

На правах рукописи

ВОЛКОВ

Алексей Вадимович

**МОРФОЛОГИЯ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА И
ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ
В ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ХИРУРГИИ**

14.03.02 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор **Омельяненко Николай Петрович**

доктор биологических наук, профессор **Гольдштейн Дмитрий Вадимович**

Официальные оппоненты:

Шехтер Анатолий Борухович

доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории экспериментальной морфологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, (Сеченовский Университет)

Долгалев Александр Александрович

доктор медицинских наук, доцент кафедры стоматологии общей практики детской стоматологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Паклина Оксана Владимировна

доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Городская клиническая больница имени С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы, заведующая патологоанатомическим отделением, врач-патологоанатом.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России)

Защита диссертации состоится «15» мая 2019 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>)

Автореферат разослан «_____» _____ 201 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.203.06
кандидат медицинских наук

В.А. Горячев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

В настоящее время в клиническую практику, для решения проблемы дефицита костной ткани в орофациальной области, внедряются новые медицинские технологии, основанные на трансплантации собственной костной ткани, полученной из внеротовых и внутриротовых источников. В качестве альтернативы им применяют тканеинженерные конструкции, клеточные продукты, остеопластические материалы на основе аллогенного и ксеногенного коллагенового костного матрикса, как в чистом виде, так и в активированном, путем добавления генных конструкций, факторов роста и клеточной дифференцировки и проч. [Proussaefs P. et al. 2003; Proussaefs P. et al., 2005; Михайловский А. А. и др., 2015]. Клиническому применению предшествуют экспериментальные, пилотные клинические и мультицентровые клинические исследования разрабатываемых технологий стимуляции репаративного остеогенеза.

Задачами доклинических и пилотных клинических исследований являются определение безопасности, эффективности воздействия нового продукта не только на регенерацию кости, но и в целом на организм [Zhu S.-J. et al. 2006; Bassil J et al., 2011; Алексеева И. С. и др., 2012]. Это невозможно без проведения комплексного исследования, включающего, кроме клинических и инструментальных, не просто гистологическое, но обязательно гистоморфометрическое исследование, которое должно отражать математическую характеристику структурных компонентов и клеточных реакций в области воздействия [Волков А. В. и др., 2015; Мураев, А. А. и др., 2016]. Такие исследования позволяют получить достоверную и объективную информацию об основных процессах, протекающих в костном регенерате. Полученная в цифровом выражении информация о структуре костного регенерата становится пригодна для статистической обработки, которая, в свою очередь, необходима для объективизации результатов, что особенно необходимо в рамках доказательной медицины [Davies, J. E., et al., 2010; Angelis, N., et al., 2011; Maiorana, C., et al., 2011].

Немаловажно в исследовании эффективности новых методов стимуляции регенерации костной ткани выявление механизмов межтканевых и клеточных взаимодействий внутри костного регенерата, обеспечивающих эффективность под действием стимулирующего фактора. Так, при использовании аутооттрансплантации костной ткани необходимо знать не только количество костной ткани в регенерате, но и ее происхождение – относится ли она к трансплантату или образовалась вновь [Рампа-

Benfenati S., et al. 1999; Егиазарян, К. А., и др. 2017;]. В свою очередь при имплантации остеопластических материалов имеет значение не только относительный объем костной ткани, которая образовалась после остеопластики, но и характер взаимодействия материала его с воспринимающим ложем - новообразовавшейся в результате это взаимодействия костной тканью. Необходимо дать оценку воспалительной реакции на их внесение, при ее появлении, определить ее характер и клеточный состав. Все это необходимо не только для понимания механизма воздействия того или иного метода стимуляции, но и для прогноза состояния костной ткани и имплантированного материала в отдаленном послеоперационном периоде [Ахтямов, И. Ф., и др., 2015; Митрошенков, П. Н., и др., 2015].

Немаловажным аспектом изучения свойств нерезорбируемых имплантатов, например внутрикостных дентальных имплантатов, является определение их устойчивости в костной ткани с течением времени. Знания о первичной стабилизации дентального имплантата позволяет спрогнозировать дальнейшую реабилитацию пациентов, что сказывается на сроке лечения и качестве оказания медицинской помощи. В свою очередь, динамический контроль приживления элементов ортопедической конструкции необходим для подбора оптимального времени нагрузки на него [Simion M., et al., 1996; Schlegel A. K., et al. 1998; Parma-Benfenati S., et al. 1999; Агазаде А. Р., и др. 2014; Добровольская О. В., и др., 2009].

Количественная оценка структурных компонентов кости в настоящее время проводится в рамках протоколов и морфометрических систем, разработанных и рекомендованных профессиональными ассоциациями. Однако эти методики создавались преимущественно для диагностики и контроля лечения заболеваний костной ткани и неприменимы для изучения стимуляции регенерации костной ткани с использованием костных трансплантатов, клеточных продуктов, ординарных и активированных костных материалов [Wronski D. B. V., et al., 1983; Cawood J. I., et al., 1988; Camelo, M. et al., 2001], например рекомендации Международной ассоциации исследователей костных и минерализованных тканей (ASMBR).

В настоящее время существуют отрывочные и не систематизированные попытки использовать морфометрическую платформу, рекомендованную ASMBR, в качестве основы для комплексной гистоморфометрической оценки костных регенератов при стимуляции репаративного остеогенеза [Maiorana C., et al., 2001; Wada K., et al., 2001; Proussaefs P., et al., 2006; Simon B. I., et al., 2010]. Так, например, в ряде случаев дается

морфометрическая оценка внесенных в костный регенерат стимулирующих агентов, однако отсутствие системного подхода без упора на динамическое взаимодействие внесенного компонента со структурными компонентами костного регенерата приводит к снижению информативности полученных данных и ограниченности выводов. В свою очередь, морфометрическая оценка взаимодействия костной ткани с нерезорбируемыми имплантатами (ортопедическими внутрикостными конструкциями) проводится бессистемно. Морфометрическая оценка внутрикостных имплантатов номенклатурно не связана с системой ASMBR [Dempster D. W., et al., 2013] и существует сама по себе. Каждая научная группа использует предложенные ей критерии оценки процессов интеграции внутрикостных имплантатов на свое усмотрение, что приводит к затруднению при метаанализе результатов в подобных публикациях [Carter J. R., et al., 1998; Tadjoeidin E. S., et al., 2000; Fontana F., et al., 2008; Kon K., et al., 2009; Агазаде А. Р., и др. 2014].

Возможность проведения трепанобиопсии костной ткани после стимуляции репаративного остеогенеза перед установкой внутрикостных дентальных имплантатов в челюстно-лицевой хирургии без этических проблем открывает перспективы изучения репаративного остеогенеза с использованием гистоморфометрии, поскольку технология установки внутрикостных дентальных имплантатов включает в себя этап формирования ложа имплантата [Ломакин М. В., и др. 2004]. На этом этапе использование вместо обычного сверла трифина (пустотелого сверла) позволяет получить трепанобиоптат надлежащего качества. Таким образом, стимуляция репаративного остеогенеза у пациентов с заболеваниями верхней и нижней челюсти, требующая внутрикостной дентальной имплантации может являться модельной системой для изучения репаративного остеогенеза, поскольку позволяет получить образец костной ткани для последующего гистоморфометрического анализа [Devlin H., et al., 1994; Assenza B., et al., 2001].

Цель исследования: - определить закономерности и особенности репаративного остеогенеза в присутствии костно-замещающих материалов и нерезорбируемых внутрикостных имплантатов в челюстно-лицевой хирургии.

Задачи:

1) определить морфологические особенности и закономерности репаративного остеогенеза при его стимуляции аутооттрансплантатами, тканеинженерными конструкциями, остеопластическими (костнозамещающими) материалами, а так же в присутствии внутрикостных дентальных имплантатов;

- 2) определить механизмы и морфологические особенности репаративного остеогенеза при аутотрансплантации невааскуляризированного (свободного) костного блока у человека;
- 3) определить механизмы и особенности репаративного остеогенеза при аутотрансплантации фрагментированного костного блока в зависимости от способа его трансплантации у человека;
- 4) определить механизмы и морфологические особенности репаративного остеогенеза при трансплантации тканеинженерных конструкций на основе остеогенных клеток предшественников аутогенного и аллогенного происхождения у человека;
- 5) определить морфологические особенности репаративного остеогенеза при имплантации остеопластических (костнозамещающих) материалов у человека;
- 6) определить тканевые и клеточные реакции организма человека на им-плантацию остеопластических в костную рану;
- 7) дать морфологическую характеристику костным структурам, образующимся после установки внутрикостных дентальных имплантатов;
- 8) определить морфологические изменения в костных структурах, образующихся после установки внутрикостных дентальных имплантатов с течением времени;
- 9) в условиях экспериментальной модели определить морфологические характеристики костных структур, образующихся после установки внутрикостных дентальных имплантатов с течением времени и обосновать оптимальный временной интервал для протезирования имплантатов;
- 10) разработать морфометрическую систему для оценки репаративного остеогенеза и на ее основе дать количественную характеристику процессам, протекающим при стимуляции репаративного остеогенеза и в условиях имплантации внутрикостных нерезорбируемых имплантатов.

Научная новизна.

Впервые разработана комплексная гистоморфометрическая система на основе стереометрии для изучения репаративной регенерации костной ткани.

Определены с помощью гистоморфометрии особенности и механизмы и репаративного остеогенеза при трансплантации аутологичной костной ткани в клинической практике. Показана прямая зависимость между размерами фрагментов трансплантированной костной ткани, условиями трансплантации и активностью

репаративного остеогенеза у человека в условиях реконструктивных операций на верхней и нижней челюсти.

Определены с помощью гистоморфометрии особенности и механизмы и репаративного остеогенеза при трансплантации аутологичной и аллогенной тканеинженерной конструкции в клинической практике. Показана прямая зависимость между источниками остеогенных клеток предшественников (аллогенные или аутогенные), областью трансплантации и активностью репаративного остеогенеза у человека в условиях реконструктивных операций на верхней челюсти.

Определены с помощью гистоморфометрии особенности и закономерности репаративного остеогенеза при имплантации различных видов и классов остеопластических материалов в клинической практике. Показаны различия в степени активации и механизмах репаративного остеогенеза в зависимости от типа костно-замещающего материала ксеногенного происхождения у человека в условиях реконструктивных операция на нижней и верхней челюсти.

Впервые выявлен феномен материал-ассоциированной костной резорбции, возникающий при взаимодействии имплантированного остеопластического материала с костным ложем, обуславливающий замедление репаративного остеогенеза и оссификацию костного регенерата.

Впервые выявлены особенности адаптивного взаимодействия нерезорбируемых внутрикостных дентальных имплантатов и костной ткани воспринимающего ложа с образованием связанных с ними костных структур, изменяющихся в зависимости от наличия или отсутствия жевательной нагрузки.

Научно-практическая значимость.

