

УДК 616.379-008.64:612.015

Вовк В.Ю.,¹ Вовк Ю.В.^{1, 2}, Дельцова О.І.³

¹Львівський національний медичний університет
ім. Данила Галицького, студент V курсу стоматологічного
факультету

¹Львівський національний медичний університет
ім. Данила Галицького,
каф. хірургічної та ортопедичної стоматології факультету
післядипломної освіти
(зав. – проф. Ю.В. Вовк)

²Медичний стоматологічний центр «Біоімплант-сервіс»
(ген. директор – проф. Ю.В. Вовк)

³Івано-Франківська медична академія,
каф. гістології (зав. – проф. О.І. Дельцова)

V.Y. Vovk, Y.V. Vovk, O.I. Deltsova

Експериментальне вивчення репаративного остеогенезу кісткових дефектів, заповнених кальцій- фосфатними біоматеріалами у поєднанні зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові

Experimental Study of Reparative Osteogenesis of Bone Defects, Filled of the Calcium-Phosphate Biomaterials Combined with Platelet Rich Plasma

Резюме

У статті розглядається проблема відновлення кістковотканинної неперервності тканин, зокрема у випадках кістковотканинних дефектів зі слабкими регенераційними здатностями. Для загоювання кісткової тканини застосували остеопластичний біоматеріал Calcibone® («Biomat Europa», Німеччина), синтезований на основі кальцій-фосфатних сполук шляхом гранулювання з досягненням мікро- та макропористості у поєднанні зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові (ЗТПК) – автологічне джерело факторів росту та розвитку тканин. Вивчали особливості кісткової регенерації експериментально створених кісткових дефектів піддослідних тварин при поєднаному застосуванні кальцій-фосфатного біоматеріалу Calcibone® та ЗТПК.

При змішуванні Calcibone® зі ЗТПК досліджувані тканинні сегменти дефектів, заповнені кальцій-фосфатними гранулами, статистично достовірно зменшуються та заміщуються новосформованою кістковою тканиною вже на 4 тижні спостереження. Це підтверджується макроскопічно, рентгенологічним дослідженням щільності кісткової тканини, гістологічно та гістоморфометрично. У дефектах, заповнених виключно кальцій-фосфатними гранулами Calcibone®, сформовані площі тканин поступово зменшуються лише на 10 тижні спостереження.

Встановлено, що поєднане введення в експериментально створені кісткові дефекти остеопластичного кальцій-фосфатного біоматеріалу Calcibone® сумісно зі ЗТПК прискорює його абсорбцію та біодеградацію з безпосереднім заміщенням цих ділянок сформованою кістковою тканиною, що прирівнюється до остеопродукційної ефективності автокісткового трансплантата.

Summary

The important issue of the modern transplantology and implantology is the regeneration of the bone-tissue continuity of the tissues. This problem is of most importance in case of bone-tissue defects with weak regeneration abilities. In these cases for healing of the bone tissue we used the up-to-date osteoplastic biomaterial Calcibone® (Biomet Europa, Germany), which was synthesized on the base of the calcium-phosphate compounds with the help of granulation for receiving micro- and macroporosity combined with platelet-enriched blood plasma (PRP) – autological source of factors for growth and development of the tissue. The target of the research is the study of peculiarities of bone regeneration of experimentally made bone defects of laboratory animals with combined application of calcium-phosphate biomaterial Calcibone® and platelet-enriched blood plasma (PRP).

When Calcibone® is mixed with platelet-enriched blood plasma (PRP), the investigated tissue segments of the defects, filled with calcium-phosphate, diminish statistically and become replaced by the newly developed bone tissue already on the fourth week of the investigation. This is proved by the microscope, with X-ray examination of the thickness of bone tissue, and also histologically and histomorphometrically. The created segments of tissues on the defects, filled only with calcium-phosphate granules Calcibone®, diminish step-by-step only on the 10th week of the investigation.

So it is stated, that the filling of the experimentally created bone defects with the modern osteoplastic calcium-phosphate biomaterial Calcibone® together with the platelet-enriched blood plasma, speeds up its absorption and biodegradation with the immediate substitution of these segments with the formed bone tissue, what is compared to the osteoproduative effectiveness of autobone transplant.

Ключові слова

кісткові дефекти, кальцій-фосфатні біоматеріали, збагачена тромбоцитами плазма крові, репаративний остеогенез

Key words

bone defects, calcium-phosphate biomaterials, platelet-enriched blood plasma, repair osteogenesis

Вступ

Кісткова тканина, яка складається з клітин і мінералізованої міжклітинної речовини, поновлюється внаслідок безперервних процесів резорбції старої та формування нової кістки. Даний феномен має циклічний перебіг і складається з окремих процесів, тривалість яких у кролів – 6, у собак – 12, у людей – 17 тижнів (Roberts W.E. et co-work., 1992). При цьому ділянки кісткоформування чергуються з ділянками резорбції, в яких остеокласти призводять до біодеградації мінерального компонента кістки. При порушенні цього процесу можливе утворення кісткових дефектів (Vovk Yu., Vovk V., Deltzova O., 2006). Логічно, що для відновлення кістково-тканинної структури найкраще підходять трансплантати, які містять кальцій-фосфатні сполуки (Elizabeth P. et co-work., 1998; Ewers R. et co-work., 2004). Це й обумовило наші дослідження, суть яких полягала у застосуванні кальцій-фосфатного біоматеріалу, який структурно близький до макроскопічної будови кістки та поєднує в своєму складі її основні мінеральні компоненти (Nieldhardt C. et co-work., 2001; Ooms E. M. et co-work., 2002). Тканинна біосумісність кальцій-фосфатних біоматеріалів залежить не лише від їх остеоіндуктивних властивостей, але й від

кальцій-фосфатного коефіцієнта. Для остеопластики кісткових дефектів використовуються декілька різновидів кальцій-фосфатних мінеральних сполук, які застосовуються в медичній і, зокрема, в стоматологічній практиці (Comuzzi L. et co-work., 2002; Вовк В.Ю., 2007), і відрізняються кальцій-фосфатним коефіцієнтом, найвище значення якого спостерігається у гідроксиапатиту та трикальційфосфату (Misch C.E., 1999).

