

О.В.Павленко¹
Е.О.Дмитрієва²
В.І.Лузін³

¹ Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика
² Дніпропетровська державна медична академія
³ Луганський державний медичний університет

Ключові слова: кістковий дефект, репаративна регенерація кістки, трикальційфосфат, EasyGraft.

Надійшла: 11.04.2011
Прийнята: 22.05.2011

УДК 616.89:159.942.2+618.14-065.87

ГІСТОЛОГІЧНА БУДОВА РЕГЕНЕРАТУ ПРИ ЗАПОВНЕННІ КІСТКОВОГО ДЕФЕКТУ МАТЕРІАЛАМИ EASYGRAFT І ТРИКАЛЬЦІЙФОСФАТОМ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Клініко-лабораторне обґрунтування використання сучасних медичних технологій для діагностики, профілактики та лікування основних стоматологічних захворювань» (номер державної реєстрації 0104U000711).

Резюме. В експерименті на 112 білих щурах вивчали вплив імплантації матеріалів EasyGraft та трикальційфосфату до проксимальної метадіафізарної ділянки великогомілкової кістки на гістологічну будову регенерату, що формується, та губчастої кістки у реактивній ділянці. Встановлено, що пластика кісткових дефектів EasyGraft та трикальційфосфатом супроводжується їх біорезорбцією й виявляє оптимізуючий вплив на процеси репаративної регенерації кістки. Це супроводжується зниженням питомої площі імплантованих часток, зростанням індексу остеointegraції та питомої щільності трабекул у реактивній ділянці. Найбільша активність виявлених процесів спостерігається в період з 15-го по 30-й день після імплантації. Застосування EasyGraft є ефективнішим, ніж застосування трикальційфосфату.

Морфологія. – 2011. – Т. V, № 2. – С. 49-54.

© О.В.Павленко, Е.О.Дмитрієва, В.І.Лузін, 2011.

Pavlenko A.V., Dmitriyeva E.A., Luzin V.I. Histological structure of regenerated bone tissue under effect of Easy-Graft and amorphous calcium phosphate implants.

Summary. In this study we investigated the effects of EasyGraft and amorphous calcium phosphate implanted into the proximal metadiaphysis on bone regeneration and cancellous bone within reaction zone. Here we found out that EasyGraft and amorphous calcium phosphate undergo resorption and thus optimize bone regeneration. Regeneration is accompanied by decreased specific area of the particles implanted and increased integration index and specific density of trabeculae within the reaction zone. Highest intensity of these processes was observed in the period from 15th till the 30th day after implantation. EasyGraft is more preferable for implantation than amorphous calcium phosphate.

Key words: bone defect, bone regeneration, amorphous calcium phosphate, EasyGraft.

Вступ

Прогрес технологій остеозаміщення в стоматології в останнє десятиліття пов'язаний не тільки з появою нового покоління остеопластичних матеріалів, розробкою методів їх застосування, підвищення клінічної ефективності, але більшою мірою визначений результатами досліджень в області остеології – гістофізіології кісткової тканини, клітинних взаємовідношень у нормі й патології (Павленко А.В., Мазур І.П., 2003; Грудянов А.И., 2009). У наш час ні в кого не викликає сумнівів перевага синтетичних препаратів перед іншими матеріалами, запропонованими з цією метою (Островский А.И., 2005; Гизатуллин Р.А., 2007). Використання сучасних замінників кісткової тканини дозволяє протікати процесу регенерації без проміжної реконструкції й атрофії альвеолярного відростка, на відміну від рутинного процесу загоєння (Мазур І.П., 2005).

На даному етапі сучасної стоматології ши-

роко використовується пластика кісткових дефектів різними матеріалами (Павленко А.В. и соавт., 2009). Як правило, для цього застосовують матеріали на основі гідроксиапатиту (як біологічного, так і штучного походження), трикальційфосфат, демінералізований кістковий матрикс, ауто-, ало- та гетеротрансплантати і багато інших (Pabbruwe M.V. et al., 2004). При цьому особливу увагу викликає не лише оптимізація процесів репаративного остеогенезу, але і реакція на імплантацію кісткового органу в цілому.