Предложенная комплексная гистоморфометрическая система для оценки репаративного остеогенеза может быть использована в доклинических экспериментальных, клинических исследованиях по изучению эффективности и безопасности методов стимуляции репаративного остеогенеза, остеointegrации внутрикостных нерезорбируемых и резорбируемых имплантатов (протезов) в травматологии-ортопедии, детской хирургии, челюстно-лицевой хирургии, нейрохирургии, вертебрологии, онкологии для получения объективной, достоверной информации, в рамках доказательной медицины, о процессах, протекающих в костной ткани после воздействия на нее. Выявленные особенности и закономерности репаративного

остеогенеза в условиях его стимуляции различными типами костно-замещающих материалов, в том числе тканеинженерными конструкциями, аутологичными трансплантатами, ксеногенными остеопластическими материалами позволят прогнозировать и выбирать наиболее подходящий метод стимуляции репаративного остеогенеза у человека, прогнозировать эффективность лечения и реабилитации в клинической практике. Выявленные особенности и закономерности приживления нерезорбируемых внутрикостных имплантатов, позволяют обосновать более раннее их протезирование по сравнению с традиционными сроками, сократить сроки лечения и реабилитации пациентов на основании определенных оптимальных временных интервалов в экспериментальном исследовании.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 патологическая анатомия по пунктам 1,2,3,4.

Методология и методы исследования заключается в системном и комплексном анализе научных трудов отечественных и зарубежных ученых в области механизмов репаративного остеогенеза, регенерации, пролиферации клеток соединительной ткани, клеточном взаимодействии, которые сформировали основные положения учения о регенерации костной ткани млекопитающих, влиянии трансплантации костной ткани, тканеинженерных конструкций, остеопластических материалов на репаративные процессы в костной ткани. В работе использованы следующие методы: модель внутрикостной имплантации у миниатюрных свиней, культивирование клеток человека, цитохимическое окрашивание, гистологическое окрашивание, морфометрические методы, световая микроскопия, статистический анализ.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования, их решением, использованием современных апробированных методов исследования, корректностью применения, достаточным объемом данных для каждой исследовательской группы, достаточным количеством групп сравнения в экспериментах, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы. Материалы диссертации доложены на Всероссийской и международной научной конференции «Стволовые клетки и перспектива их

использования в здравоохранении» (Москва, 2007), на международной конференции «Высокие технологии. Инновации. Инвестиции» (Санкт-Петербург, 2007), Всероссийской научной конференции «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2011), научной конференции «Морфометрия и применение IT-технологий в диагностике заболеваний» (Москва, 2014), Первом евразийском травматолого-ортопедическом форуме (Москва, 2017), Первом конгрессе травматологов-ортопедов ЦФО (Смоленск, 2017).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении исследования, разработке математических алгоритмов гистоморфометрии, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Внедрение результатов исследования. Основные результаты работы включены в учебную программу кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины Рязанского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, в практическую работу лаборатории соединительной ткани Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатории генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетического научного центра», лаборатории роста и развития федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека».

Основные положения выносимы на защиту.

1. Активность репаративного остеогенеза при трансплантации атологичной костной ткани зависит от формы трансплантата и характера кровоснабжения, получаемого им от воспринимающего ложа.
2. Репаративный остеогенез при аутологичной трансплантации костной ткани, с предварительным ее фрагментированием, протекает вначале при участии сохранивших жизнеспособность входящих в него остеогенных клеток, а затем за счет остеогенного действия костного матрикса несохранившей жизнеспособность части трансплантата.
3. Активность репаративного остеогенеза при аутологичной и аллогенной трансплантации не зависит от источника происхождения клеточной культуры, но

резорбция новообразованной костной ткани зависит от биологических свойств материала матрицы-носителя.

4. Стимуляция репаративного остеогенеза остеопластическими материалами различных классов является результатом их действия на ткани воспринимающего ложа, что приводит к разнонаправленному смещению процессов остеогенеза и остеоклазии, выражающемуся в частичной резорбции новообразованной костной ткани и имплантированного остеопластического материала.
5. Образование, созревание и функциональная адаптация пограничных костных структур, отделяющих внутрикостные нерезорбируемые имплантаты, после их установки в костное ложе зависит от сочетания их свойств и перераспределяемой на них нагрузки.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 19 статей в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук (ВАК 18, Scopus 9).

Структура и объем диссертации

Диссертация написана на русском языке, состоит из 6 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, три главы с результатами собственных исследований, обсуждение полученных результатов) и изложена на 261 странице. Работа проиллюстрирована 95 рисунками и 51 таблицей. Список литературы включает 501 источников, в том числе 154 – на русском языке, 347 на английском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное исследование. Экспериментальное исследование соответствовало рекомендациям локального биоэтического комитета Федерального государственного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). При их постановке руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР от 12.08.1977 № 755 и от 24.07.1978 № 701 и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г.

Экспериментальная модель вторичной адентии нижней и верхней челюсти у миниатюрных свиней с последующей установкой дентальных имплантатов. Экспериментальное исследование изучения эффективности и безопасности отечественных дентальных имплантатов проводилось в модели вторичной адентии у миниатюрных свиней в возрасте более 2 лет, после окончательной смены зубов. Пяти самцам массой 45–55 кг, после наркоза (Золетил) и местной проводниковой анестезии (Ультракаин, Ноеchst, Германия) премоляры и моляры на верхней и нижней челюсти удалялись. Спустя 3 месяца после заживления костных ран и формирования клинических признаков вторичной адентии под наркозом устанавливались по 5–6 имплантатов с каждой стороны на верхней и нижней челюсти. Всего было установлено 72 дентальных имплантата, из которых 36 имели наноструктурированное покрытие из диоксида титана, а другие подобного покрытия не имели. В одном из экспериментов на дентальные имплантаты (серия с 3 имплантатами и серия с 2 имплантатами) устанавливались мостовидные протезы с зубными коронками. Животные носили мостовидные протезы в течение 1 года. Исследование проводили на 2 животных, установлено 10 имплантатов. Животных выводили из эксперимента через 2, 6, 8 недель, 1 года и 2 мес. (с мостовидными протезами).

Ретроспективное исследование гистопрепаратов костных регенератов.

Для изучения взаимодействия костной ткани с остеопластическими материалами в эксперименте проводили ретроспективное исследование гистопрепаратов экспериментальных исследований по изучению влияний на репаративный остеогенез. Материал любезно предоставлен Деевым Р.В. и Бонарцевым А.П. (Таблица № 1).

Таблица №1. Характеристика ретроспективного экспериментального материала

<i>№ п.п</i>	<i>Название экспериментальной работы</i>	<i>Количество животных</i>	<i>Количество объектов исследования</i>	<i>Время экспозиции</i>
1	Имплантация полиоксибутирата в дефект большеберцовых костей крыс Вистар	28	28	От 7 до 28 дней
2	Имплантация октокальций фосфата в дефект теменных костей черепа кролика	10	10	От 30 до 90 дней

Клинический материал.

Биопсийный и гистологический материал (архивный материал) был получен в рамках научно-исследовательских программ от пациентов, проходивших стационарной и амбулаторное лечение в ФГБУ «Центральном научно-исследовательском институте стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, клинических подразделениях Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, с 2008 по 2016 годы. Получение биопсийного материала не требовало специального вмешательства в ходе планового оперативного лечения, а производилась непосредственно перед установкой дентального имплантата. Все клинические исследования соответствовали рекомендациям локальных биоэтического комитетов.

В Таблице 2 указана количественная характеристика исследованного материала.

Таблица 2 – Характеристика клинического материала

<i>№ п.п</i>	<i>Название хирургической процедуры</i>	<i>Кол-во пациент ов</i>	<i>Кол-во трепаноби оптатов</i>	<i>Время экспозиции (дни)</i>
1	Аутотрансплантация свободных костных блоков	22	27	120±10
2	Остеопластика с использованием мелко фрагментированной костной ткани	25	32	120±10
3	Остеопластика костной стружкой с использованием титановых отграничительных мембран	13	17	120±10
4	Остеопластика костной стружкой с использованием синтетических мягких отграничительных мембран	11	14	120±10
5	Операция трансплантации тканеинженерной конструкции в область дна верхне-челюстной пазухи	13	15	120±10
6	Операция трансплантации тканеинженерной конструкции в область гребня нижней или верхней челюсти после экстракции зуба	4	4	120±10
7	Операции имплантации остеопластического материала «BioOss» в область дна верхнечелюстной пазухи	28	32	180±15

8	Операция имплантации остеопластического материала «BioOss Collagen» в область лунки удаленного зуба	35	42	180±15
10	Операция имплантации остеопластического материалов «Остеодент-М» в область лунки удаленного зуба	10	12	180±15
11	Экстракция зуба с заживлением под сгустком	10	10	180±15
12	Первичная адентией и неосложненной вторичной адентией	10	10	*
	Всего	151	205	

Примечание: * – в случае вторичной адентии более 1 года после утраты зуба.

Гистологические методы исследования.

Гистологическая проводка изготовления парафиновых блоков.

Гистологическое исследование образцов ткани проводили непосредственно после биопсии. Материал помещали в 10%-й раствор нейтрального формалина на 72 часа, после чего в течение 24 часов образцы ткани промывали в проточной воде. После стандартной гистологической проводки образцы тканей заливали в парафин («Гистомикс», Биовитрум), используя гистологические заливочные кольца (Биовитрум). Из полученных блоков изготавливали серийные и полусерийные срезы на микротоме Microm (от 3 до 7 мкм).

Гистологическая проводка и изготовление полиметилметакрилатных блоков и шлифов из них. Образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине от 24 до 72 часов в зависимости от объема образцов. Затем промывали в 70% этаноле в течение 24–72 часов с трех кратной сменой реактива. Затем обезвоживали в этаноле восходящей концентрации, промывали в уайт-спирите и заливали в метилметакрилат (Osteo-Bead, Sigma-Oldrich) по стандартной методике, описанной в инструкции, рекомендованной производителем с последующей полимеризацией в песчаной бане при температуре 37–39 °C. Из полученных блоков изготавливались первичные срезы от 100 до 200 мкм (Lowspeed saw, Jet, Швейцария). Из первичных срезов готовились шлифы толщиной 40–50 мкм. Путем последовательного шлифования на полировочных кругах диаметром зерна от 120 до 3 мкм. Контроль толщины среза осуществлялся стандартным механическим микрометром барабанного типа. После чего производилась финишная полировка на войлочном диске.

Окраска парафиновых срезов. В качестве обзорных окрасок использовали рутинные методы окраски гематоксилином и эозином по Мейеру. Для выявления специфических процессов образования костной ткани и резорбции ее препараты окрашивали по Папаниколау, Массон – Голднеру или по Массону (BioOptica, Italy). Окраска по Массон – Голднеру позволяет выявлять минерализованный и неминерализованный костный матрикс (остеоид) на декальцинированных срезах. Кроме того, окраска позволяет дифференцированно выявлять остеобласты и остеокласты, что в свою очередь позволяет автоматизировать морфометрию костной ткани и соответственно стандартизовать ее. После окраски препараты заключали в монтирующую среду и высушивали в течение 7–14 дней при комнатной температуре.

Окраска шлифов. Срезы окрашивали толуидиновым синим по оригинальной методике и заключали в монтирующую среду (Биооптика, Италия).

Документирование. Фотодокументирование проводилось на микроскопе Leica DM 2500 с фотокамерой Leica DTC 295.

Морфометрическое исследование. Морфометрическое исследование проводилось в программном комплексе Megamorph12 (ООО «ГистоЛаб», Москва, Россия).