Поєднання кальцій-фосфатних сполук з високим кальцій-фосфатним коефіцієнтом в одному препараті, повинно максимально сприяти відновленню пошкодженого при кісткових дефектах і деформаціях неорганічного кісткового матриксу. Такий препарат Calcibone® синтезовано німецьким медичним концерном «Biomet Europa». Біоматеріал Calcibone® – це гранули розміром 2-4 мм, з макро- та мікропорами, біохімічна композиція та нанокристалічна структура яких еквівалентна кальцій-фосфатному компоненту природної кістки. Препарат Calcibone® складається з α -трикальційфосфату (α -TCP), кальцію гідрогенфосфату (CaHPO_4), кальцію карбонату (CaCO_3) та перципітованого гідроксиапатиту (HA). Застосування Calcibone® в травматології та ортопедії при кісткових дефектах докладно досліджене (Ooms E.M. et co-



Мал. 1. Забір крові з вушної вени кроля (а) та депонування крові у пробірку (б)



Мал. 2. Сепарація центрифугованої крові на три шари: верхній шар – плазма крові, збіднена на формені елементи; проміжний шар – плазма крові, збагачена тромбоцитами; нижній шар – еритроцити крові

work., 2003; Schnettler R. et co-work., 2004). Однак, проведеними науково-практичними роботами встановлено, що при застосуванні біоматеріалу Calcibone® резорбція його кальцій-фосфатних складових переважає над апозицією новоутвореної кісткової тканини, що призводить до формування неповноцінної волокнистої кістки з її подальшою дезінтеграцією в ході remodelювання (Yuan H. et co-work., 2000; Heymann D. et co-work., 2001; Robert O. et co-work., 2004). Для гальмування процесу резорбції кальцій-фосфатних складових кістки відомий біологічний спосіб застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові (ЗТПК) – (Marx R.E., 2001; Carlson N.E., 2002; Babbush S.A., et co-work., 2003). При її активації спостерігається виділення з α -гранул тромбоцитів так званих факторів росту, які спричинюють біоактивний вплив на процеси регенерації, стимулюючи ангиогенез, покращуючи епітелізацію ран м'яких тканин та прискорюючи метаболізм кісткових клітин (Vanassche B. et co-work., 2001; Saba A.A. et co-work., 2002; Fickova M. 2002; Oprea W.E., 2003; Okuda K. et co-work., 2003; Lucarelli E. et co-work., 2003; Weibrich G. et co-work., 2002). Однак, на сьогодні дискусійними є ряд питань впливу ЗТПК на обмін у кістковій тканині та стан кальцій-фосфатних

біоматеріалів, що застосовуються для реконструкції кісткової тканини (Lekovic V. et co-work., 2002; Robiony M. et co-work. 2002; Sanchez A.R. et co-work., 2003; Wojtowicz A. et co-work., 2003; Wiltfang J. et co-work., 2003; Zechner W. et co-work., 2003; Huse R.O. et co-work., 2004; Casati M.Z. et co-work., 2007).

У зв'язку з цим нашою метою було дослідити особливості репаративного остеогенезу кісткових дефектів при їх заповненні кальцій-фосфатним біоматеріалом Calcibone® у поєднанні зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові.

Матеріал та методи дослідження

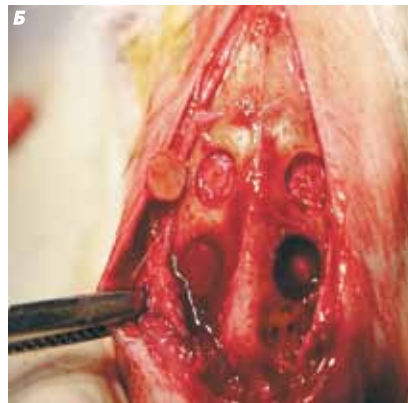
Експериментальні дослідження проведено у 9 кролів породи «білий велетень» у віварії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького. Утримання тварин у віварії та втручання проводилось відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Після введення тварин у кетаміновий наркоз з вушної вени отримували венозну кров, яку депонували у дві пробірки з півмілілітром антикоагулянту (мал. 1). Найдоступнішою і найпростішою для застосування на практиці методикою отримання ЗТПК є забір венозної крові, послідовне центрифугування, ресуспензія прошарку плазми збагаченої тромбоцитами, активація і поєднане застосування з кальцій-фосфатним біоматеріалом для заповнення кісткових дефектів (Weibrich G., Hitzler W.E., 2002; Weibrich G. et co-work., 2001);. Пробірки центрифугували, сепаруючи кров на верхній шар із плазми, збідненої на формені елементи; проміжний шар, збагачений тромбоцитами та лейкоцитами, і нижній шар, збагачений еритроцитами (мал.2).

