

Э.А.Дмитриева

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»

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

Надійшла: 24.10.2016

Прийнята: 01.12.2016

УДК 616.89:159.942.2+618.14-065.87

## МОРФОЛОГИЯ РЕГЕНЕРАТА ПРИ ЗАПОЛНЕНИИ КОСТНОГО ДЕФЕКТА МАТЕРИАЛАМИ EASYGRAFT И ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТОМ

*Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Клинико-лабораторное обоснования использования современных медицинских технологий для диагностики, профилактики и лечения основных стоматологических заболеваний» (номер государственной регистрации 0104U000711).*

**Реферат.** В эксперименте на 112 белых крысах исследовали влияние имплантации материалов EasyGraft и трикальцийфосфата в 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. Это сопровождается снижением удельной площади имплантированных частиц, возрастанием индекса остеоинтеграции и удельной плотности трабекул в реактивной зоне. Наибольшая активность выявленных процессов наблюдается в период с 15-го по 30-й день после имплантации.

**Morphologia.** – 2016. – Т. 10, № 4. – С. 35-40.

© Э.А.Дмитриева, 2016

✉ yvd03@yandex.ru

**Dmitriyeva E.A. Morphology of regenerated bone tissue under effect of Easygraft and amorphous calcium phosphate implants.**

**ABSTRACT. Background.** The theoretical basis of osteoplasty, fully supported by clinical observations, is that violations occur in periodontitis of correlation between tooth and the surrounding tissues, including the microcirculation. However, multifaceted morphological and clinical analysis of effectiveness of the material held EasyGraft was not. **Objective.** The aim was experimental evaluation of tissue alterations in bone implant materials Easy-Graft® and tricalcium phosphate®. **Methods.** The comparative analysis of quantitative morphological estimation of regenerative processes in osteal tissue in model of osteal defect is carried out at implantation of material EasyGraft and amorphous calcium phosphate. **Results.** Implantation of amorphous calcium phosphate on the 7th day of observation defined system defect initial signs of degradation and sprouting of blood vessels. Intervals around the particles of the material have been filled by fibrose tissue. Among the spongy bone substance occurred active formation of new bone tissue. After 15 days of observation of the implanted material adjustment processes were more pronounced: define complex regenerate formed by osteogenic tissue with inclusions of large volume graft particles. On the 30th day of the experiment, all of the defect area was riddled with large bony trabeculae, actively carry out the process of compaction of bone and subsequent biological degradation of the implant. After 60 days, the fragments were subjected defragmentation implant and bone substitution. In the inter-trabecular spaces formed sections filled with yellow bone marrow. Between trabecular bone, and substituted defect area boundary is not observed. **Conclusion.** EasyGraft and amorphous calcium phosphate undergo resorbition 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 observed in the period from 15th fill the 30th day after implantation.

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

### Citation:

Dmitriyeva EA. [Morphology of regenerated bone tissue under effect of Easygraft and amorphous calcium phosphate implants]. Morphologia. 2016;10(4):35-40. Russian.

### Введение

Прогресс технологий замещения костных дефектов в стоматологии связан не только с появлением нового поколения остеопластических

материалов, разработкой методов их применения, повышением клинической эффективности, но в большей мере определяется результатами исследований в области остеологии – гистофи-

зиологии костной ткани, клеточных взаимоотношений в норме и при патологии [1]. Сегодня не вызывает сомнений преимущество синтетических препаратов перед другими материалами, предложенными для этих целей. Применение современных заменителей костной ткани обеспечивает протекание регенерации без промежуточной реконструкции и атрофии альвеолярного отростка, в отличие от рутинного процесса заживления [2, 3].