Получение культуры мультипотентных стволовых клеток из жировой ткани (МСК ЖТ). Получение культуры мультипотентных стволовых клеток из жировой ткани проводили на базе ФГБУ «Медико-генетический научный центр». Первичную культуру мультипотентных стволовых клеток жировой ткани выделяли из липоасpirата, полученного у пациентов, которым планировалось реконструктивная операция на верхней или нижней челюсти с использованием метода трансплантации аутологичной тканеинженерной конструкции. Липоасpirат промывали и дезагрегировали в растворе Версена с добавлением бычьего трипсина (0,25%-й раствор) при 37 °C в течение 1,5 часов до получения однородной клеточной суспензии, которую в последствии центрифугировали 10 минут при 1100 об/мин. Целлюлярный осадок разводили культуральной средой DMEM/F12 в соотношении 1:1 с последующим добавлением аутологичной сыворотки крови до 10% от объема. Для профилактики микробной контаминации в культуральную среду добавляли амикацин до 500 мг/л. После чего в одноразовую пластиковую чашку Петри высевали клеточную культуру в концентрации 1,5–2 тысячи клеток на см² и инкубировали при стандартных культуральных условиях (37 °C, 5% CO₂). Ростовую среду меняли каждые 3 суток.

Остеогенная дифференцировка. Для остеогенной дифференцировки клетки рассеивали на 90 мм чашки Петри и по достижении 80% конфлюэнтного монослоя заменяли ростовую среду на дифференцировочную: DMEM с 10% аутологичной сыворотки крови, 100 мкг/мл амикацина, 50 мг/л L-аскорбиновой кислоты, 10 мМ/л β -глицерофосфата натрия и 10 нМ 1,25-дигидроксивитамина D3). Замену среды на свежую производили каждые 3 суток.

Приготовление обогащенной тромбоцитами плазмы проводили по стандартной методике.

Сборка тканеинженерной конструкции. После замачивания чипсов и блоков «Остеоматрикса» в растворе Хэнкса («ПанЭко», Россия) с цефазолином («Синтез», Россия) (1г/л) их пропитывали смесью культуры клеток после остеогенной дифференцировки и обогащенной тромбоцитами плазмы. В последующем полимеризовали добавляя раствор тромбина («P.Z. Cozyma», Польша) 50 Ед/мл на 10%-м растворе хлорида кальция («Дальхимфарм», Россия) до формирования плотного сгустка плазмы.

Методы статистической обработки данных. Обработка результатов проводилась в программе SigntaStat 3.0. После тестирования полученных данных на нормальность распределения, был использован односторонний дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса, метод Данна, а для попарных межгрупповых различий метод Манна – Уитни. Для определения достоверности межгрупповых различий принимали значение p равное или менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение состояния костной ткани альвеолярного гребня верхней и нижней челюсти в норме и при естественной регенерации.

При гистоморфологическом исследовании, было выявлено, что процесс физиологической регенерации протекает по классической схеме. Отложения остеоида и остеобластическая пролиферация предшествуют остеокластической резорбции костного матрикса. При морфометрическом исследовании, было выявлено, что относительная объемная доля костной ткани (BV/CV) составляет 45%, желтый костный мозг порядка 55% (MaV/CV). В строме желтого костного мозга клеток макрофагального ряда не обнаружено. Определение интегральных показателей состояния активности остеогенеза (BV) выявило, что костная ткань находится в условиях физиологической регенерации

($BB=1,06\pm0,33$), тогда как определение индекса резорбции (Ra.Oc) выявило признаки резорбции костной ткани с явлениями прогрессирующей атрофии ($Ra.Oc=16,7\%\pm1,8$). Таким образом, состояние костной ткани при вторичной адентии имеет тенденцию к неуклонной атрофии, без признаков активации остеогенеза, что согласуется с теорией механостата (Frost, 1965). Отсутствие передаваемой от зуба механической нагрузки приводит к неуклонной атрофии костной ткани альвеолярного отростка челюсти.

Репаративный остеогенез в лунке удаленного зуба у человека.

При гистоморфологическом исследовании трепанобиоптатов костной ткани альвеолярного гребня верхней и нижней челюсти, полученных через 180 дней после экстракции зуба было выявлено, что наружная часть столбика состояла из фиброзной ткани с умеренной клеточностью и незначительной инфильтрацией лимфоцитами. Объем фиброзной ткани достигал 30% от высоты столбика. Под фиброзной тканью располагалась костная ткань, представляющая собой незрелый костный регенерат, построенный из первичных утолщенных первичных костных балок. Кортикальная пластинка не сформирована. Трабекулы так же не однородны, местами утолщены, особенно в поверхностных слоях столбика. При гистоморфометрическом исследовании на момент забора материала (180 дней) репаративный остеогенез еще не завершен ($BB = 8,71\pm2,3\%$) с преобладанием остеобластической активности ($N.ob = 32\pm75,83$, $Ob.S/BS = 3,92\pm3,55$). Процессы ремоделирования костной ткани соответствует репаративному остеогенезу ($Ra.Oc = 6,55\pm0,8\%$). Регенерация кости под сгустком течет в условиях открытой раны, что обуславливало присутствие фиброзной ткани над регенератом в значительном количестве ($CV/FbV = 17,35\pm12,34\%$) и инфильтрацию макрофагами костного регенерата ($N.Mf 2\pm2,28$). Особенностью регенерации костной ткани челюстей после экстракции зуба является условия заживления открытой костной раны, что накладывает свой отпечаток на исход регенерации. Зачастую регенерация «под сгустком» завершается формированием дефицита костной ткани в зоне повреждения, что является характерной особенностью заживления кости при открытых и осложненных (инфицированных) переломах.

Репаративный остеогенез после трансплантации аутологичной костной ткани при использовании различных методов остеопластики у человека.

Комплексное гистоморфометрическое исследование трепанобиоптатов из аутотрансплантатов костной ткани выявило особенности репаративного остеогенеза в зависимости от формы трансплантата (крошка или блок), а так же в зависимости от условия кровоснабжения ренерата. Так относительный объем костной ткани (BV) в группах с аутотрансплантацией имел достоверные отличия ($p = <0,001$) от других методов. Как видно из рис. 1а относительный объем новообразованной костной ткани в группе аутотрансплантации костной стружки в сочетании с титановой сеткой имел достоверные отличия от других групп ($p = <0,026$), характеризующийся высокой доли новообразованной костной ткани ($BV = 34.8 \pm 7\%$). Так же достоверные отличия по относительной объемной доле новообразованной костной ткани ($p = <0,014$) были обнаружены в группе трансплантации костной стружки в сочетании с костной пластиной ($BV = 25.5 \pm 4.9\%$). В свою очередь достоверных отличий по объему новообразованной костной ткани обнаружено не было между группами с трансплантацией костной стружки в сочетании с глухой мембраной типа Gortex и свободным костным блоком ($p = <0,381$).

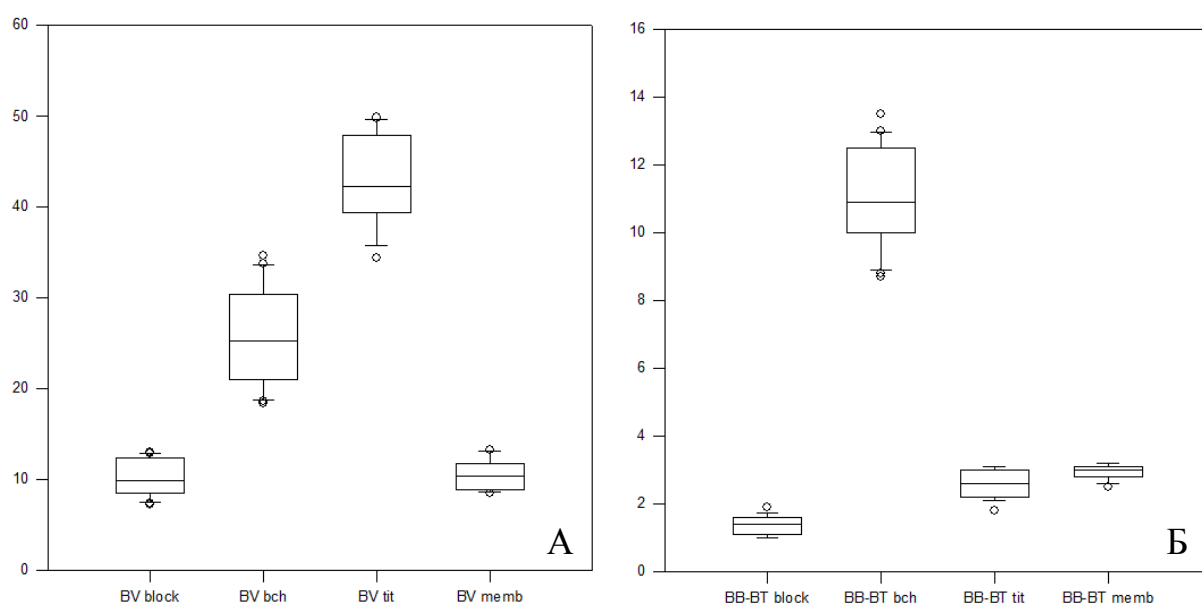


Рисунок 1. А) Сравнительный анализ относительных объемов костной ткани (BV), образовавшейся через 120 дней после трансплантации различных видов трансплантатов. Б) Сравнительный анализ костного баланса (BB-BT), характеризующего остеогенез на поверхности сохранившего жизнеспособность трансплантата через 120 дней после трансплантации различных видов трансплантатов

Оценивая характер остеогенеза в указанных группах максимальная активность остеогенеза на поверхности трансплантата (BB-BT) была выявлена в группе с аутоотрансплантацией костной стружки в сочетании с костной пластиной ($p = <0,011$) на контрольный срок исследования, что свидетельствует о продолжении остеогенеза на указанный срок. Отсутствие достоверной разницы в активности остеогенеза между группами с аутоотрансплантатом в сочетании с титановой сеткой и аутоотрансплантацией в сочетании с глухой мембраной ($p = <0,001$), свидетельствует в пользу стабилизации процессов костеобразования и перехода в фазу перестройки. Наличие достоверной разницы между группой с трансплантацией свободного костного блока с другими группами ($p = <0,001$), свидетельствует об ином характере процесса – низкостимулированном, но не завершённом (рис.1 б).

В свою очередь репаративный остеогенез на поверхности костной ткани с признаками дезорганизации и на несохранившихся жизнеспособных частях трансплантата имел так же характерные черты. Так в группе с аутоотрансплантацией костной стружки в сочетании с костной пластиной репаративный остеогенез на поверхности нежизнеспособной части костного трансплантата проявлял выраженную активность (BB-BD=39,±3,47%), тогда как в группе с трансплантацией костного блока он был выражен слабо. Достоверная разница в активности остеогенеза между группами с трансплантацией блока и костной стружки в сочетании с глухой мембраной ($p = <0,0033$) свидетельствует в пользу различия этих процессов (рис. 2 а).