Мета даного дослідження – вивчити в експерименті вплив імплантації матеріалів EasyGraft (ІГ) (Німеччина) и трикальційфосфат (ТКФ) (НПП «Кергап», Україна) у проксимальну метадіафізарну область великогомілкової кістки (ВГК) на гістологічну будову регенерату і губчастої речовини кістки в реактивній зоні.

Матеріали і методи

Область нанесення дефекту була обрана по

таким причинам: з одного боку, альвеолярний відросток нижньої щелепи білих щурів репродуктивного віку має мінімальні розміри, що є перешкодженням для імплантації в нього імплантату достатніх розмірів. З іншого боку, при цьому важко запобігти інфікуванню операційної рани з ротової порожнини. Тому для імплантації була обрана область проксимального метафіза ВГК, що дозволяло виключити вищезазначені недоліки моделювання. Як і альвеолярний відросток щелеп, вона утворена з компактною і з губчастою речовини. Дослідження були проведені на 112 білих щурах з вихідною масою 130-140 г, розподілених на 4 групи. Першу групу склали інтактні тварини (віварний контроль). Друга група – тварини, яким з використанням ефірного масочного наркозу були сформовані наскрізні кісткові дефекти на межі проксимального метафізу та діафізу ВГК діаметром 2,2 мм (Лузин В.И. и соавт., 2005). Оскільки передне-задній розмір ВГК у цій ділянці становить у щурів даного віку в середньому 3,5-3,6 мм, цілісність кісткового органу та функціональне навантаження на нього зберігалися. В третій групі в нанесений дефект імплантували кістково-пластичний матеріал ТКФ, в четвертій – ІГ. Маніпуляції на тваринах виконували відповідно до правил Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальній і інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Для вивчення гістологічної будови регенерату у тварин виділяли та звільняли від м'яких тканин скелет ВГК, після чого вирізали ділянку, що відповідає області нанесеного дефекту, фіксували в 10%-ному розчині нейтрального формаліну, декальцинували 5%-ним розчином мурашиної кислоти, збезводнювали в спиртах зростаючої міцності й заливали в парафін. Готували гістологічні зрізи товщиною 10-12 мкм, які зафарбовували гематоксилін-еозином. Мікроморфометричне дослідження проводили за допомогою 100-крапкової виміральної сітки (Автандилов Г.Г., 1990).

При проведенні статистичної обробки отри-

маних квантифікованих результатів усі необхідні розрахунки виконували при використанні ліцензійної програми STATISTICA (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA).

Результати та їх обговорення

Для оцінки початкового стану кісткової тканини в області нанесеного дефекту було проведено дослідження кісткової речовини в зоні проксимального метафіза ВГК. У тварин першої групи при гістологічному дослідженні в період з 7-го по 60-й день спостереження зона проксимального метафіза ВГК була представлена кортикальною та губчастою кісткою. Кісткові трабекули розташовувались переважно в одному напрямку, уздовж поздовжньої осі кінцівки (рис. 1). Гістоморфометричне дослідження об'ємного вмісту трабекулярної кісткової речовини в метафізарній зоні у тварин цієї групи показало, що цей показник протягом усього періоду спостереження повільно зростав - від $33,32 \pm 0,30$ % до $35,00 \pm 0,72$ % (табл. 1). Це свідчить про збалансованість процесів резорбції та кісткоутворення у щурів репродуктивного віку.

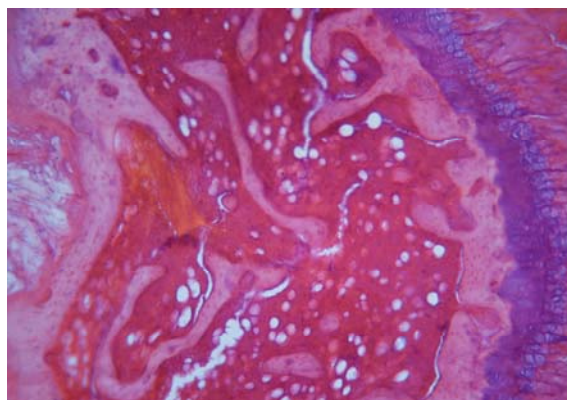


Рис. 1. Трабекулярна кісткова тканина області проксимального метафіза великогомілкової кістки (група 1, 30-й день спостереження). Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 100*.