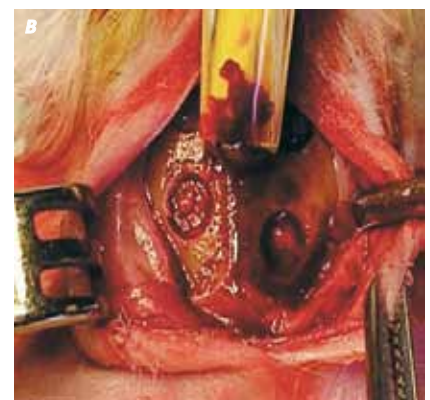
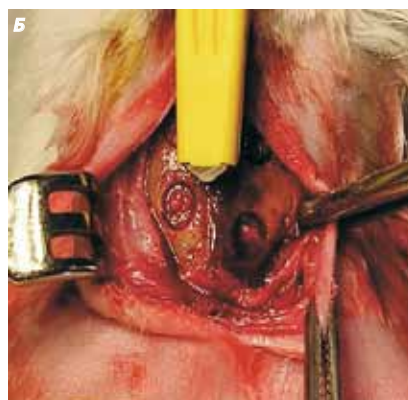
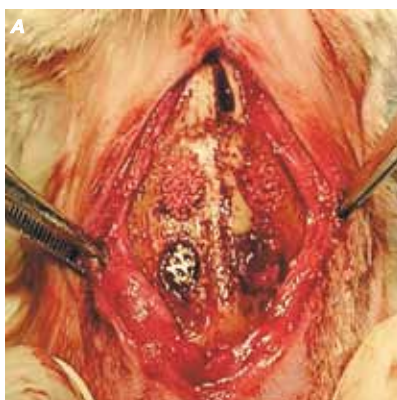
Після видалення збідненої плазми, залишок проміжного шару та концентрат еритроцитів повторно центрифугували, і надалі активували до отримання гелю з концентрованою кількістю тромбоцитів згідно з методикою Landsberg R. et co-work., 2000 (мал. 3). Усім кролям на поверхні тім'яної кістки трепанами, механічно та вручну (Вовк В.Ю., 2006), створювали чотири кругових дефекти діаметром 6 мм, відповід-



Мал.3. Згусток проміжного шару з концентрованою кількістю активованих тромбоцитів



Мал.4. Створення кругових дефектів на поверхні тім'яної кістки піддослідної тварини (а), видалення кісткової тканини з формуванням кісткових дефектів; (б) відмежування твердої мозкової оболонки за допомогою титанової мікросітки (в)



Мал.5. Виповнення дефектів CalciBone®, CalciBone® зі ЗТПК (а), автокісткою (б) та (в) – контрольний пустий дефект

но до анатомічних особливостей будови черепа кроля (Жеденов В.Н., 1957). Тварин виводили з експерименту відповідно впродовж першого (перша піддослідна група), другого (друга піддослідна група) та третього (третья піддослідна група) місяців після втручання шляхом передозування кетаміну. Отриманий фрагмент тім'яної кістки з кістковими дефектами підлягав макроскопічному досліджен-

ню. Кісткову тканину акуратно підважували елеватором і видаляли з дефектів та надалі подрібнювали кістковими кусачками на дрібні частинки. З метою попередження проникання дрібних частинок кальцій фосфатного біоматеріалу на тверду мозкову оболонку, дно кісткового дефекту виповнювали титановою мікросіткою товщиною 0,1 мм («Mondeal», Німеччина), згідно з запропонованою



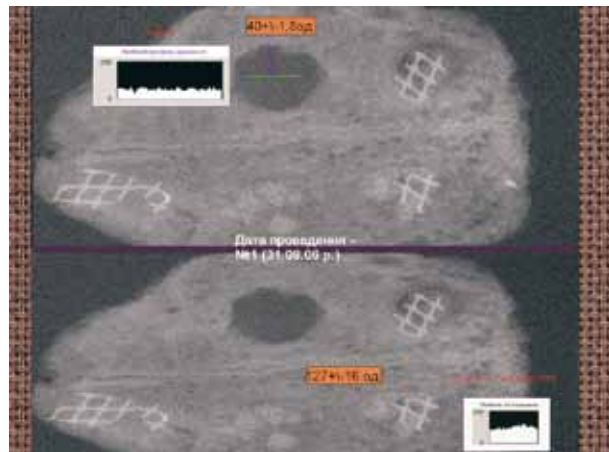
Мал.6. Вигляд препарату для подальшої цифрової рентгенографії тканинних структур у ділянках створених дефектів



Мал.7. Схема проведення експериментальних досліджень у піддослідних тварин



Мал.8. Макроскопічний вигляд стану дефектів тім'яної кістки піддослідної тварини першої групи



Мал.9. Рентгенограми тім'яної кістки піддослідної тварини: а – щільність кістки в незаповненому кістковому дефекті; б – щільність регенерату у верхньому полюсі кісткового дефекту, виповненого гранулами Calcibone® та ЗТПК

методикою (Вовк В.Ю., Дельцова О.І.) – (мал.4). Після цього утворені кісткові дефекти виповнювали кальцій-фосфатним біоматеріалом Calcibone® та кальцій-фосфатним біоматеріалом Calcibone® у поєднанні зі ЗТПК. Контролем слугували пустий дефект та дефект, виповнений подрібненою автокісткою (мал. 5).

Після цього проводили рентгенографію отриманих кісткових фрагментів за допомогою радіофізіографа Intra («Planmeca», Фінляндія) – (мал.6). На підставі отриманих цифрових рентгенограм проводили оцінку стану дефекту, наявності трансплантата в ньому, особливостей виповнення ним дефекту, а також визначали ступінь щільності кісткової тканини за методикою Jacobs R, Van Steenberghe D., 1998.