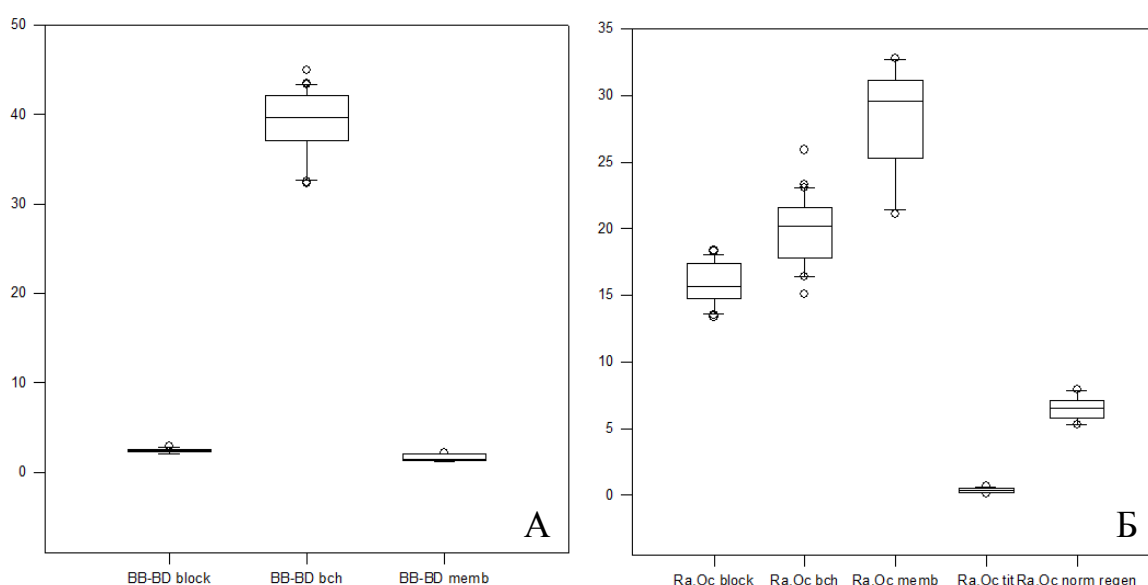


Рисунок 2. А) Сравнительный анализ костного баланса (BB-BD), характеризующего остеогенез на поверхности не сохранившей жизнеспособность трансплантата (BD) через 120 дней после трансплантации различных видов трансплантатов. Б) Сравнительный анализ остеокластической резорбции кости (Ra.Ос), через 120 дней после трансплантации различных видов трансплантатов в сравнении со спонтанной регенерацией

Разница в активности остеокластической резорбции (Ra.Ос) новообразованной костной ткани была выявлена в основном между аутоотрансплантацией костной стружки в сочетании с титановой сеткой и другими группами ($p = <0,001$), где остеогенез еще незавершен. Высокие показатели остеоклазии в группе с аутоотрансплантацией и глухой мембраной имели достоверные отличия практически от всех групп кроме, группы с аутоотрансплантацией костной стружкой и костной пластиной ($p = <0,076$) (рис. 2 б). Указанные особенности могли быть связаны с высокой долей нежизнеспособной костной ткани, которая подвергалась активной резорбции.

Оценивая потенциальные условия микроокружения трансплантата, может быть установлена закономерность, чем лучше условия кровоснабжения трансплантата, тем быстрее активизируется процесс репаративного остеогенеза, в более ранние сроки образуется максимальный объем новообразованной костной ткани, и тем меньше его последующая резорбция. Однако, данное утверждение справедливо лишь при условии дополнительной активации трансплантата, например при фрагментировании, как в исследуемых группах. В свою очередь аутоотрансплантация свободного костного блока, даже в условиях адекватного кровоснабжения приводит к медленной заместительной перестройке трансплантата, вероятно в течение длительного времени. Выявленные особенности течения репаративного остеогенеза в различных типах трансплантатов демонстрируют различия в эффективности образования необходимого объема костной ткани в зависимости от двух основных факторов: 1. Адекватное кровоснабжение, 2. Стимуляция репаративного остеогенеза путем формирования микропереломов (измельчение). Раннее обеспечение кровоснабжения трансплантата из наибольшего количества источников кровоснабжения (надкостница, слизистая оболочка полости рта, внутрикостные артерии) позволяют сохранить жизнеспособность измельченной костной ткани, за счет диффузии окружающей мелкие фрагменты плазмы крови. Формирование плотной сосудистой сети и грануляционной ткани привлекают клетки-предшественники,

которые совокупно с эндостальными клетками трансплантата обеспечивают высокие показатели репаративного остеогенеза. В случае если костный трансплантат не подвергается измельчению (не формируются микропереломы), отсутствует первичная активация клеток эндоста с выбросом цитокинов и морфогенетических белков (BMP2 и др.), то активация процессов остеогенеза идет за счет выделения, некротизирующейся костной тканью, биологически активных молекул, однако, по всей видимости, их недостаточно для стимуляции и дифференцировки скудного количества мультипотентных клеток в ткани. В результате костный трансплантат представлен преимущественно костной тканью с частично сохранённой жизнеспособностью. С течением времени некротизированная ткань утрачивает минеральный компонент, подвергается гладкой резорбции, что клинически проявляется утратой объема костной ткани и недостаточной прочностью трансплантата при установке внутрикостных имплантатов. В случае если измельченная костная ткань не получает адекватное кровоснабжение - перекрытие альвеолярного гребня непроницаемой мембраной, то даже в условиях гиперстимуляции остеогенеза и высвобождения морфогенетических факторов в отсутствии достаточного количества грануляционной ткани, объем новообразованной костной ткани значительно ниже.

Сравнительный анализ репаративного остеогенеза при трансплантации аутогенной и аллогенной ткане-инженерной конструкции.

При сравнительном анализе репаративного остеогенеза при аутотрансплантации кости и тканеинженерной конструкции выявлено, что относительный объем новообразованной костной ткани при аллогенной и аутогенной трансплантации достоверно не отличается от аутотрансплантации костной стружки (в сочетании с титановой мембраной). Учитывая что, образцы костной ткани после аутотрансплантации ТИК были получены из области дна верхне-челюстной пазухи, а аллогенная трансплантация ТИК осуществлялась в область костного дефекта верхней челюсти со стороны полости рта, то анализ данных был проведен с помощью двухфакторного дисперсионного анализа, который не выявил разницу объема новообразованной костной ткани с точки зрения типа клеточного трансплантата ($p=0,81$), но имелись достоверные отличия ($p=0,001$) между положением костного регенерата в области дна верхнечелюстной пазухи и телом верхней челюсти. Анализируя процессы остеокластической резорбции в присутствии остеопластического материала, входящего в

состав тканеинженерной конструкции было выявлено, что имеется достоверная разница материал-ассоциированной костной резорбции (МАКР) при аллогенной и аутогенной трансплантации ($p = <0,0028$) с ее усилением при аллогенной трансплантации, что вероятно связано с повышением антигенной нагрузки (рис. 3). Поскольку сравнительный анализ регенеративного потенциала аллогенной и аутогенной тканеинженерной конструкции с использованием гистоморфометрии у человека проведен впервые, то анализируя результаты, полученные при сравнительном исследовании аутогенных трансплантатов и аллогенных костнопластических материалов следует отметить, что аутогенные клеточные трансплантаты имеют преимущество перед аллогенными [Enneking W.F.-1991, Fontana F. – 2008, Simion M. – 1998, Nissan J. – 2011.].

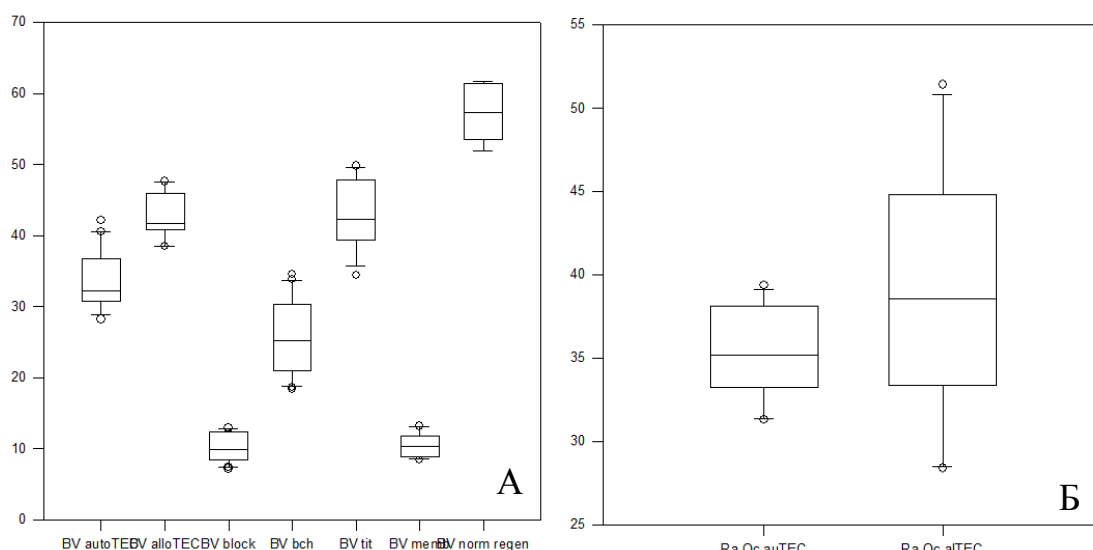


Рисунок 3. А) Сравнительный анализ относительных объемов костной ткани (BV), образовавшейся через 120 дней после трансплантации аутогенной и алло-генной тканеинженерной ТИК и костной аутопластики. Б) Сравнительный анализ остеокластической резорбции кости (Ra.Oc), образовавшейся через 120 дней после аутогенной и аллогенной транс-плантации ТИК

Сравнительный анализ репаративного остеогенеза в зависимости от свойств костнозамещающего материала.

При комплексном гистоморфометрическом исследовании костных регенератов в присутствии остеопластических (костнозамещающих) ксеногенных материалов на основе костного гидроксиапатита, костного гидроксиапатита с добавлением коллагена, деминерализованного костного матрикса, очищенного костного матрикса с сохраненным

естественным минеральным комплексом было выявлено что, остеопластические материалы поддерживают высокий уровень репаративного остеогенеза, обладают остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами в разной мере в зависимости от состава. Процесс регенерации кости в этом случае протекает на фоне хронического воспаления по типу реакции на инородное тело, с усилением процессов резорбции новообразованной костной ткани совместно с остеопластическим материалом, что подтверждается низкими показателями костного баланса при гистоморфометрии. При сравнении с аналогичными показателями при адентии и естественной регенерации, то обнаружено достоверное отличие активности репаративного остеогенеза в присутствии ксеногенных костнозамещающих (osteoplastic materials), демонстрирующее замедление, но не прекращение активации репаративного остеогенеза (рис. 4).