Таблиця 1
Динаміка об'ємного вмісту трабекулярної кісткової речовини в області проксимального метафіза великогомілкової кістки щурів, % (M±m)

Група	Тривалість експерименту			
	7 днів	15 днів	30 днів	60 днів
1	33,39±0,32	34,19±0,29	34,72±0,44	35,00±0,72
2	23,83±0,37*	25,17±0,63	30,14±0,76*	32,38±0,75*
3	22,64±0,75*	22,39±0,83*^	31,33±0,61*	34,61±0,52^
4	24,78±0,86*	25,08±0,76*#	30,83±0,92*	35,19±0,57^

Примітки:

* - позначає достовірну відмінність від 1-ї групи (p<0,05);

^ - позначає достовірну відмінність від 2-ї групи (p<0,05);

- позначає достовірну відмінність від 3-ї групи (p<0,05).

В другій групі, де пластику сформованого кісткового дефекту не проводили, на 7-й день після операції при гістологічному дослідженні регенерат представлений ретикулофіброзною та грануляційною тканиною з більшою кількістю остеобластичних клітин, визначаються окремі кісткові відломки. На 15-й день кількість ретикулофіброзної тканини зменшується, збільшується площа, зайнята грубоволокнистою кістковою тканиною, формуються скупчення пластинчастої кісткової тканини (рис. 2).

Через 30 днів в зоні дефекту ще визначалися ділянки тканинного детриту, оточені ретикулофіброзною тканиною. По периферії дефекту визначалися колагенові елементи з формуванням мережі кісткових трабекул грубоволокнистої структури. У проміжках між кістковими балками перебуває значна кількість кровоносних судин. У центральних відділах збільшилася кількість ділянок, зайнятих пластинчастою кістковою тканиною (рис. 3). На 60-й день експерименту периферичні відділи дефекту виглядали як чергування кісткових трабекул і кісткового мозку.

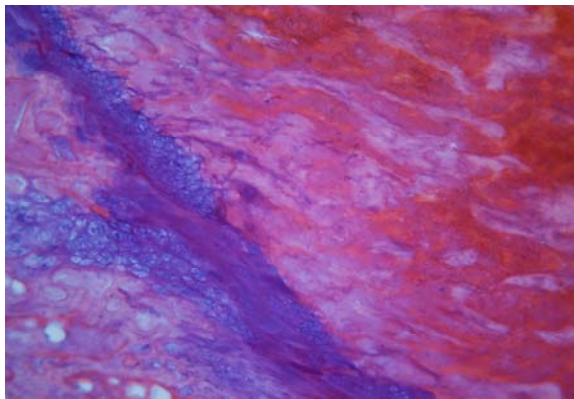


Рис. 2. Формування кісткових трабекул в зоні незаповненого дефекту (група 2, 15-й день спостереження). Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 100 \times .

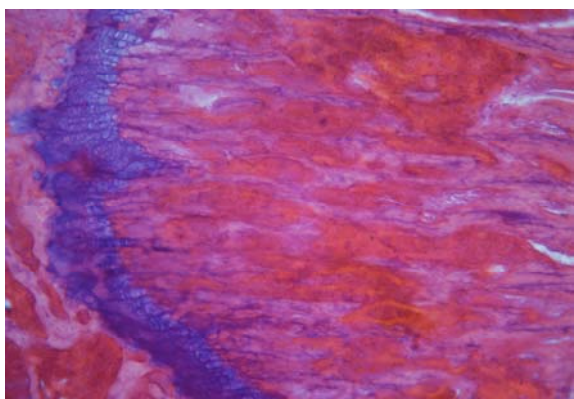


Рис. 3. Репаративний регенерат в зоні незаповненого дефекту (група 2, 30-й день спостереження). Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 100 \times .