В современной стоматологии широко используется пластика костных дефектов различными материалами [4]. Как правило, для этого применяют материалы на основе гидроксиапатита кальция (как биологического, так и искусственного происхождения), трикальцийфосфат, деминерализованный костный матрикс, ауто-, алло- и гетеротрансплантаты и многие другие [5]. При этом особое внимание привлекает не только оптимизация процессов репаративного остеогенеза, но и реакция на имплантацию костного органа в целом. В этом аспекте интерес представляет синтетический остеокондуктивный материал EasyGraft, изготовленный на основе  $\beta$ -трикальций фосфата. Технология покрытия каждой гранулы материала 10 мкм оболочкой полилактоидной кислоты обеспечила возможность создания двух уникальных, не имеющих в мире аналогов, методик применения этого материала для заполнения костных дефектов при реабилитации стоматологических больных.

В соответствии с этим **цель** данного исследования состояла в экспериментальном изучении влияния имплантации материалов EasyGraft (ИГ) (компания DS Dental, Швейцария) и трикальцийфосфат (ТКФ) (НПП «Кергап», Украина) в проксимальную метадиафизарную область большеберцовой кости (ББК) на гистологическое строение регенерата и губчатого вещества кости в реактивной зоне.

#### **Материалы и методы**

Исследования были проведены на 112 белых крысах с исходной массой 130-140 г, распределенных на 4 группы. Первую группу составили интактные животные (виварный контроль). Вторая группа – животные, которым с использованием эфирного наркоза были сформированы сквозные костные дефекты на границе проксимального метафиза и диафиза ББК диаметром 2,2 мм [6]. Поскольку передне-задний размер ББК в этой области составляет у крыс данного возраста в среднем 3,5-3,6 мм, целостность костного органа и функциональная нагрузка на него сохранялись. В третьей группе в нанесенный дефект имплантировали костнопластический материал ТКФ, в четвертой – ИГ. Манипуляции на животных выполняли в соответствии с правилами Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [7].

Для количественного гистологического анализа у животных выделяли и освобождали от мягких тканей участок ББК, соответствующий области нанесенного дефекта, фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, декальцинировали 5%-ным раствором муравьиной кислоты, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в парапласт. Срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Морфометрические исследования проводили в соответствии с рекомендациями [8].

Определение достоверности различий между выборками проводили с учетом парного  $t$ -критерия Стьюдента, а также непараметрического критерия Уилкоксона в случае отсутствия нормального статистического распределения величин. Полученные квантифицированные результаты обрабатывали с помощью лицензионной программы Statistica (версия 6.1; серийный номер AGAR 909 E415822FA).

#### **Результаты и их обсуждение**

У животных контрольной (первой) группы зона проксимального метафиза ББК была представлена кортикальной и губчатой костью. Костные трабекулы располагались преимущественно в одном направлении, вдоль продольной оси конечности (рис. 1А). Гистоморфометрическое исследование объемного содержания трабекулярного костного вещества в метафизарной зоне показало, что этот показатель в течение всего периода наблюдения постепенно нарастал в течение 60 дней наблюдения (табл. 1), что свидетельствует о сбалансированности процессов резорбции и костеобразования у крыс репродуктивного возраста.

Во второй группе, где пластику сформированного костного дефекта не проводили, на 7-й день после операции регенерат был представлен ретикулофиброзной и грануляционной тканью с большим количеством остеобластических клеток, определялись отдельные костные отломки. На 15-й день количество ретикулофиброзной ткани уменьшалось, увеличивалась занятая ней площадь, наблюдались скопления пластинчатой костной ткани (рис. 1Б).

Через 30 дней в зоне дефекта еще определялись участки тканевого детрита, окруженные ретикулофиброзной тканью. По периферии дефекта определялись коллагеновые элементы с формированием сети костных трабекул грубоволокнистой структуры. В промежутках между костными балками находилось значительное количество кровеносных сосудов. В центральных отделах увеличивалось количество участков, занятых пластинчатой костной тканью (рис. 1В). На 60-й день эксперимента периферические отделы дефекта выглядели как чередование костных трабекул и костного мозга.