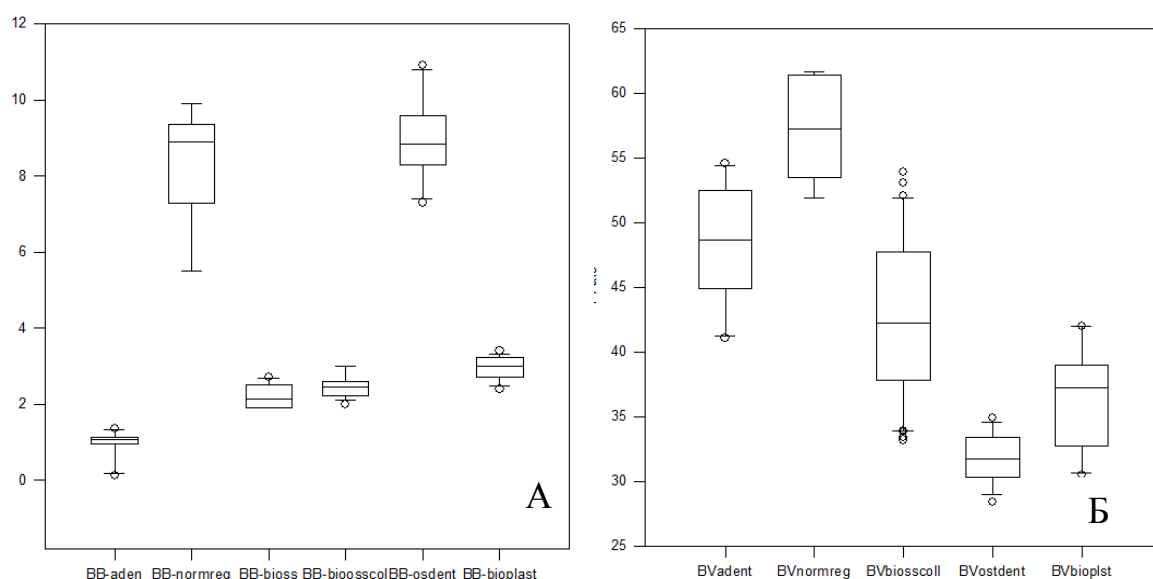


Рисунок 4. А) Сравнительный анализ костного баланса (BB) в костных регенератах при стимуляции костнозамещающими материалами ксеногенного происхождения в сравнении с естественно регенерацией и вторичной адентией. Б) Сравнительный анализ относительного объема костной ткани (BV) в костных регенератах при стимуляции костнозамещающими материалами ксеногенного происхождения в сравнении с естественно регенерацией и вторичной адентией

Сравнительный анализ относительных объемных долей костной ткани выявил достоверные различия в исследованных группах, однако достоверной разницы между

репаративным остеогенезом при стимуляции остеопластическими материалами и естественной регенерации выявлено не было.

В свою очередь макрофагальная реакция, направленная на резорбцию костно-замещающего материала, осуществляется с участием остеокластоподобных клеток в случаях аутотрансплантации костной ткани и имплантации депротенизированного костного матрикса (гидроксиапатита), и остеокластоподобных клеток и гигантских клеток инородных тел в случаях имплантации остеопластических материалов на коллагеновой основе, в том числе и с сохраненной минерализацией (деминерализованные, частичнодеминерализованные). При сравнительной оценке активности резорбции (Ra.Oc) отсутствует достоверная разница между группами с имплантацией ксеногенного депротенизированного костного матрикса и такого же вещества, но с добавлением коллагена. Так же не было достоверной разницы в группах с адентией и нормальной регенерацией, а так же в группах с имплантацией ксеногенных материалов с сохраненной минеральной основой и деминерализованным костным матриксом (рис. 5).

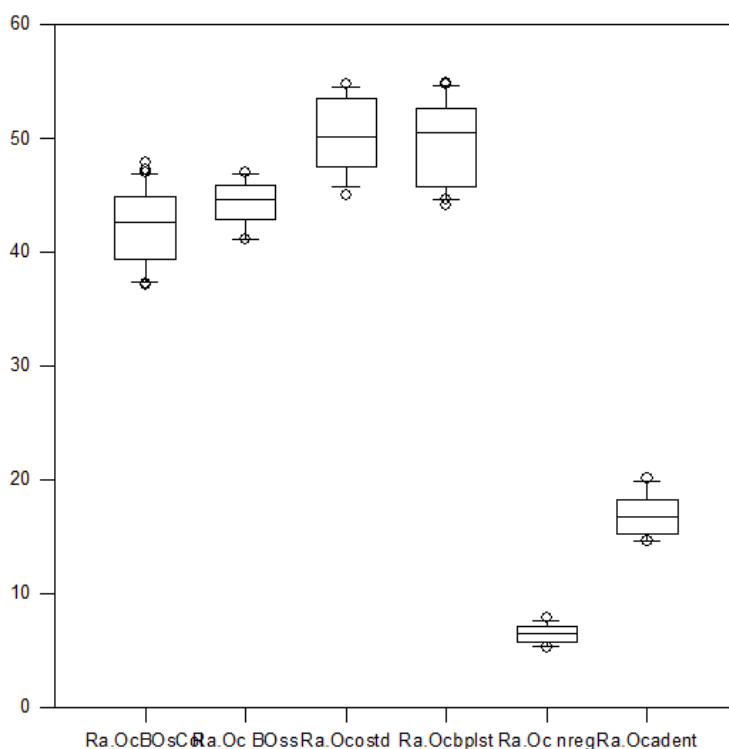


Рисунок 5. Сравнительный анализ остеокластической резорбции (Ra.Oc) в костных регенератах при стимуляции костнозамещающими материалами ксеногенного происхождения в сравнении с естественной регенерацией и вторичной адентией

Очевидно, что резорбция новообразованной кости возникает в присутствии остеопластических материалов вне зависимости от их состава, то есть она не наблюдается при естественной регенерации и перестройке костной ткани. Активность этой костной резорции повышается в присутствии ксеногенных костных материалов, вероятно из-за их низкой очистки, поскольку показатели, характеризующие воспаление (N.Mf) достаточно выражены в этих группах. В свою очередь процесс репаративного остеогенеза при имплантации ксеногенных остеопластических материалов приводит к непрерывной смене процессов остеогенеза и остеорезорбции, что выражается в тонких трабекулах костной ткани с отсутствующими линиями склеивания. Выраженность этого процесса напрямую зависит от биосовместимости материала, чем ниже биосовместимость материала, тем ниже репаративный остеогенез в его присутствии (рис. 5).

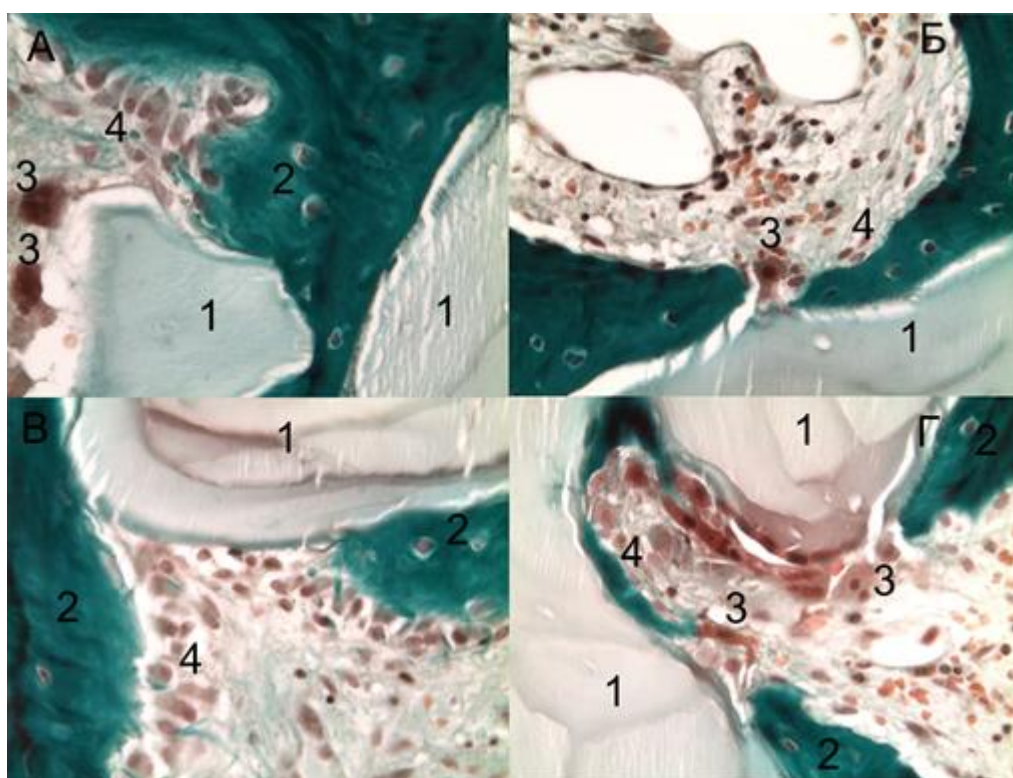
Материал-ассоциированная костная резорбция.

При исследовании взаимоотношения имплантированных материалов с тканями воспринимающего ложа было выявлено что, все материалы вызывают в той или иной степени ответ по типу хронической воспалительной реакции на инородное тело, но в отличие от классического хронического воспаления отсутствуют признаки формирования капсулы вокруг материала. Процесс резорбции материала сопровождается параллельной резорбцией жизнеспособного костного вещества с формированием полей поверхностной остеокластической и лакунарной резорбции, образовании резорбционных туннелей на поверхности контакта новообразованной костной ткани и костно-замещающего материала. В процессе резорбции материала и костного вещества принимают участие макрофагальные клетки остеокластического и гигантоклеточного фенотипа. Фенотип клеток зависит от свойств материала. Параллельная резорбция материала и костного вещества происходит клетками обоих фенотипов. Данное явление можно охарактеризовать как материал-ассоциированная костная резорбция (МАКР).

МАКР на поверхности гранул минерального остеопластического материала («BioOss» и «BioOss-Collagen»), имеющих натуральное происхождение.

При гистологическом исследовании образцов костных регенератов в присутствии минеральных (депротеинезированных, депортеинезированных с добавлением денатуризованного коллагена) остеопластических ксеногенных материалов обнаруживаются клеточные элементы макрофагального ряда напоминающие остеокласты,

располагающиеся как на поверхности кости, так и на остеопластическом материале. Резорбция костно-замещающего материала наблюдается на свободной от костных напластований поверхности, причем за остеокластом часто следуют пролиферирующие остеобласты, наблюдается отложение остеоида – то есть происходит формирование нового костного вещества. В последующем поверх наложения остеоида или уже минерализовавшегося костного матрикса происходит лакунарная резорбция костного матрикса, а затем процесс резорбции переходит и продолжается на поверхности костно-замещающего материала. По достижении остеокластоподобной клетки костно-замещающего материала резорбция новообразованного костного вещества продолжается не вглубь материала, а по его поверхности, захватывая все новые и новые участки напластованной кости вне зависимости от степени ее зрелости (рис. 6). При этом эффективной резорбции материала не происходит, как и не происходит эффективного остеогенеза.