У центральних відділах дефект був заповнений кістковим мозком і кістковою тканиною різного ступеня зрілості. Дефект кортикальної пластинки цілком заповнений кістковим регенератом з ознаками перебудови та формуванням остеонних структур (рис. 4). Обсяг трабекулярної кістки в зоні, яка прилягає до дефекту, був менше, ніж аналогічний показник у інтактних тварин (перша група) відповідно до встановлених термінів експерименту на 29,72%, 26,40%, 13,20% і 7,46%. Іншими словами, по мірі збільшення строків після нанесення дефекту об'ємний вміст кісткових трабекул у реактивній зоні поступово наближався до показників інтактних тварин.

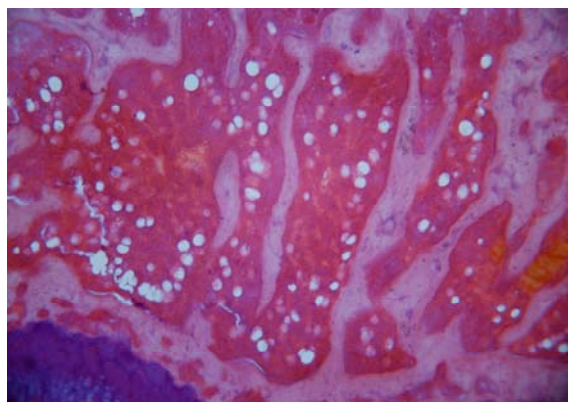


Рис. 4. Сформований регенерат в зоні незаповненого дефекту (група 2, 60-й день спостереження). Фарбування гематоксиліном-еозином. Збільшення 100 \times .

При гістологічному дослідженні регенерату, що формується при заповненні дефекту ТКФ у вигляді порошку (третья група), на 7-й день спостереження визначався дефект, заповнений імплантованим матеріалом з початковими ознаками деградації та проростанням кровоносних судин (рис. 5). Проміжки навколо часток ТКФ заповнені фіброзноретикулярною тканиною, між частками ТКФ і кісткою визначаються ділянки детриту. В області, де імплантат розташовується серед губчастої кісткової речовини, відбувається активне формування новоствореної кісткової тканини.

Через 15 днів спостереження процеси перебудови імплантованого матеріалу більш виразні: визначається складний регенерат, утворений остеогенною тканиною із включеннями великого об'єму часток імплантату (рис. 6). На 30-й день експерименту вся зона дефекту пронизана великими кістковими трабекулами, активно йдуть процеси компактизації кісткової тканини та подальшої біологічної деградації імплантату (рис. 7).

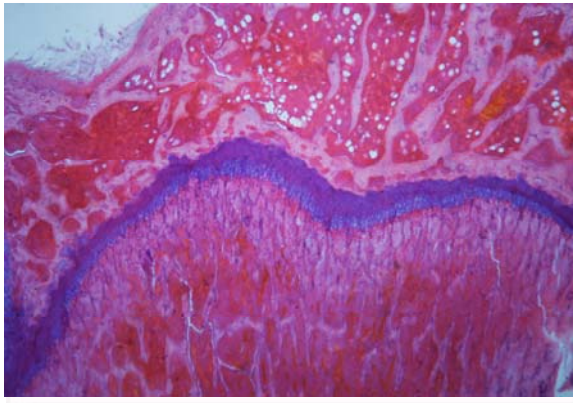


Рис. 5. Кістково-керамічний регенерат, що сформувався при імплантації в кістковий дефект матеріалу ТКФ (група 3, 7-й день спостереження). Фарбування гематоксилином-еозином. Збільшення 40×.

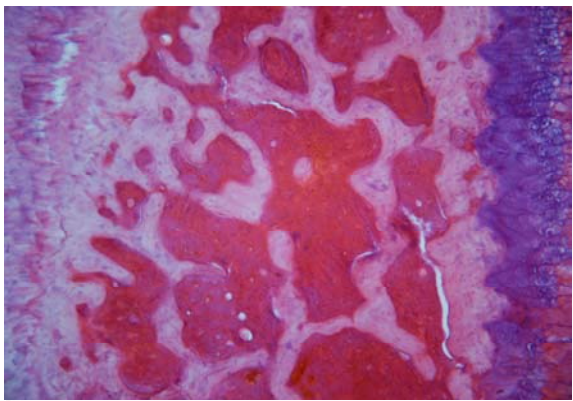


Рис. 6. Кістково-керамічний регенерат, який формується при імплантації в кістковий дефект матеріалу ТКФ (група 3, 15-й день спостереження). Фарбування гематоксилином-еозином. Збільшення 100×.