В центральных отделах дефект был заполнен костным мозгом и костной тканью различ-

ной степени зрелости. Дефект кортикальной пластинки полностью заполнялся костным регенератом с признаками перестройки и формированием остеонных структур (рис. 1Г). Объем трабекулярной кости в зоне, прилегающей к дефек-

ту, был меньше, чем аналогичный показатель у интактных животных: в соответствии с установленными сроками эксперимента на 29,72%, 26,40%, 13,20% и 7,46%.

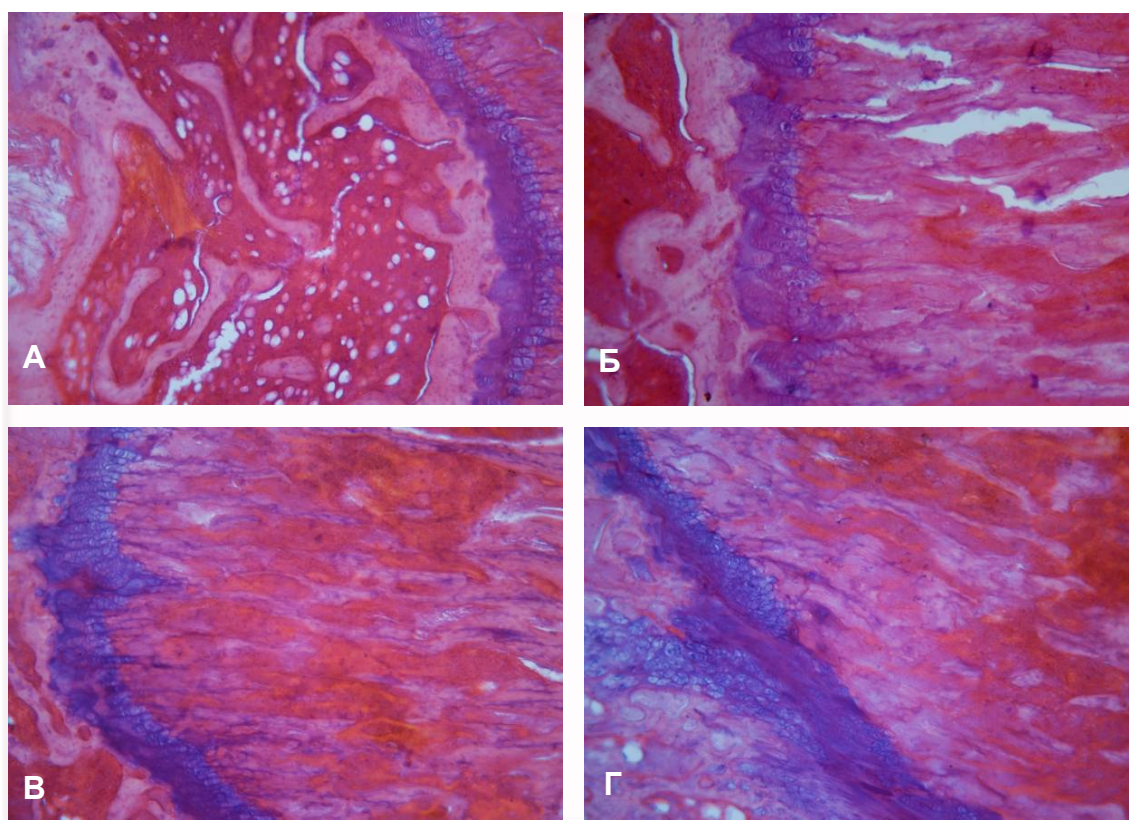


Рис. 1. А – трабекулярная костная ткань в области проксимального метафиза ББК (группа 1, 30-й день наблюдений). Б – формирование костных трабекул в зоне незаполненного дефекта (группа 2, 15-й день наблюдений). В – репаративный регенерат (группа 2, 30-й день). Г – сформированный регенерат (группа 2, 60-й день). Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 100$ .