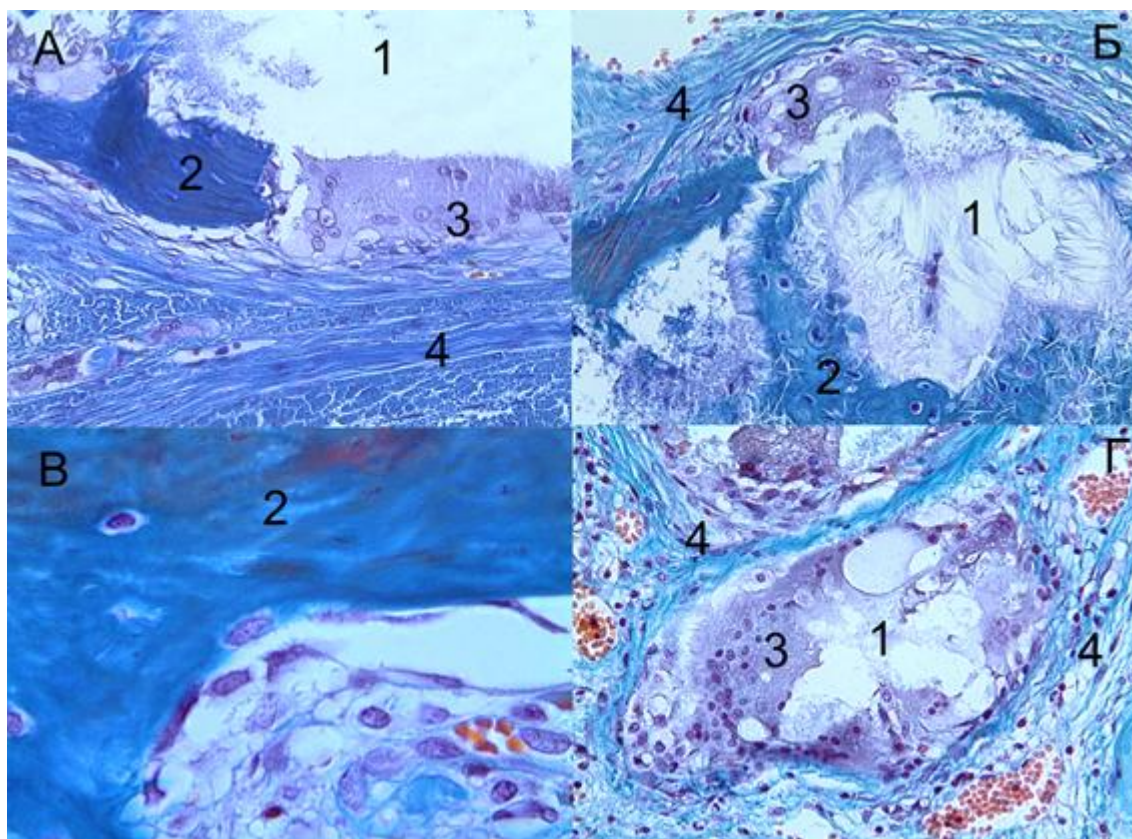
Примечание: А – остеогенез и остеокластоподобные клетки на поверхности гранул материала; Б – туннельная резорбция – остеокластоподобная клетка после резорбции костного вещества достигает поверхности материала; В – остеогенез на поверхности гранулы материала; Г – параллельное существование процессов остеогенеза и

остеоклазии на поверхности гранулы материала: 1 – костнопластический материал; 2 – новообразованная ретикулофиброзная костная ткань; 3 – остеокластоподобные клетки; 4 – активированные остеобласты. Окраска: по Массону – Голднеру. Ув. $\times 400$.

Рисунок 6. Гистологическая картина трепанобиоптата костного регенерата через 180 дней после имплантации остеопластического материала «Bio-Oss»

МАКР при имплантации остеопластических материалов на основе синтетических трикальцийфосфатов.

На поверхности синтетического остеопластического материала на основе октотрикальцийфосфата обнаруживали гигантские клетки инородных тел, обволакивающие кристаллы материала и иногда проникающие в их поры, при встрече с новообразованной костью происходит формирование характерных резорбционных туннелей, сводом которого является новообразованная костная ткань, а основанием костно-замещающий материал. Резорбционная каемка гигантской клетки одновременно обнаруживается как на поверхности материала, так и на поверхности кости (рис. 7).

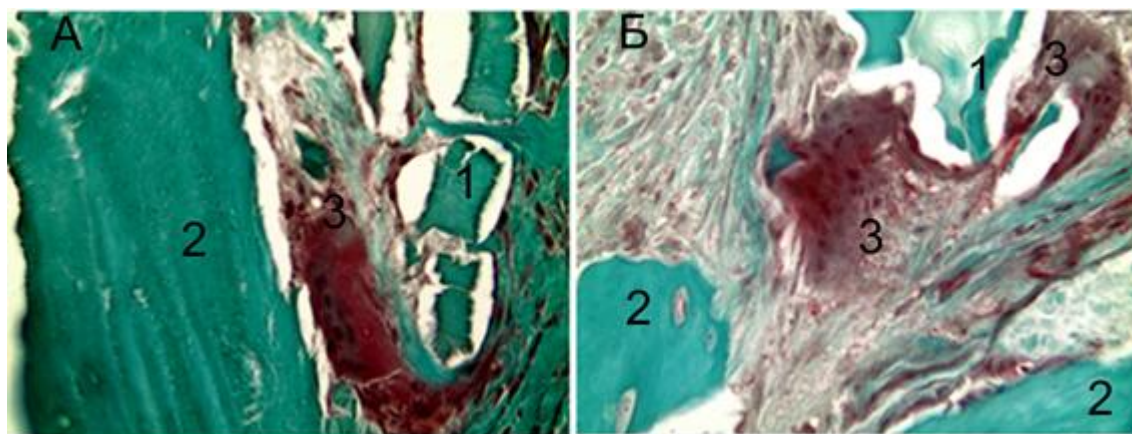


Примечание: А –: одновременная резорбция ГКИТ костного вещества и материала. Ув. $\times 200$; Б – Новый цикл резорбции новообразованной костной ткани на грануле материала. Ув. $\times 200$; В – Выпадение в просвет остеоцитов при туннельной резорбции. Ув. $\times 1000$; Г – Завершение резорбции материала. Вокруг остаточной гранулы ГКИТ. Костная ткань отсутствует. Ув. $\times 200$. 1 – костнопластический материал; 2 – новообразованная ретикулофиброзная костная ткань; 3 – остеокластоподобные клетки; 4 – волокнистая соединительная ткань. Окраска: по Папаниколау.

Рисунок 7 – Фрагмент гистологического среза костного регенерата теменной кости кролика через 90 дней после имплантации ортотрикальций фосфата

МАКР при имплантации деминерализованных костных материалов на основе деминерализованной натуральной кости.

Было выявлено, что описываемое явление появлялось только в случае возникновения гранулематозного воспаления на введенный материал (рис. 8).



Примечание: А –ГКИТ фрагментирует гранулу материала, располагаясь на поверхности новообразованной костной ткани. Ув. $\times 200$; Б – Одновременная резорбция ГКИТ костного вещества и материала. Ув. $\times 400$; 1 – костнопластический материал; 2 – новообразованная ретикулофиброзная костная ткань; 3 – гигантские клетки инородных тел. Окраска: по Массону – Голднеру.

Рисунок 8 – Фрагмент гистологического среза трепанобиоптата коллаген содержащего остеопластического материала:

МАКР при имплантации синтетического полимерного материала на основе полиоксibuтирата в модели дефекта бедренной кости крыс было так же выявлено, что новообразованная и созревающая костная ткань подвергалась резорбции гигантскими клетками инородных тел.

Современные представления о гранулематозном воспалении и гигантоклеточной инфильтрации сходятся во мнении, что каждый вариант клеточной реакции на то или иное событие - будь то реакция на инородное тело, резорбция внеклеточного матрикса после репаративных процессов или остеокластическая резорбция костного матрикса имеют под собой морфофункциональные особенности многоядерных клеток. Однако наши наблюдения демонстрирует нетипичное поведение различных по морфотипу многоядерных клеток в ответ на введение остеопластических материалов. Все они одновременно проявляют свойства и функции остеокластов и гигантских клеток инородных тел, что не согласуется с существующим условным делением производных моноцитов. На наш взгляд параллельный запуск программы остеоклазии и резорбции инородного тела следует искать в пластичности макрофагальных клеток при наличии гиперстимуляции антигенной нагрузкой (инородное тело).

Особенности остеointеграции дентальных имплантатов.

При гистоморфологическом и морфометрическом исследовании образцов костной ткани верхних и нижних челюстей миниатюрных свиней с установленными дентальными имплантатами на различных сроках наблюдения выявлены ряд закономерностей. Так, например, основные параметры остеointеграции BIC и FIC имели статистически значимые различия ($p \leq 0,05$). Поверхность контакта костной ткани с имплантатом (BIC) в группе имплантатов с покрытием имела стабильные хорошие показатели на протяжении всего срока, что обусловлено, вероятно, высоким сродством поверхности имплантата с костной тканью и хорошей остеокондукцией, что подтверждалось микроскопической картиной (рис. 9-12). В группе имплантатов без покрытия, на ранних сроках показатель BIC была не столь высока за счет увеличения площади контакта имплантата с фиброзной тканью (FIC) (рис. 13-16), что может свидетельствовать о хорошей остеointеграции, но невысокой биосовместимости. Параметр прироста костной ткани в области шейки имплантата (NHV), характеризующий остеокондуктивные свойства поверхности имплантата в области шейки демонстрировал более высокие показатели в группе с покрытием, вероятно, это связано с особенностями геометрии имплантата и

распространением области покрытия TiO_2 с кристаллической структурой анатаз (анатазное покрытие диоксида титана распространялось и на шейку). Общие объемные показатели (BV/CV, FbV/CV и MaV/CV) основных структурных компонентов кости в обеих группах не имели статистически значимых различий за исключением срока 6 недель, когда имели место признаки перестройки костной ткани и в связи с этим транзиторное образование соединительной ткани, как недифференцированной, так и фиброзной. Измерение углов отклонений прикрепленных к имплантату трабекул (угол α) губчатой кости выявило разницу между имплантатами с остеопротективным покрытием и без него. Что в комплексе с оценкой толщины трабекул выявило признаки прогрессивного снижения адаптации костной ткани, в результате длительного отсутствия нагрузки на имплантаты.



Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 9 – Гистотопограмма фрагмента альвеолярного гребня верхней челюсти миниатюрной свиньи с установленным дентальным имплантатом КОНМЕТ без покрытия через 2 недели после имплантации



Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 10 – Микропрепарат шлифа фрагмента альвеолярного гребня верхней челюсти миниатюрной свиньи с установленным дентальным имплантатом КОНМЕТ с покрытием TiO_2 через 2 недели после имплантации



Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 11 – Гистотопограмма фрагментов альвеолярного гребня челюсти верхней челюсти с установленными дентальными имплантатами КОНМЕТ спустя 6 недель после имплантации



Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 12 – Микропрепарат шлифа фрагмента альвеолярного гребня верхней челюсти миниатюрной свиньи с установленным дентальными имплантатами КОНМЕТ с покрытием TiO_2 через 6 недели после имплантации



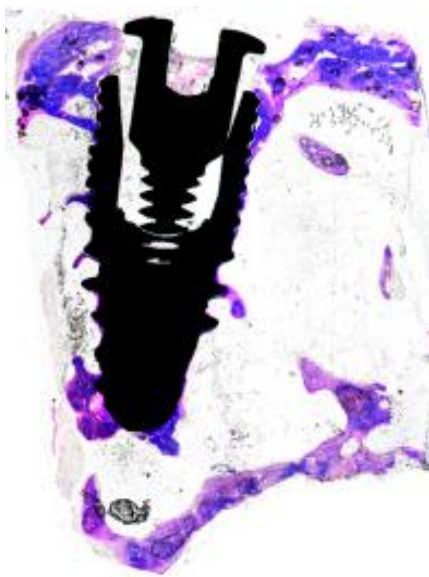
Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 13 – Гистотопограммф фрагментов альвеолярного гребня верхней челюсти с установленными дентальными имплантатами КОНМЕТ спустя 8 недель после имплантации



Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 14 – Гистотопограммы фрагментов альвеолярного гребня челюсти верхней с установленными дентальными имплантатами КОНМЕТ спустя 8 недель после имплантации



Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. Трабекулярный рисунок разрежен (б). Окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50