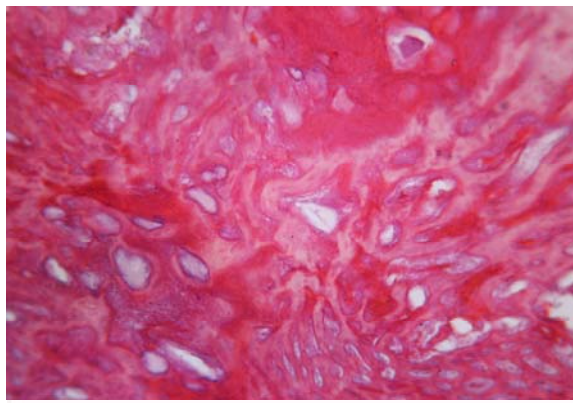


Рис. 7. Кістково-керамічний регенерат, що формується при імплантації в кістковий дефект матеріалу ТКФ (група 3, 30-й день спостереження). Фарбування гематоксилином-еозином. Збільшення 100×.

Через 60 днів більша частка фрагментів імплантату піддана дефрагментації та заміщенню кістковою тканиною. У міжтрабекулярних прос-

торах формуються ділянки, заповнені жовтим кістковим мозком. Між трабекулярною кістковою тканиною і зоною заміщеного дефекту межа практично не спостерігається (рис. 8).

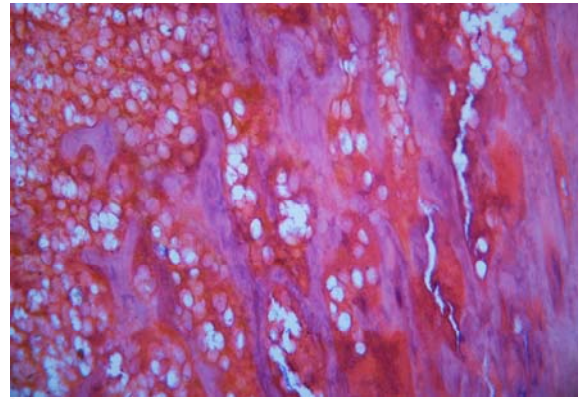


Рис. 8. Кістково-керамічний регенерат, який формується при імплантації в кістковий дефект матеріалу ТКФ (група 3, 60 день спостереження). Фарбування гематоксилином-еозином. Збільшення 100×.

Результати гістоморфометричного дослідження процесів перебудови імплантованого ТКФ підтверджують закономірності, виявлені при оцінці візуальної картини. Індекс остеointegraції (питома щільність ділянок кісткових трабекул, що контактують із частками імплантату) у ході спостереження неухильно збільшувався - від $0,158 \pm 0,002$ у.о. до $0,741 \pm 0,004$ у.о., а площа, зайнята частками ТКФ (тобто показник активності біологічної резорбції), постійно зменшувалася - від $55,75 \pm 0,90\%$ до $24,97 \pm 0,39\%$. Слід зазначити, що найбільш активна динаміка змін відбувалася в період з 15-го по 30-й дні експерименту (табл. 2, 3).

Об'єм трабекулярної кістки в зоні, яка прилягає до дефекту, так само, як і в другій групі, був меншим, ніж аналогічний показник у інтактних тварин (перша група) у період від 7-го до 30 дня експерименту на 32,20%, 34,52% і 9,76% відповідно. На 60-й день достовірні відмінності цього показника від значень першої групи вже не визначалися. Порівняння об'єму трабекулярної кістки зі значеннями другої групи (без імплантації) показало, що в ранній термін (7 і 15 днів) він був меншим за них відповідно на 5,01% ($p > 0,05$) і 11,04%, а на 60-й день вже перевершував їх на 6,86%. Така динаміка об'єму трабекулярної кістки, імовірно, пояснюється тим фактом, що в ранній термін інтенсивність процесів репаративної регенерації та перебудови імплантованого ТКФ вище, ніж у групі без імплантації. У пізній термін (60 днів) у такому випадку, наявність іонів кальцію в зоні імплантації створює сприятливі умови для відновлення трабекулярної кістки в реактивній зоні.