Таблица 1  
Динамика объемного содержания трабекулярного костного вещества в области проксимального метафиза большеберцовой кости крыс, % (M $\pm$ m)

Группа	Сроки эксперимента			
	7 дней	15 дней	30 дней	60 дней
1	33,39 $\pm$ 0,32	34,19 $\pm$ 0,29	34,72 $\pm$ 0,44	35,00 $\pm$ 0,72
2	23,83 $\pm$ 0,37*	25,17 $\pm$ 0,63	30,14 $\pm$ 0,76*	32,38 $\pm$ 0,75*
3	22,64 $\pm$ 0,75*	22,39 $\pm$ 0,83*^	31,33 $\pm$ 0,61*	34,61 $\pm$ 0,52^
4	24,78 $\pm$ 0,86*	25,08 $\pm$ 0,76*#	30,83 $\pm$ 0,92*	35,19 $\pm$ 0,57^

Примечания: \* - достоверное отличие от 1-й группы ( $p < 0,05$ ); ^ - достоверное отличие от 2-й группы ( $p < 0,05$ ); # - достоверное отличие от 3-й группы ( $p < 0,05$ ).

При гистологическом исследовании регенерата, формирующегося при заполнении дефекта ТКФ в виде порошка (третья группа), на 7-й день наблюдения определялся дефект, заполненный имплантированным материалом с начальными признаками дегградации и прорастанием кровеносных сосудов (рис. 2А). Промежутки вокруг

частиц ТКФ были заполнены ретикулофиброзной тканью. В области, где имплантат располагался среди губчатого костного вещества, происходило активное формирование новообразованной костной ткани. Через 15 дней наблюдения процессы перестройки имплантированного материала были более выраженными: определялся

сложный регенерат, образованный остеогенной тканью с включениями большого объема частиц имплантата (рис. 2Б). На 30-й день эксперимента вся зона дефекта была пронизана крупными ко-

стными трабекулами, активно осуществлялись процессы компактизации костной ткани и последующей биологической деградации имплантата (рис. 2В).