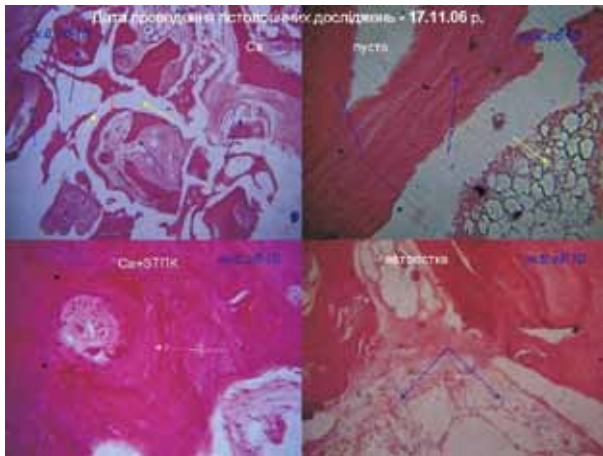
Після макроскопічно-рентгенологічних досліджень кістковий фрагмент фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну. На наступному етапі декальцинували за методикою Віленсона (Меркулов Г. Г., 1969). Шматочки поміщали в парафін. З кістки щелепи робили серійні мікротомні зрізи товщиною 10-15 мкм (до 100-200 зрізів з кожної), які оглядали під світловим мікроскопом при збільшенні від 10*20 до 10*40 разів. Морфометричні дослідження проводили за допомогою аналізатора зображень і спеціально адаптованої до морфометрії програми для

персонального комп'ютера (UTHSCSA Image Tool® for Windows).

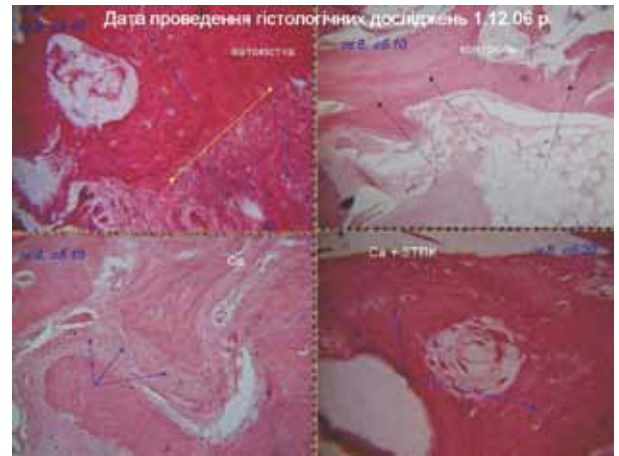
Застосовані методики досліджень у піддослідних тварин у динаміці тримісячного спостереження дозволили створити цілісну схему експерименту (мал. 7). Статистичний аналіз отриманих цифрових значень здійснювався за допомогою параметричного критерію Ст'юдента при порозі достовірності отриманих результатів понад 95 %.

Результати дослідження та їх обговорення

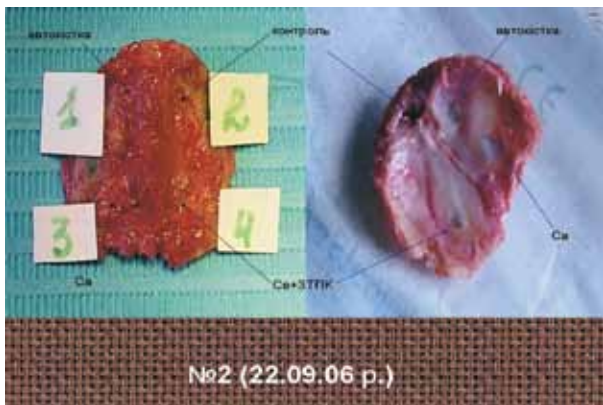
Спираючись на вибрані та опрацьовані методики дослідження, нами досліджувались процеси репаративного остеогенезу кісткових дефектів тім'яних кісток у піддослідних тварин кролів впродовж запланованих термінів дослідження від 24.07.-25.07.06 р. до 31.08.06 р. (1 місяць), до 22.09.06 р. (2 місяць), до 26.10.06 р. (3 місяць). Вивчалися особливості тканинної будови регенерату при заповненні кісткових дефектів кальцій-фосфатним біоматеріалом Calcibone® окремо, кальцій-фосфатним біоматеріалом Calcibone® у поєднанні зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові. Контролем слугували дефекти, виповнені автокісткою та незаповнені дефекти.



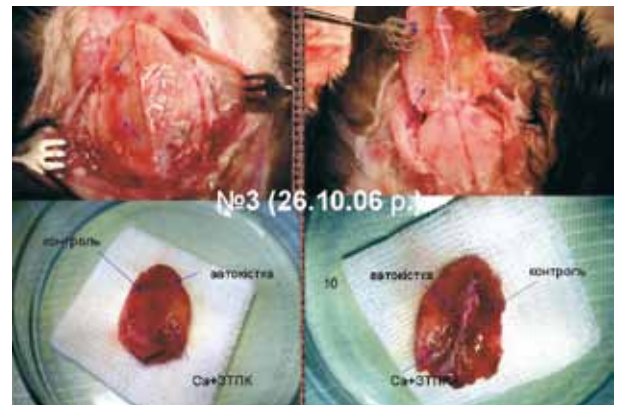
Мал.10. Характерні риси гістологічної картини тканинних утворень в дефектах, заповнених біоматеріалами, і в контрольних дефектах



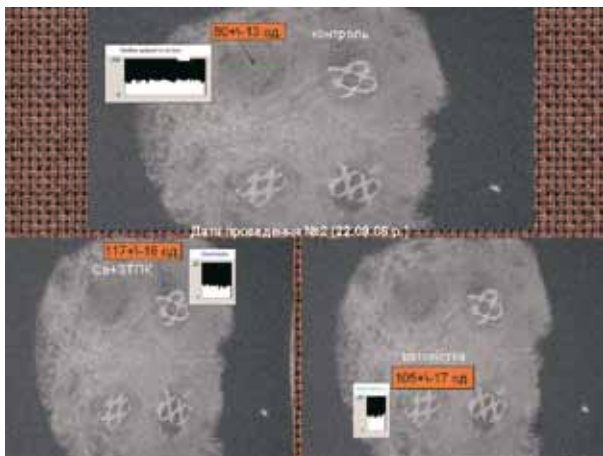
Мал.13. Гістологічні препарати ділянок кісткових дефектів, заповнених остеопластичними біоматеріалами, та в контролі