При гістологічному дослідженні регенерату,

що формується при заповненні дефекту матеріалом ІГ (четверта група), динаміка процесів репаративної регенерації, біодеградації імплантату та ремоделяції кістково-керамічного регенерату

якісно не відрізнялася від такої в третій групі. Гістоморфометричне дослідження регенерату при цьому дозволило виявити певні кількісні відхилення.

Таблиця 2
Динаміка індексу інтеграції кісткової тканини з поверхнею імплантату, у.о. (M±m)

Групи	Терміни спостереження			
	7 днів	15 днів	30 днів	60 днів
3	0,158±0,002	0,200±0,001	0,634±0,005	0,741±0,004
4	0,171±0,005*	0,338±0,006*	0,746±0,007*	0,839±0,005*

Примітка: * - позначає достовірну відмінність від групи 3, p<0,05.

Таблиця 3
Динаміка показників площі, зайнятої частками імплантованого матеріалу, % (M±m)

Групи	Терміни спостереження			
	7 днів	15 днів	30 днів	60 днів
3	55,75±0,90	42,72±0,69	30,19±0,66	24,97±0,39
4	55,56±0,72	41,00±0,73	27,72±0,65*	23,14±0,72

Примітка: * - позначає достовірну відмінність від групи 3, p<0,05.

Індекс остеоінтеграції в препаратах четвертої групи тварин в ході спостереження неухильно збільшувався – від 0,171±0,005 у.о. до 0,839±0,005 у.о., а площа, зайнята частками матеріалу ІГ, зменшувалася - від 55,56±0,72% до 23,14±0,72%. Слід зазначити, що так само, як і в третій групі, найбільш активна динаміка абсолютних змін показників була в період з 15-го по 30-й дні експерименту (див. табл. 3.10, 3.11). Порівняння отриманих результатів з показниками третьої групи (імплантація ТКФ) показало, що індекс остеоінтеграції при імплантації ІГ вірогідно перевершував їх в усі встановлені строки експерименту – відповідно на 8,00%, 68,71%, 17,66% і 13,21%. Імовірно, це пояснюється тим, що на відміну від ТКФ матеріал ІГ володіє не тільки остеоіндуктивними, але й остеоіндуктивними властивостями.

Площа, зайнята частками імплантованого матеріалу, була меншою за аналогічні показники третьої групи в період від 15-го до 60-го дня спостереження – відповідно на 4,03% (p>0,05), 8,19% і 7,34% (p>0,05). Обсяг трабекулярної кістки в препаратах четвертої групи в зоні, що прилежить до дефекту, подібно до третьої групи був меншим, ніж аналогічний показник у інтактних тварин (перша група) у період з 7-го по 30-й дні експерименту відповідно на 25,71%, 26,64% і 12,20%. На 60-й день достовірні відмінності цього показника від значень першої групи вже не визначалися. Порівняння об'єму трабекулярної кістки зі значеннями третьої групи (імплантація ТКФ) показало, що в ранній термін (7 і 15 днів) він перевершував їх відповідно на 9,45% (p>0,05) і 12,03%, після чого достовірні відхилення вже не реєструвалися.

Така динаміка об'єму трабекулярної кістки,

імовірно, пояснюється тим фактом, що при імплантації ІГ у зону дефекту в ранній термін спостереження створюються більш сприятливі умови для відновлення трабекулярної кістки в реактивній зоні, ніж при імплантації ТКФ.

Отримані результати свідчать про те, що при імплантації в зону кісткового дефекту матеріалу ІГ як біодеградація імплантованого матеріалу, так і процеси репаративної регенерації проходять активніше, ніж при імплантації ТКФ. З іншого боку, перевага органічного компонента над показниками третьої групи, імовірно, пояснюється тим, що ІГ крім остеоіндуктивних властивостей володіє ще й остеоіндуктивними властивостями.

