAL*.

При большом увеличении просматривалась хорошо организованная, утолщенная чешуйчатая кость вокруг резорбируемого материала с разной степенью присутствия стромальных фиброзных волокон.

Обсуждение

Главная задача предохранения лунки после удаления заключается в том, чтобы

снизить воспалительную реакцию, возникшую в зоне удаления, сохранить костные стенки дефекта стабильными в течение всего периода от момента удаления до момента установки имплантата, улучшить регенерацию как мягкой, так и костной тканей.

Замещение костного дефекта лунки удаленного корня с помощью костзамещающего материала, который твердеет в дефекте, является обычной процедурой, и данный клинический случай прекрасно это подтверждает. Используя методику профилактики атрофии, удастся сохранить размеры и анатомическую форму окружающих дефект, костных тканей.

В данном клиническом случае на ортопантограмме, полученной через 6 месяцев после проведенного лечения, отмечается полная замена остеотропного кость замещающего материала *easy graft® CRYSTAL* на собственную костную ткань. Хорошо сохранен уровень кости, нет традиционной потери костной ткани, наступающей после удаления корня зуба.

Некоторые научные исследования показывают, что если в зону поврежденных тканей внести тромбоциты, полученные из собственной крови пациента, создавая их концентрацию выше физиологической нормы, то отмечается улучшение заживления и регенерации тканей.

Тромбоциты немедленно появляются в больших количествах там, где произошло повреждение тканей. Такое явление имеет эволюцион-

ный смысл, подчеркивая тот факт, что появление тромбоцитов – это прямой путь к заживлению раны. Согласно своему предназначению, тромбоциты всегда будут присутствовать в том месте, где они необходимы, чтобы создать условия, способствующие регенерации тканей.

Однако, на данный момент в литературе встречается небольшое количество контрольных клинических исследований, которые представляют доказательства того, что приготовленная из собственной крови пациента плазма богатая тромбоцитами действительно ускоряет заживление мягкой и костной ткани.

По всей видимости, требуются дополнительные клинические исследования, чтобы определить условия, при которых применение плазмы богатой факторами роста (PRGF) позволяет получить хороший клинический результат. В настоящее время на основании уже имеющихся клинических результатов можно сделать заключение, что использование (PRGF) предполагает некоторую эффективность в заживлении и регенерации мягких и твердых тканей.

В то же самое время, довольно трудно определить потенциальные преимущества использования плазмы богатой факторами роста (PRGF) у пациентов с нормальными репаративными свойствами, другими словами, – у пациентов с нормальным процессом заживления мягких тканей и регенерации костной ткани.

Литература

1. Перова М.Д., Козлов В.А. Ранги эффективности регенерационных материалов при использовании цилиндрических остеоинтегрируемых дентальных имплантатов в условиях узкого гребня альвеолярного отростка челюстей. //Материалы 5-й Международной конференции челюстно-лицевых хирургов 29 мая-2 июня 2000г. СПб. -С .99.
2. Перова М.Д. Внутрикостный зубной имплантат. //Патент на изобретение N 2144336. Зарегистрирован в Гос. реестре изобр. РФ 20.01.2000 г. Приоритет от 02.02.98 г.
3. Перова М.Д. Клиническое и теоретическое обоснование комплексной программы повышения эффективности дентальной имплантации. Автореф. дис. ...д-ра мед. наук -СПб., 1999. — 400 с.
4. Перова М.Д. О возможностях преодоления негативных тенденций при внедрении в практику метода зубной имплантации. //Сборник научных трудов 1-й Всероссийской научно-практической конференции 29 мая — 2 июня 2000г. «Реформирование муниципального здравоохранения: проблемы и поиски решений». Краснодар — С. 138-141.
5. Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 91: 4, 2004.
6. Anderson, J. M. The cellular cascades of wound healing. In J. E. Davies (Ed.), *Bone Engineering*. Toronto: em squared inc., 2000. P. 81–93.
7. Bhanot, S., and Alex, J. C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast. Surg.* 18: 27, 2002.
8. Cameron J. Wilson, Richard E. Clegg, David I. Leavesley, Mark J. Pearcy. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review *Tissue Engineering*. January 1, 2005, 11(1-2): 1-18.
9. Conley, C. L. Hemostasis. In V. B. Mountcastle (Ed.), *Medical Physiology*. St. Louis: Mosby, 2004. P. 1137–1146
10. Froum, S. J., Wallace, S. S., Tarnow, D. P., et al. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: Three bilateral case reports. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 22: 45, 2002.
11. Frost, H. M. A 2003 update of bone physiology and Wolff's law for clinicians. *Angle Orthod.* 74: 3, 2004.
12. Gonshor, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: Background and process. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 22: 547, 2002.
13. Ehrenfest et al et al. Biology of platelet derived growth factor. In *Skeletal Growth Factors*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. P. 129–151.
14. Man, D., Plosker, H., and Winland-Brown, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 107: 229, 2001.
15. Mann, K. G. Thrombin formation. *Chest* 124 (3 Suppl.): 4S, 2003.
16. Marx, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 10: 225, 2001.
17. Marx, R. E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62: 489, 2004
18. Marx, R. E. Platelet concentrate: A strategy for accelerating and improving bone regeneration. In J. E. Davies (Ed.), *Bone Engineering*. Toronto: University of Toronto, 2000. P. 447– 453.
19. Margolis, D. J., Kantor, J., Santanna, J., et al. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 24: 483, 2001.
20. Petrungaro, P. S. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend. Contin. Educ. Dent.* 22: 729, 2001.
21. Szpaderska, A. M., Egozi, E. I., Gamelli, R. L., et al. The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 120: 1130, 2003.
22. Tischler, M. Platelet rich plasma: The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N. Y. State Dent. J.* 68: 22, 2002.
23. Waters, J. H., and Roberts, K. C. Database review of possible factors influencing point-of-care platelet gel manufacture. *J. Extra Corpor. Technol.* 36: 250, 2004.
24. Welsh, W. J. Autologous platelet gel: Clinical function and usage in plastic surgery. *Cosmetic Derm.* 11: 13, 2000.
25. Zimmermann, R., Arnold, D., Strasser, E., et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang.* 85: 283, 2003.
26. Werner, S. and Grose, R. (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835–87