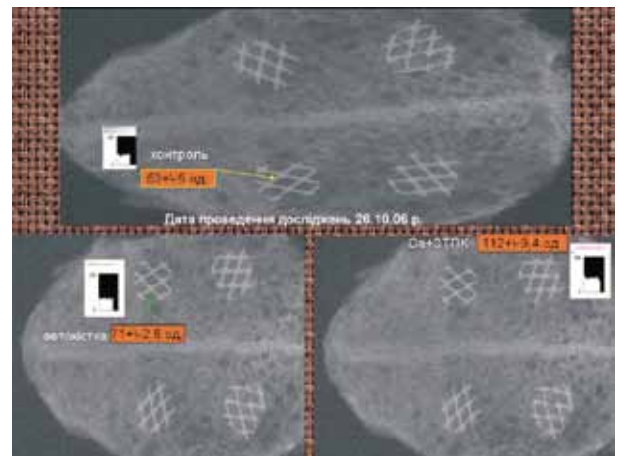
Мал.11. Макроскопічна картина кісткових дефектів тім'яної кістки піддослідної тварини другої групи



Мал.14. Макроскопічний вигляд препаратів тім'яної кістки кроля третьої піддослідної групи на момент аутопсії



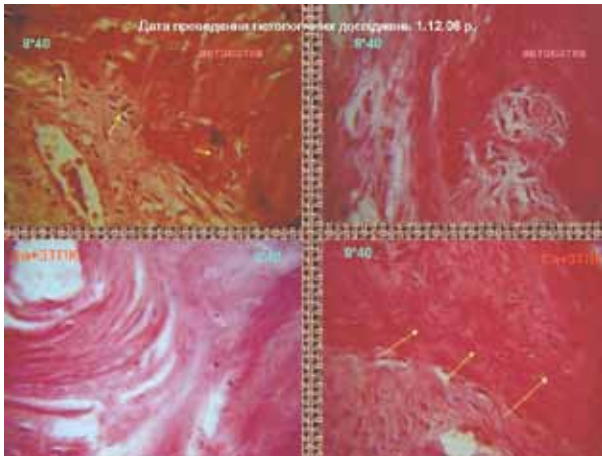
Мал.12. Рентгенографія тім'яної кістки кроля другої експериментальної групи з показниками щільності в досліджуваних ділянках дефектів



Мал.15. Рентгенологічні дані щільності тканин в експериментально створених дефектах на третьому місяці спостереження

Після аутопсії тім'яних кісток піддослідних тварин 1 групи проведено макроскопічне дослідження стану тканин у ділянках створених дефектів. Візуально встановлено, що в 4 дефектах спостерігається м'якотканинний регенерат з включеннями часточок кальцієвмісного біоматеріалу (мал. 8). У контрольних дефектах спостерігалися м'якотканинні утвори, що виступали над кістковою поверхнею. У дефекті, заповненому лише кальцієвмісним біоматеріалом, виявлено

розшарований неоднорідний м'якотканинний прошарок з дезінтегрованими гранулами препарату, що виїшли за межі дефекту разом з опорною титановою мікросіткою. В дефектах, виповнених кальцієвмісним біоматеріалом сумісно зі ЗТПК та автокісткою виявлено щільне об'єднання регенерату з титановою мікросіткою (мал. 8). При рентгенологічному дослідженні встановлено стан загоєння кісткових дефектів (мал. 9). Виявлено, що



Мал. 16. Гістологічні препарати, отримані в ділянках кісткотканинного формування та перебудови у кроля третьої групи

щільність тканинного регенерату є найвищою в дефекті, що виповнений кальцієвмісним біоматеріалом та ЗТПК і становить 127 ± 16 одиниць, у контрольному (пустому) дефекті – $40,0 \pm 1,8$ одиниць ($p < 0,01$). При гістологічному аналізі препаратів у дефекті, виповненому кальцієвмісним препаратом у поєднанні з ЗТПК, виявлено узагальнену закономірність – початок формування кісткової тканини пластинкової структури (мал. 10 – Ca+ЗТПК). У дефекті, виповненому автокісткою, спостерігаються широкі пасма грубоволокнистої кістки, які вплітаються в оточуючу стару кістку (мал. 10 – автокістка). У дефекті, виповненому лише кальцієвмісним біоматеріалом, поодинокі острівці грубоволокнистої молоді кісткової тканини поміж ділянками резорбованого Calcibone® (мал. 10 – Ca). У контрольному дефекті – острівцеве формування фрагментів сполучної тканини (мал. 10 – пусто).

При гістоморфометрії тканинного регенерату в досліджуваних дефектах виявлено домінування сполучної тканини і незначні площі, утворені грубоволокнистою кістковою тканиною. Виняток становив стан тканинного регенерату у дефекті, виповненому Calcibone® зі ЗТПК, де виявлено поряд з домінуванням грубоволокнистої кісткової тканини ($58,12 \pm 0,35\%$) незначні ($11,12 \pm 0,07\%$) ділянки новоутвореної кісткової тканини компактної структури (табл. 1). Результати комплексного аналізу та оцінки експериментального матеріалу піддослідних тварин першої групи дозволяють однозначно стверджувати, що при застосуванні кальцієвмісного біоматеріалу Calcibone® зі ЗТПК настає

пришвидшене формування кісткової тканини вже на 1 місяці дослідження.