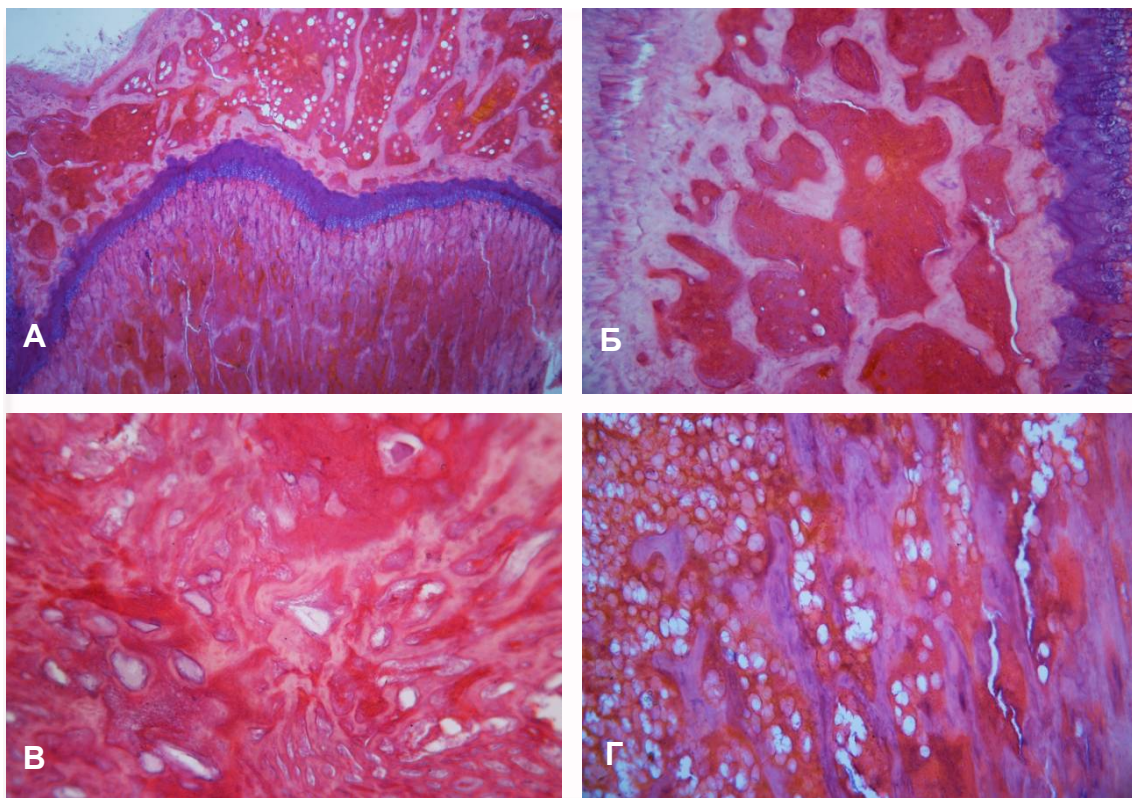


Рис. 2. Костно-керамический регенерат, сформировавшийся при имплантации в костный дефект материала ТКФ. А – 7-й день эксперимента.  $\times 40$ . Б – 15-й день. В – 30-й день. Г – 60-й день. Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 100$ .

Через 60 дней большая часть фрагментов имплантата была подвержена дефрагментации и замещению костной тканью. В межтрабекулярных пространствах формировались участки, заполненные желтым костным мозгом. Между трабекулярной костной тканью и зоной замещенного дефекта граница не наблюдалась (рис. 2Г).

Индекс остеоинтеграции (удельная плотность участков костных трабекул, контактирующих с частицами имплантата) в ходе наблюдения закономерно увеличивался, а площадь, занятая частицами ТКФ (т.е. показатель активности биологической резорбции), значительно уменьшалась. Следует отметить, что наиболее активная динамика изменений происходила в период с 15-го по 30-й день эксперимента (табл. 2, 3).

Объем трабекулярной кости в зоне, прилегающей к дефекту, так же как и во второй группе, был меньшим, чем аналогичный показатель у интактных животных в период с 7-го по 30-й день эксперимента – на 32,2%, 34,5% и 9,8% соответственно. К 60-му дню достоверные отличия этого показателя от значений контрольной груп-

пы уже не определялись. Сопоставление объема трабекулярной кости со значениями второй группы (без имплантации) показало, что в ранние сроки (7 и 15 дней) он был меньше соответственно на 5,0% и 11,1%, но на 60-й день уже превосходил их на 6,9%. Такая динамика объема трабекулярной кости, вероятно, объясняется тем фактом, что в ранние сроки интенсивность процессов репаративной регенерации и перестройки имплантированного ТКФ выше, чем в группе без имплантации. В поздние сроки (60 дней) наличие ионов кальция в зоне имплантации создает благоприятные условия для восстановления трабекулярной кости в реактивной зоне.

При гистологическом исследовании регенерата, формирующегося при заполнении дефекта материалом ИГ (четвертая группа), динамика процессов репаративной регенерации, биодеградации имплантата и ремоделирования костно-керамического регенерата качественно не отличалась от таковой в третьей группе (рис. 3). Гистоморфометрическое исследование регенерата при этом позволило выявить определенные количественные отличия.

Таблица 2

Динамика индекса интеграции костной ткани с поверхностью имплантата, у.е. (M±m)

Группа	Сроки эксперимента			
	7 дней	15 дней	30 дней	60 дней
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*

Примечание: \* - достоверное отличие от группы 3, p<0,05.

Таблица 3

Динамика показателей площади, занятой частицами имплантированного материала, % (M±m)

Группа	Сроки эксперимента			
	7 дней	15 дней	30 дней	60 дней
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

Примечание: \* - достоверное отличие от группы 3, p<0,05.