Висновки

1. За результатами експериментальних досліджень, використання кісткопластичних матеріалів трикальційфосфату® (НБП «Керган», Київ) і "EASY-GRAFT"® (Німеччина) для пластики кісткових дефектів оптимізує процеси репаративної регенерації кістки за рахунок повноцінної біорезорбції, активного зростання остеоінтеграції та ущільнення кісткових трабекул у реактивній зоні з наступним утворенням повноцінної кісткової тканини.

2. Після застосування матеріалу "EASY-GRAFT"® виразність репараційних змін достовірно перевищує відповідні характеристики групи тварин після заміщення експериментального дефекту трикальційфосфатом: за інтенсивністю біорезорбції – на 12-21%, за індексом остеоінтеграції – на 14-27%. Найбільш істотне переважання відзначається з 15-ї до 30-ї доби експериментальної імплантації, тобто у термін найбільш активних регенераторних перетворень кісткової тканини.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні ультраструктурних особливостей процесів репаративної регенерації кістко-

вої тканини в умовах експериментальної остеопластики.

Літературні джерела

Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия : [руководство] / Г. Г. Автандилов. - М. : Медицина, 1990. - 384 с.

Гизатуллин Р. А. Средства для оптимизации остеогенеза в стоматологии: область применения, актуальность проблемы и перспективы разработок и внедрения новых препаратов. // Р. А. Гизатуллин. - М. - 2007. - 152 с.

Грудянов А. И. Заболевания пародонта / А. И. Грудянов. - М. : Медицинское информационное агентство, 2009. - 336 с.

Лузин В. И. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных / В. И. Лузин, Д. В. Ивченко, А. А. Панкратьев [и др.] // Украинський медичний альманах. - 2005. - Т. 8, № 2 (додаток). - С. 162.

Мазур І. П. Структурно-функціональний стан тканини пародонта у людей різного віку та статі / І. П. Мазур // Современная стоматология. - 2005. - № 4. - С. 48-51.

Островский А. Остеогенные материалы в современной пародонтологии и имплантологии / А.

Островский // М. : Азбука - 2005. - 68 с.

Павленко А. В. Лечебно-реабилитационные мероприятия у больных генерализованным пародонтитом / А. В. Павленко, И. П. Мазур // Современная стоматология. - 2003. - № 2. - С. 33-37.

Павленко А. В. Особенности процессов репаративной регенерации в альвеолярных отростках нижней челюсти при пластике дефектов различными материалами / А. В. Павленко, И. В. Чайковская, В. И. Лузин // Украинський морфологічний альманах. - 2009. - Т. 7, № 3. - С. 93-97.

European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. - Strasbourg, 1986. - 52 p.

Pabbruwe M. B. Bone formation within alumina tubes: effect of cal-cium, manganese, and chromium dopants / M. B. Pabbruwe, O. C. Standard, C. C. Sorrell [et al.] // Biomaterials. - 2004. - Vol. 25. - P. 4901.

Павленко А.В., Дмитриева Э.А., Лузин В.И. Гистологическое строение регенерата при заполнении костного дефекта материалами EasyGraft и трикальцийфосфатом.

Резюме. В эксперименте на 112 белых крысах исследовали влияние имплантации материалов EasyGraft и трикальцийфосфата в проксимальную метадиафизарную область большеберцовой кости на гистологическое строение формирующегося регенерата и губчатой кости в реактивной зоне. Установлено, что пластика костных дефектов с помощью данных материалов сопровождается их биорезорбцией и оказывает оптимизирующее влияние на процессы репаративной регенерации кости. Это сопровождается снижением удельной площади имплантированных частиц, возрастанием индекса остеointеграции и удельной плотности трабекул в реактивной зоне. Наибольшая активность выявленных процессов наблюдается в период с 15-го по 30-й день после имплантации. Применение EasyGraft более предпочтительно, чем использование трикальцийфосфата.

Ключевые слова: костный дефект, репаративная регенерация кости, трикальцийфосфат, EasyGraft.