Друга група піддослідних тварин була виведена з експерименту на 61 день дослідження 22. 09. 2006 року. При аутопсії тім'яної кістки кролів та макроскопічному дослідженні встановлено щільне зрощення тканинного регенерату з краями кісткових дефектів. Однак, найвищий рівень кісткового заміщення виявлено в дефекті, виповненому кальцієвмісним біоматеріалом у поєднанні зі ЗТПК (мал. 11).

При рентгенологічному дослідженні встановлено поступове заміщення центральних та периферичних відділів дефектів рентгеноконтрастним тканинним регенератом, що вказує на посилення процесів органотипової перебудови в місцях порожнистих кісткових утворень. Встановлено, що найбільша тканинна щільність спостерігається в дефекті, виповненому кальцій-фосфатним біоматеріалом сумісно зі ЗТПК (117 ± 16 од.) та автокістковим трансплантатом (105 ± 17 од.). Цей показник дещо менший порівняно з попереднім місяцем аналізу, що пояснюється поступовою резорбцією біоматеріалу (мал. 12).

При гістологічному обстеженні препаратів встановлено, що в дефекті, виповненому кальцій-фосфатним біоматеріалом у поєднанні зі ЗТПК спостерігається формування остеонної структури регенерату (мал. 13 – Ca+ЗТПК). Повсюди спостерігаються ділянки створення компактної кістки. У дефекті, виповненому автокісткою, виявлено з'єднання периферичного шару кісткової тканини ланцюжками остеобластів з новоутвореною грубоволокнистою кісткою (мал. 13 – автокістка). У дефекті, виповненому лише Calcibone® поміж домінуючою сполучною тканиною розпочинають формуватися острівці незрілої молоді кісткової тканини (мал. 13-Ca), у контрольному дефекті – розростання сполучної тканини (мал. 13 – контроль).

При морфологічному дослідженні тканинних регенератів у піддослідних тварин другої групи встановлено, що в дефектах, виповнених Calcibone® та автокісткою, домінує сполучна тканина (відповідно $71,8 \pm 0,49\%$ та $22,57 \pm 0,56\%$). У дефекті, де застосовували Calcibone®, виявлено незначні за площею ($1,96 \pm 0,04\%$) ділянки новоутвореної зрілої кісткової тканини остеонної структури. Лише в дефекті, виповненому Calcibone® зі ЗТПК, виявлено достовірне, порівняно з першим місяцем спостереження, зростання площі компактної кістки до $23,8 \pm 0,15\%$ при сталому значенні площі грубоволокнистої кістки ($44,36 \pm 0,69\%$) та зменшенні площі сполучної тканини $26,8 \pm 0,68$ ($p < 0,05$). У цьому дефекті виявлено також розширен-

Табл. 1. Процентне співвідношення новоутворених тканин у дефектах кістки, виповнених біоматеріалами та у контролі у піддослідних тварин (термін спостереження 37 днів)

Показник морфологічних досліджень	Вид експерименту			
	контроль	автокісткова тканина	Calcibone®	Calcibone®±ЗТПК
Площа сполучної тканини	100,0	87,13±0,22	81,06±0,87	30,76±0,29*
Площа грубоволокнистої кістки	–	12,87±0,05	18,94±0,14	58,12±0,35*
Площа компактної кістки	–	–	–	11,12±0,07*

* – показник статистично достовірний ($p < 0,01$), порівняно з даними попереднього експерименту

ня площ поміж новоутвореними тканинами до $5,04 \pm 0,2 \%$, що вказує на тканинноспецифічні процеси відбудови кісткової тканини (табл. 2.)

Отже, на другому місяці спостереження в дефекті, виповненому кальцій-фосфатним біоматеріалом зі ЗТПК, відбуваються процеси тотального формування компактною кістки пластинчастої структури з чітко окресленою остеонною архітектонікою підвищеної мінералізації та щільності.

Згідно з протоколом експериментального дослідження, піддослідні тварини третьої групи були виведені з експерименту 26.10.2006 року (на 94 день від першопочаткового втручання). При аутопсії тім'яної кістки виявлено, що у дефектах, де застосовували для заповнення порожнини Calcibone® у поєднанні зі ЗТПК та в дефекті, виповненому автокісткою, виявлено твердотканинну структуру регенерату. Причому ця органолептична характеристика новоутвореної тканини спостерігається як в периферичних, так і в центральних ділянках дефектів, а також у верхніх та нижніх шарах регенерату. При виготовленні гістологічних препаратів виникли значні труднощі при відшаруванні опорної мікросітки. Подекуди взагалі було неможливо відділити її з обох боків дефектів, оскільки вона повністю зрослася з кістковою тканиною (мал. 14).

При рентгенологічному дослідженні у тварин третьої групи виявлено, що ступінь щільності регенерату в місці застосування кальцієвмісного біоматеріалу зі ЗТПК практично не змінилася, порівняно з другим місяцем спостереження, що вказує на стабілізацію процесів кісткоформування в цьому дефекті. На противагу, дефект, виповнений аутоотрансплантатом, має пониження щільності до $71 \pm 2,8$ од., що в 1,5 раза менше, порівняно з попереднім місяцем і вказує на активність процесів кістковотканинної перебудови (мал. 15).

При гістологічному дослідженні тканинних утворень виявлено, що як при застосуванні автокісткового трансплантата, так і кальцій-фосфатного біоматеріалу насиченого ЗТПК, спостерігається повсюдне утворення компактною кістковою тканиною остеонної структури. Причому, в обох випадках застосування остеопластики спостерігаються ділянки резорбції старої кісткової тканини із ознаками її ремоделюванням (жовті стрілки) та ділянки новоутвореної молодшої кісткової тканини (мал. 16). Це засвідчує спорідненість і, певною мірою, тотожність регенераційного потенціалу Calcibone® зі ЗТПК з автокістковим трансплантатом.