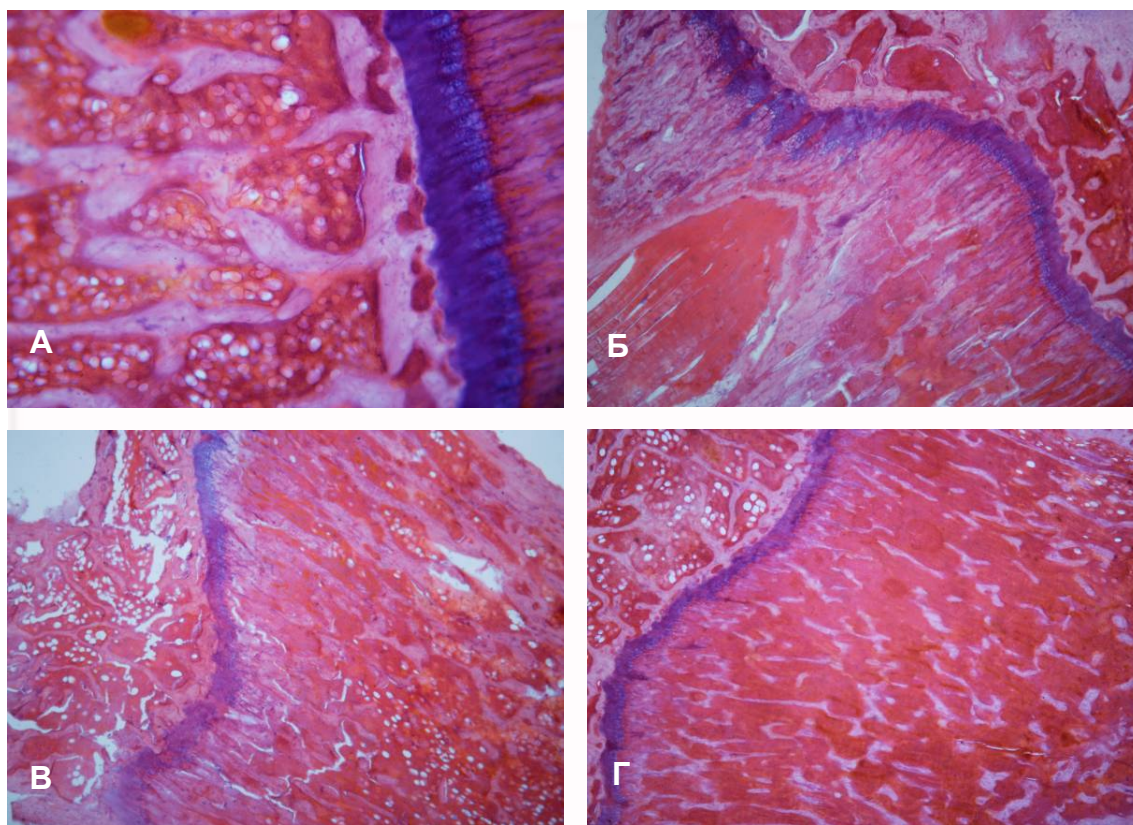


Рис. 3. Костно-керамический регенерат, сформировавшийся при имплантации в костный дефект материала ИГ. А – 7-й день эксперимента. ×100. Б – 15-й день. ×100. В – 30-й день. ×40. Г – 60-й день. ×40. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Индекс остеоинтеграции в препаратах четвертой группы животных в ходе наблюдения значительно возрос – от 0,171±0,005 у.е. до 0,839±0,005 у.е., а площадь, занятая частицами материала ИГ, уменьшалась от 55,56±0,72% до 23,14±0,72%. Так же, как и в третьей группе, наиболее активная динамика абсолютных изменений показателей наблюдалась в период с 15-го

по 30-й день эксперимента (см. табл. 2, 3). Сравнение полученных результатов с показателями третьей группы (имплантация ТКФ) показало, что индекс остеоинтеграции при имплантации ИГ достоверно превосходил их во все установленные сроки эксперимента.