Рисунок 15 – Гистотопограммы фрагментов альвеолярного гребня верхней челюсти с установленными дентальными имплантатами КОНМЕТ спустя 16 недель после имплантации



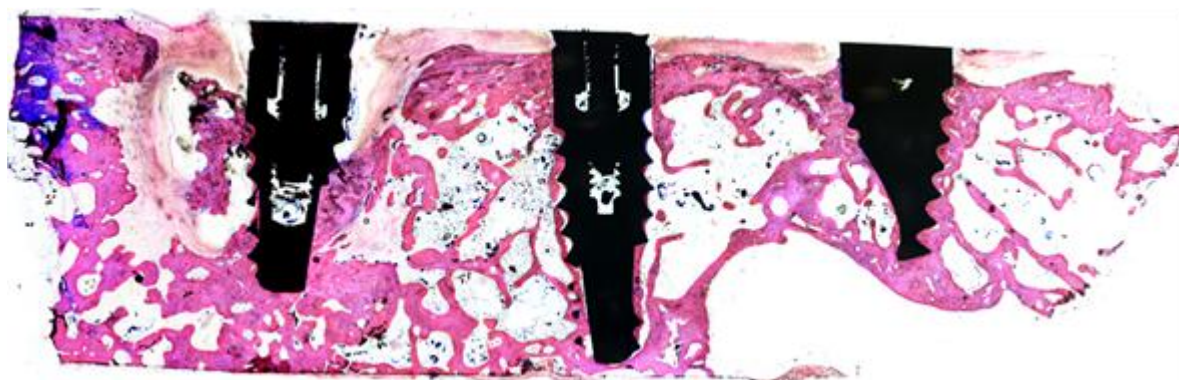
Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 16 – Гистотопограммы фрагментов альвеолярного гребня верхней челюсти с установленными дентальными имплантатами спустя 16 недель после имплантации

Особенности перестройки костной ткани и взаимодействие дентальных имплантатов, соединенных мостовидным протезом.

При гистологическом исследовании шлифов фрагментов челюстей с установленными более года назад дентальными имплантатами разной длины и протезированием их мостовидным протезом (коронки) было выявлено, что образцы, содержащие по три имплантата, имеют различные особенности остеоинтеграции всех трех имплантатов в составе консоли. Так один из краевых имплантатов (меньшей длины) имел признаки пришеечной резорбции, периимплантита вплоть до остеомиелита с частичной секвестрацией некротизированной кости. Сохранившиеся костная ткань с признаками остеосклероза, среди которого прослеживается трабекулярное строение кости. Костные пластинки склерозированного костного матрикса имеют острый угол в отношении к поверхности имплантата, но направлены преимущественно к поверхности гребня челюсти. Контралатеральный (противоположный) имплантат имел вокруг себя утолщенные трабекулы губчатой кости, косоотходящие от его поверхности и расходящиеся в стороны под острым углом. Центально расположенный имплантат так

же имел удовлетворительные характеристики остеоинтеграции, окружен трабекулами с параллельным их ходом в отношении длинника тела верхней челюсти (рис. 17).



Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 17 – Фрагмент верхней челюсти миниатюрной свиньи с установленными дентальными имплантатами. Крайний правый дентальный имплантат с признаками пришеечной резорбции. Гистопантомограмма

Таким образом, жевательная поверхность мостовидного протеза на трех имплантатах различной длины утрачивает одну из точек опоры, в результате чего нагрузка на них дестабилизируется в сторону краевых имплантатов и напоминает детские качели. Выявленные изменения в костной ткани, контактирующей с имплантатами, были изучены с помощью морфометрического анализа.

При морфометрическом исследовании выявлено, что имплантаты с укороченной длиной расположенные с одного из краев консоли имеют удовлетворительные показатели остеоинтеграции ($BIC = 67 \pm 8,8\%$), что свидетельствует о хорошей первичной стабилизации их после установки и до объединения их в консоль. Центральные и контрлатеральные имплантаты имели сопоставимую отличную остеоинтеграцию ($BIC = 80,3 \pm 4,5\%$ и $87 \pm 4,9\%$) имплантатов выбранной системы, поверхность, не контактирующая с костью, взаимодействовала с костным мозгом ($MaIC$). Тогда как у краевого дестабилизированного имплантата неостеоинтерированная поверхность контактировала с воспалительным инфильтратом ($IIIC = 25,9 \pm 14,1\%$) и фиброзной тканью ($FIC = 7,1 \pm 9,1\%$). Определение углов отхождения трабекул губчатой кости от поверхности имплантата была выявлена статистически значимая особенность. Так имплантаты с признаками

дестабилизации имели отрицательные углы по отношению к вертикальной осевой нагрузке ($\alpha = 48 \pm 15,8^0$), тогда как центрально расположенный имплантат имел нейтральные по отношению к длиннику тела челюсти углы ($\alpha = 90 \pm 2,4^0$) и осевой нагрузке, а контрлатеральные положительные значения к вертикальной осевой нагрузке ($\alpha = 163 \pm 12,5^0$).

Таким образом, выявлено, что распределение нагрузки на имплантаты разной длины объединенные в ортопедическую конструкцию (консоль) происходит неравномерно. Присутствие более длинного имплантата в центральной части консоли приводит к развитию дестабилизации конструкции по принципу «детских качелей», что приводит к расшатыванию одного из имплантатов (чаще всего в положении моляров). В свою очередь выявлены адаптивные механизмы организации костной ткани вокруг имплантатов, направленные на удержание и стабилизацию внутрикостных имплантатов под действием осевой (жевательной) нагрузки, посредством уникального расположения костных балок в зависимости от вектора нагрузки в соответствии с законами механостата. Так вокруг краевых имплантатов с вектором нагрузки направленным от центра тела челюсти (отрывная нагрузка) костные балки формируются под углом до 60 градусов, а имплантат, имеющий максимальную нагрузку, направленную к центру тела челюсти, окружен костными трабекулами с сформированными под углом более 100 градусов.

Гистологическое исследование остеоинтеграции дентальных имплантатов объединенных в ортопедическую конструкцию на двух имплантатах.

При гистологическом исследовании шлифов фрагментов челюстей с установленными более года назад дентальными имплантатами одинаковой длины с протезированием их мостовидным протезом было выявлено, что образцы, содержащие по два имплантата, не имеют столь выраженных значимых особенностей как в консоли на основе трех имплантатов. Однако между двумя все же имела некоторая разница, выражающаяся в уплотнении (остеосклерозе) костной ткани вокруг имплантата расположенной в положении моляра и испытывающего наибольшую осевую нагрузку и пришеечной резорбцией вокруг контрлатерального имплантата (рис. 18). Тогда как при морфометрическом исследовании основные показатели остеоинтеграции были сопоставимы.



Примечание: окраска толуидиновый синий/кислый фуксин. X50.

Рисунок 18 – Фрагмент верхней челюсти миниатюрной свиньи с установленными дентальными имплантатами. Крайний левый дентальный имплантат с признаками пришеечной резорбции. Гистопантомограмма

Таким образом, при определении остеоинтеграции внутрикостных имплантатов в составе ортопедических конструкции могут быть выявлены особенности организации костной ткани в ответ на испытываемую ими нагрузку. В случае если в составе ортопедической конструкции использованы внутрикостные имплантаты разной длины, особенно в латеральном и контралатеральном положении, то это может привести к дестабилизации системы и утрате имплантата. Измерение угла α костных трабекул и оси имплантата позволяет выявить характеристики векторов нагрузки на ортопедические конструкции и оценить их распределение. В свою очередь определение толщины трабекул демонстрирует практически полное восстановление губчатой костной ткани под действием нагрузки, передаваемой с жевательных поверхностей коронок мостовидного протеза.

Закономерности и особенности пространственной организации костной ткани вокруг внутрикостных нерезорбируемых имплантатов.

Результатом первичной остеоинтеграции внутрикостных дентальных имплантатов является формирование пластинчатой костной ткани, в той или иной степени находящейся в непосредственном контакте с наружной поверхностью биологически совместимого имплантата. Эта костная структура, имеющее гистологическое и функциональное сходство с кортикальной пластинкой и межкорневой перегородкой альвеолярной части челюсти, в зависимости от нагрузки на имплантат и её векторов претерпевает ряд динамических изменений. Во время процесса остеоинтеграции ненагруженный первично стабилизированный имплантат, а так же нагруженный протезированный имплантат при условиях биосовместимости будут сопровождаться формированием этой структуры. Морфологическими особенностями данной структуры являются прежде всего пластинчатая костная ткань, связанная с кортикальной пластинкой гребня челюсти посредством пришеечного угла, представленная продольными (вдоль оси имплантата) коллагеновыми волокнами, связь костного матрикса с поверхностью тела и витков имплантата, слияние ее с имплантат-ассоциированными костными балками (рис. 19).

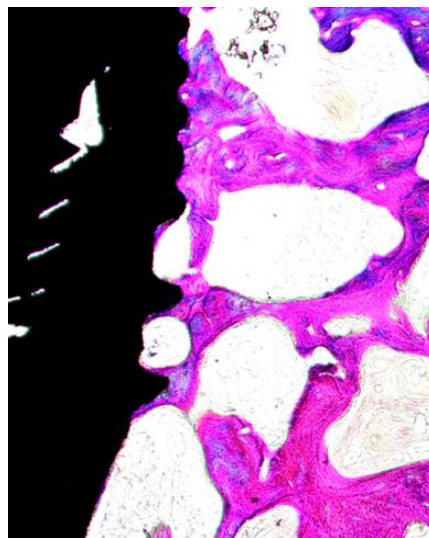


Рисунок 19 - Имплантат ассоциированные костные трабекулы и костная пластинка, формирующаяся вокруг имплантата с признаками атрофии. 16 недель после имплантации, без нагрузки. Окраска толуидиновый синий и фуксин. X50.

Таким образом, комплексная морфометрическая оценка динамики остеоинтеграции дентальных имплантатов в модели вторичной адентии у миниатюрных свиней позволила выявить зависимость типа остеоинтеграции от поверхности имплантата. Динамический гистологический и морфометрический анализ процесса остеоинтеграции

выявил особенности приживления внутрикостных дентальных имплантатов с течением времени и в зависимости от влияния нагрузки.

На начальных этапах репаративного остеогенеза после установки внутрикостных дентальных имплантатов (до 8 недель) преобладают остеобластические процессы: образование достаточного объема костного матрикса вокруг имплантатов, формирование особых трабекул – имплантат-ассоциированные трабекулы (ИАТ). ИАТ контактируют с поверхностью имплантата и сетью трабекул губчатой кости. Завершение первичной стабилизации имплантата характеризуется расположением ИАТ под углом порядка 165° относительно длинника имплантата и 45° относительно продольной оси тела челюсти. Данные изменения костной ткани формируются под действие сил, передаваемых от жевательной нагрузки на основание имплантата. Данный этап остеоинтеграции может иметь название как первичная остеоинтеграция. На более поздних сроках приживления внутрикостных имплантатов (после 8 недель) наблюдается истончение имплантат-ассоциированных трабекул, утеря их связи с трабекулярной сетью губчатой кости, истончением пластинки костной ткани, окружающей имплантат. Данный процесс протекает, по-видимому, по типу гладкой резорбции костной ткани и связан, по теории механостата, с отсутствием адекватной и своевременной нагрузки на имплантат. После протезирования внутрикостного дентального импланта с течением времени вокруг него происходят изменения костной ткани под действием жевательной нагрузки – данный процесс может быть назван адаптивной или вторичной остеоинтеграцией. Вторичная (адаптивная остеоинтеграция) имеет следующие морфологические характеристики: формирование новых и утолщение имевшихся имплантат-ассоциированных костных трабекул как специфический ответ на соответствующую нагрузку (осевая нагрузка, отрыв, «качели»), утолщение костной пластинки вокруг имплантата.