При морфометричному дослідженні субстратів тканинного регенерату у піддослідної тварини третьої групи встановлено, що при застосуванні кальцій-фосфатного біоматеріалу у поєднанні зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові, площа компактною кістковою тканиною сягає $43,67 \pm 0,36 \%$, тоді, як при застосуванні автокістки лише $27,59 \pm 0,11 \%$. Відповідно, площа грубоволокнистою кісткою становить $42,61 \pm 0,79 \%$ та $18,45 \pm 0,62 \%$. Значно зменшується дольова участь в регенераційному утворенні сполучною тканиною. Зокрема, в дефекті, заповненому Calcibone® + ЗТПК, її площа зменшується до $13,74 \pm 0,22 \%$, а в дефекті, виповненому автокісткою – $53,96 \pm 0,87 \%$. Цікавими для аналізу виявилися результати встановлення площ порожнин поміж ділянками неоморфогенезу тканин. З'ясовано, що площа порожнин між новоутвореними тканинами при застосуванні обох препаратів незначно відрізняється одна від одної (табл. 3.)

Отже, результати тримісячного динамічного комплексного спостереження кісткових дефектів, виповнених остеопластичними біоматеріалами, засвідчують, що кальцій-фосфатний біоматеріал Calcibone® у поєднанні зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові спричиняє прискорене формування повноцінної за структурою зрілою кістковою тканиною, що засвідчує остеопродуктивні властивості цього біоматеріалу і прирівнює цю композицію за її здатністю відновлювати порожнисті кісткові дефекти до автокісткового трансплантата.

Висновки

1. Створена модель експериментального дослідження тканинної регенерації кісткових дефектів, у якій ділянці остеопластики відділяють титановою мікросіткою. З'ясовано, що дефекти тім'яної кістки не можуть загоїтися самостійно, без участі остеотропних біоматеріалів або кісткових трансплантатів.
2. Для достовірної і всесторонньої оцінки динаміки регенераційних процесів кістковою тканиною доцільно досліджувати макроскопічні, рентгенологічні, гістологічні та морфометричні показники. При проведенні цифровою рентгенографії слід аналізувати щільність утвореного в дефектах осередку тканинної регенерації.
3. Збагачена тромбоцитами плазма крові додана до кальцій-фосфатного біоматеріалу Calcibone® спричиняє прискорене формування зрілою кістковою тканиною

Табл.2. Процентне співвідношення новоутворених тканин у дефектах кістки, виповнених біоматеріалами та у контролі у піддослідних тварин (термін спостереження 61 день)

Показник морфологічних досліджень	Вид експерименту			
	контроль	автокісткова тканина	Calcibone®	Calcibone®±ЗТПК
Площа сполучною тканиною	100,0	74,96±0,70	71,80±0,58	26,80±0,68*
Площа грубоволокнистою кісткою	–	22,27±0,56	23,87±0,49	44,36±0,69*
Площа компактною кісткою	–	–	1,96±0,04	23,80±0,15*
Площа порожнини між новоутвореними тканинами	–	2,77±0,26	2,37±0,18	5,04±0,20*

* – показник статистично достовірний ($p < 0,05$), порівняно з даними попереднього експерименту

порожнистих кісткових дефектах, що обґрунтовує його остеоіндуктивні властивості.

4. Темпи кісткоутворення при остеопластичі дефектів за участю кальцій-фосфатного носія та ЗТПК на 1 місяць швидші, ніж у ділянках, де застосовували тільки кальцій-фосфатний біоматеріал.

5. Результати експериментального дослідження дають підстави рекомендувати кальцій-фосфатний біоматеріал зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові для трансплантації у кісткові дефекти, які характеризуються слабким остеорегенеративним потенціалом.

Література

1. Вовк В. Морфологічні особливості адаптації кісткової тканини при функціональному навантаженні // 66-а наукова конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Досягнення сучасної медицини». Львів, 2005, с. 35-36.
2. Вовк В. Ю. Вплив препарування кісткової тканини на репаративний остеогенез в експериментально створених дефектах щелеп, заповнених біоматеріалами. // 67-ма Студентська наукова конференція з міжнародною участю «Досягнення сучасної медицини». Львів – 2006. - с. 10.
3. Вовк Ю. В., Вовк В. Ю. Вплив препарування кісткової тканини на репаративний остеогенез в експериментально створених дефектах щелеп, заповнених біоматеріалами. // Другий Український міжнародний конгрес «Стоматологічна імплантологія. Остеоінтеграція», Київ – 2006, с. 53 – 54.
4. Вовк В. Ю., Дельцова О. І. Особливості стимульованого морфогенезу в періімплантних кісткових дефектах при використанні кальцій-фосфатного біоматеріалу. Третя східноєвропейська конференція з проблем стоматологічної імплантації. Львів, 29 – 31 березня 2007, с. - 76.
5. Вовк В. Ю. Результати експериментального вивчення регенерації кісткової тканини при дефектах черепа, заповнених кальцій-фосфатним біоматеріалом в поєднанні зі збагаченою тромбоцитами плазмою крові // 68-ма студентська наукова конференція з міжнародною участю, Львів – 2007. с. - 100.
6. Дельцова О. І., Чайковський Ю. Б., Герашенко С. Б. Гістологія та ембріогенез органів ротової порожнини. – Івано-Франківськ: Галицький тракт, 1999, с. 62 – 63, с. 72 – 73.
7. Жеденов В. Н. Анатомія кролика. – М.: Сов. наука, 1957, с. 31 – 41, с. 225 – 227.
8. Луцик О. Д., Іванова А. Й., Кабак К. С. Гістологія людини. – Львів: Мир, 1992, с. 98 – 105.
9. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники. Л.: Медицина, 1969, – с. 33.
10. Ewers R., Goriwoda W., Schopper Ch., Moser D., Spassova E. Histologic findings of augmented bone areas supplied with two different bone substitute materials combined with sinus floor lifting // Clin. Oral Impl. Res., 2004, № 2, v. 15, p. 96 – 100.
11. Ooms E. M., Wolke J. G. C., van der Waerden J. P. C., Jonsen I. A.

- Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca – P) cement // Jour. Biomed Mater. Res, 2002, v. 61, p. 9 – 18.
12. Schnettler R., Stahl J. P., Alt V., Pavlidis Th., Dingeldein E., Wenish S. Calcium phosphate – based bone substitutes European Journal of trauma, 2004, v. 30, p. 219 – 229.
 13. Jacobs R., van Steenberghe D. Radiographic planning of Endosseous Oral Implants, 1998, p. 66 – 80.
 14. Yuan H., Li Y., Bruijn J. D., de Groot K., Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: A study in dogs Biomaterials, 2000, v. 21, p. 1283 – 1290.
 15. Roberts W. E., Simmou K. E., Garetto L. P. Bone physiology and metabolism in dental implantology // Implant. Dent., 1992, v. 1, p. 11 – 21.
 16. Mish C. E. Contemporary implant dentistry, Mosby, second edition, 1999, p. 281.
 17. Urist M. R.: Bone transplants and implants, in Urist M/ R/ (ed.): Fundamentals and Clinic Bone Physiolog. Philadelphia: JB Lippincott, 1980, p. 331 – 368.
 18. Commuzi L., Ooms E., Jonsen I. A. Injectable calcium phosphate cement as a filler for bone defects around oral implants: on experimental study in goats // Clin. Oral Impl. Res., 2002, v. 13, p. 304 – 311.
 19. Huse R. O., Ruhe Q., Walke J. G. C., Jansen J. A. The use porous calcium phosphate scaffolds with transforming growth factor β 1 as onlay bone graft substitute: Au experimental study in rats // Clin. Oral Impl., 2004, v. 15, p. 741 – 749.
 20. Ooms E. M., Wolke J. G. C., van de Heuvel M. T., Jeschko B., Jansen I. A. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone // Biomaterials, 2003, v. 24, p. 989 – 1000.
 21. Niedhart C., Maus U., Redmann E., Siebert C. In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction // J. Biomed Mater. Res., 2001, v. 55, p. 530 – 537.
 22. Heymann D., Guicheux J., Rousselle A. V. Ultrastructural evidence in vitro of osteoclastinduced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanism. // Histol. Histopathol., 2001, v. 16, p. 37 – 44.
 23. Yu. Vovk. V. Vovk, O. Deltzova. Reparative osteogenesis and preparation. XVIII Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Barcelona, September 2006. 12 – 15, p. 135.
 24. Robert O. Huse, P. Quinten Ruhe, Johannes G. C. Wolke, John A. Jangen. The use of porous calcium phosphate scaffolds with transforming growth factor beta 1, as an onlay bone graft substitute: An experimental study in rats. Clinical Oral Implants Research, № 6, 2004. pp. 741 – 749.
 25. Biomechanical and Histological Evaluation of a calcium Phosphate cement. Elizabeth P, Frekenburg M, Steven A, Goldstein Ph. Journal of Bone and Joint Surgery 80: 1112 – 24, 1998.
 26. Carlson N. E., Roach R. B., Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. J Am Dent Assoc 2002; 133: 1383 – 6.
 27. Saba A. A., Freedman B. M., Gaffield J. W., Mackay D. R., Ehrlich H. P. Topical platelet-derived growth factor enhances wound closure in the absence of wound contraction: an experimental and clinical study. Annals of Plastic Surgery 2002; 49: 62-6; discussion 66.
 28. Fickova M. Structure and activation of EGF receptor: minireview. Endocr Regul 2002; 36: 87 – 93.
 29. Sanchez A. R. Sheridan P. J., Kuppl L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18:93 – 103.
 30. Casati M. Z., Platelet-rich plasma does not de Vasconcelos Gurgel B. C., improve bone defects – la Roche Noguerra Filho – A pilot study in dogs // G., Nociti F. H. Sallum Intern. Jour. of Oral and Maxillofacial Surgery, 2007, v. 36, p. 132 – 136.
 31. Aghaloo T. L., Moy P. K., Freymiller E. G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. J Oral Maxillofac Surg 2002; 60: 1176 – 81.
 32. Kassolis J. D., Rosen P. S., Reynolds M. A. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. J Periodontol 2000; 71: 1654-61.
 33. Kawase T., Okuda K., Wolff L. F., Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. J Periodontol 2003; 74: 858-64.
 34. Marx R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? Implant Dent 2001; 10: 225-8.
 35. Landesberg R., Roy M., Glickman R. S. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. J Oral Maxillofac Surg 2000; 58: 297 – 300; discussion 300-. 35. Lewin B. Genes. VII ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

Табл.3 Процентне співвідношення новоутворених тканин у дефектах кістки, виповнених біоматеріалами та у контролі у піддослідних тварин (тривалість спостереження – 94 дні)

Показник морфологічних досліджень	Вид експерименту	
	автокісткова тканина	Calcibone®±ЗТПК
Площа сполучної тканини	53,96±0,87	13,74±0,22*
Площа грубоволокнистої кістки	18,45±0,62	42,61±0,79*
Площа компактної кістки	27,59±0,11	43,67±0,36*
Площа порожнини між новоутвореними тканинами	2,13±0,18	3,35±0,24*

* – показник статистично достовірний ($p < 0,05$), порівняно з даними попереднього експерименту