Площадь, занятая частицами имплантированного материала, уступала аналогичным пока-

зателям третьей группы в период с 15-го по 60-й день наблюдения. Объем трабекулярной кости в препаратах четвертой группы в зоне, прилежащей к дефекту, был меньше, чем аналогичный показатель у интактных животных. На 60-й день достоверные отличия этого показателя от значений первой группы уже не определялись. Сравнение объема трабекулярной кости со значениями третьей группы (имплантация ТКФ) показало, что в ранние сроки (7 и 15 дней) он превосходил их соответственно на 9,5% ( $p < 0,05$ ) и 12,03 % ( $p < 0,05$ ), после чего достоверные различия уже не регистрировались. Такая динамика объема трабекулярной кости, вероятно, объясняется тем фактом, что при имплантации ИГ в зону дефекта в ранние сроки наблюдения создаются более благоприятные условия для восстановления трабекулярной кости в реактивной зоне, чем при имплантации ТКФ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при имплантации в зону костного дефекта материала ИГ как биодеградация имплантированного материала, так и процессы репаративной регенерации проходят активнее, чем при имплантации ТКФ. С другой стороны, преиму-

щество органического компонента над показателями третьей группы объясняется тем, что ИГ кроме osteoconductive свойств обладает еще и osteoinductive эффектом.

#### **Заключение**

Использование костнопластических материалов на основе аморфного трикальцийфосфата для пластики костных дефектов сопровождается биологической резорбцией и обнаруживает стимулирующий эффект на процессы репаративной регенерации кости. Это сопровождается снижением удельной площади имплантированных частиц (биорезорбцией), нарастанием в ходе эксперимента индекса остеоинтеграции и удельной плотности трабекул в реактивной зоне. Наибольшая активность выявленных процессов наблюдается в период с 7-го по 30-й день после имплантации, а наиболее активные темпы гистоморфологических перестроек – с 15-го по 30-й день после имплантации.

**Перспективы дальнейших исследований** связаны с анализом регенерации костной ткани при использовании различных материалов в эксперименте.

#### **Литературные источники References**

1. Grudyanov AI. Zabollevaniya parodonta [Periodontal diseases]. Moscow: Meditsinskoye informatsionnoe agentstvo; 2009. 336 p. Russian.
2. Volf GF, Rateyzchak EM. Parodontologiya [Periodontics]. Moscow: MEDpressinform; 2008. 548 p. Russian.
3. Danilevskiy NF. Terapevticheskaya stomatologiya [Therapeutic stomatology]. Kiev: Meditsina. 2011. 332 p. Russian.
4. Mazur IP. [Structural and functional condition of the periodontal tissues in populace of different ages and gender / IP Mazur // *Sovremennaya stomatologia*. 2005;4:48-51. Ukrainian.
5. Pabbruwe MB, Standard OC, Sorrell CC.

Bone formation within alumina tubes: effect of calcium, manganese, and chromium dopants. *Biomaterials*. 2004;25:4901.

6. Luzin VI, Ivchenko DV, Pankratiev AA. [Methods of modeling the bone defect in laboratory animals]. *Ukr Med Alm*. 2005;8(2):162. Russian.

7. 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.

8. Avtandilov GG. Meditsinskaya morfometriya [Medical morphometry]. Moscow: Meditsina; 1990. 384 p. Russian.

#### **Дмитрієва Е.О. Морфологія регенерату при заповненні кісткового дефекту матеріалами EasyGraft і трикальційфосфатом.**

**Реферат.** 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 остеоінтеграції та питомої щільності трабекул у реактивній ділянці. Найбільша активність виявлених процесів спостерігається в період з 15-го по 30-й день після імплантації.

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