Важное значение в первичной остеоинтеграции внутрикостных имплантатов имеет характер поверхности. Так не модифицированная поверхность имплантата окружается костным регенератом и охватывается им по типу муфты – данный тип первичной остеоинтеграции может быть назван пассивной первичной остеоинтеграцией. В свою очередь остеопротективная, специально подготовленная, поверхность импланта за счет остеокондуктивных ее свойств активно взаимодействует с остеогенными клетками, формирует костные структуры на своей поверхности – данный тип первичной остеоинтеграции может быть назван активной первичной остеоинтеграцией. В результате проведенного гистологического и морфологического исследования определен временной

интервал, наиболее благоприятных гистологических условий для протезирования внутрикостных дентальных: сформированная костная пластинка вокруг имплантата, имплантат-ассоциированные трабекулы сопряжены с костной пластинкой вокруг имплантата, и имеют достаточную толщину, поэтому оптимальным сроком для протезирования может быть определен интервал в 6-8 недель. Ориентация имплантат-ассоциированных трабекул по всей видимости не имеет определяющего значения.

Заключение

Морфологические признаки репаративного остеогенеза при его стимуляции аутооттрансплантатами, тканеинженерными конструкциями, остеопластическими (костнозамещающими) материалами, а также при остеоинтеграции внутрикостных нерезорбируемых имплантатов имеют определенные закономерности и особенности. «Золотой стандарт» регенеративной медицины – аутооттрансплантация костной ткани – может оправдывать свое наименование лишь при определенных условиях, а именно при измельчении костной ткани в костной мельнице и обеспечение зоны регенерации с сохранением как можно большего количества источников кровоснабжения заинтересованной области. Частичное исключение или ограничение васкулогенеза в регенерате, посредством перекрытия области трансплантации мембранами, в том числе и изготовленных из кортикальной кости, приводит к снижению активности репаративного остеогенеза, вплоть до крайне низких его значений. Особенно при исключении из источников кровоснабжения надкостницы или подслизистой основы слизистой оболочки полости рта. В условиях гипоксии происходит частичный некроз костного аутооттрансплантата. Некротизированные фрагменты кости могут в условиях достаточного кровоснабжения явиться индуктором репаративного остеогенеза наряду с живым аутооттрансплантатом. Трансплантация губчато-кортикального свободного костного лоскута приводит к некрозу большей части транспланта без выраженных признаков репаративного остеогенеза. Ишемия зоны регенерации наряду с некрозом костной ткани стимулирует резорбцию трансплантата и его дезорганизацию, что может свести к минимуму эффективность костно-пластической операции. Стимуляция репаративного остеогенеза остеопластическими материалами может быть эффективной, но находится в прямой зависимости от их биосовместимости. Введение в костную рану основных классов и групп остеопластических материалов натурального и синтетического происхождения приводит к развитию материал-ассоциированной костной резорбции – хроническому

воспалительному процессу, текущему по законам реакции на инородное тело и сопровождающемуся резорбцией, как костной ткани воспринимающего ложа, так и новообразованной костной ткани. Процесс резорбции не всегда завершается полной утратой костного вещества в регенерате, а зачастую имеет тенденцию к циркуляции резорбции и нео-остеогенеза. МАКР реализуется как остеокластами, так и гигантскими клетками инородных тел в равной степени. МАКР при имплантации ксеногенных депротенизированных костнозамещающих материалов реализуется остеокластами, а при имплантации синтетических и деминерализованных ксеногенных материалов реализуется преимущественно гигантскими клетками инородных тел. МАКР также имеет свои проявления при ишемии области трансплантации измельченной аутологичной костной крошки. Оценивая в целом МАКР как явление, следует считать, что оно определяет эффективность образования костной ткани в месте стимулированной регенерации костной ткани. Репаративный остеогенез в присутствии внутрикостных нерезорбируемых дентальных имплантатов завершается образованием специфических костных структур вокруг имплантата с удовлетворительными показателями биосовместимости. Костные структуры состоят из пластинчатой костной ткани, образуют костную пластинку по ходу контура имплантата, которая связана с образующимися костными трабекулами. Связанные с костной пластинкой вокруг имплантата костные трабекулы сопряжены, в свою очередь, с трабекулярной сетью губчатой кости тела челюсти. В свою очередь, образование костных структур вокруг имплантатов зависит от биосовместимости поверхности имплантата. В случае длительного отсутствия нагрузки на имплантат происходит истончение костных структур вокруг имплантата и утрата связи связанных с костной пластинкой трабекул с губчатой костью. Нагрузка на имплантат в течение одного года после протезирования его зубной коронкой приводит к утолщению окружающих имплантат костных структур до значений, сопоставимых с показателями на срок 6–8 недель. Адаптивные изменения в трабекулах, связанных с костной пластинкой имплантата, зависят от вектора нагрузки и распределения ее за счет архитектуры поверхности имплантата. Разработанная гистоморфометрическая система оценки репаративного остеогенеза, основанная на принципах стереометрии, для количественной оценки репаративного остеогенеза, костной резорбции и остеointеграции внутрикостных имплантатов позволяет охарактеризовать структурные компоненты костной ткани, динамику остеогенеза и остеоклазии, протекающих в костном регенерате при трансплантации аутологичной костной ткани, тканеинженерных конструкций,

имплантации остеопластических материалов, остеоинтеграции дентальных имплантатов, что, в свою очередь, позволит объективно оценить эффективность и безопасность методов стимуляции репаративного остеогенеза.

Выводы

1. Морфологические признаки репаративного остеогенеза при его стимуляции аутооттрансплантатами, тканеинженерными конструкциями, остеопластическими (костнозамещающими) материалами, а также при остеоинтеграции внутрикостных нерезорбируемых имплантатов имеют определенные закономерности и особенности.

2. Аутооттрансплантация неваскуляризированного (свободного) костного блока в область альвеолярного гребня верхней и нижней челюсти у человека не приводит к более выраженной стимуляции репаративного остеогенеза, по сравнению с другими методами аутооттрансплантации, и сопровождается постепенным замещением трансплантата новообразованной костной тканью, с высокой степенью его резорбции ($Ra.Oc. = 15,6\%$). Стимулятором регенерации является преимущественно несохранившая жизнеспособность часть трансплантата ($BB-BT:BB-BD = 1,4 < 2,4$ у.е.).

3. Аутооттрансплантация фрагментированной костной ткани (костной стружки) у человека приводит к выраженной стимуляции репаративного остеогенеза по сравнению с аутооттрансплантацией костного блока, но при условии максимального сохранения источников кровоснабжения трансплантата (внутрикостных, внекостных) (с перекрытием костной мембраной $BB-BT:BB-BD = 10,9 < 38,7$ у.е.; с перекрытием титановой мембраной $BB-BT:BB-BD = 2,17 > 0$ у.е.). Стимулятором репаративного остеогенеза в этом случае является как сохранившая жизнеспособность часть трансплантата, так и нежизнеспособная его часть (перекрытие костной мембраной $BB-BT:BB-BD = 10,9 < 38,7$ у.е.). В случае полного исключения кровоснабжения со стороны слизистой оболочки происходит общее замедление репаративного остеогенеза (перекрытие мембраной типа Gortex $BT:BB-BD = 2,6 < 1,5$ у.е., $BV = 10,4\%$). Ишемия трансплантата ускоряет его резорбцию (перекрытие костной мембраной $Ra.Oc = 20,2\%$; перекрытие мембраной типа Gortex $Ra.Oc = 29,5\%$).

4. Репаративный остеогенез при аутогенной и аллогенной трансплантации тканеинженерной конструкции на основе стромально-васкулярной фракции жировой ткани, преддифференцированной в остеогенном направлении, у человека не зависит от источника происхождения клеточной культуры (аллогенная или аутогенная)

($BV_{\text{аутоТИК}} = 32,2\%$, $BV_{\text{аллоТИК}} = 41,5\%$, $p = 0,8$). Сохранение объема новообразованной костной ткани при аллогенной трансплантации в большей мере зависит от биологических свойств (биосовместимости) скафолда ($Ra.Oc_{\text{аутоТИК}} = 32,3\%$; $Ra.Oc_{\text{аллоТИК}} = 38,5\%$, $p = 0,01$).

5. Стимуляция репаративного остеогенеза остеопластическими (костнозамещающими) материалами у человека осуществляется через воздействие на остеогенные элементы воспринимающего ложа и сопровождается более выраженной инфильтрацией клетками макрофагального ряда регенерата ($N.Mf_{\text{BioOssCol}} = 18$; $N.Mf_{\text{BioOss}} = 9,8$; $N.Mf_{\text{ОстеодентМ}} = 15,3$; $N.Mf_{\text{Биопласт-дент}} = 16,3$), по сравнению со спонтанной регенерацией ($N.Mf_{\text{спонтанная регенерация}} = 3$), с увеличением инфильтрации при наличии в материале органических соединений (коллагена).

6. Возникающая при имплантации костнозамещающих материалов материал-ассоциированная костная резорбция является следствием внесения в костную рану инородного тела (костнозамещающего материала) и реализуется через активацию клеток макрофагального ряда (остеокластов, гигантских клеток инородных тел) ($Ra.Oc$ до 50 у.е), что приводит к снижению относительного объема костной ткани в регенерате (BV от 17% до 47% в зависимости от материала), и длительной (более 180 дней) задержкой созревания костного регенерата.

7. Результатом имплантации нерезорбируемых внутрикостных имплантатов в альвеолярный отросток челюсти у миниатюрных свиней является формирование вокруг поверхности имплантата характерных функционально взаимосвязанных между собою костных структур, состоящих из костной пластинки, окружающей имплантат, и костных трабекул.

8. Пограничные с имплантатом сформировавшиеся костные структуры изменяются под действием перераспределяемой на них разнонаправленной нагрузки. Костная пластинка изменяет свою толщину (с $Th.Ct_{2\text{нед.}} = 1,2$ мм до $Th.Ct_{16\text{нед.}} = 0,78$ мм), а связанные с ней костные трабекулы – направление, в зависимости от преимущественного вектора нагрузки. В случае продолжительного отсутствия нагрузки на имплантат костные структуры уменьшаются (с $Th.Tr_{2\text{нед.}} = 0,65$ мм до $Th.Tr_{16\text{нед.}} = 0,17$ мм), теряют связь с губчатой костью, начиная с 8-й недели после имплантации, вплоть до частичной утраты, к 16-й неделе, в экспериментальной модели у миниатюрных свиней.

9. Морфология репаративного остеогенеза в присутствии внутрикостных дентальных имплантатов, их остеоинтеграция оптимальны для протезирования зубными коронками в интервале 6–8 недель после имплантации.

10. Морфометрическая система, основанная на принципах стереометрии, для количественной оценки репаративного остеогенеза, костной резорбции и остеоинтеграции внутрикостных имплантатов позволяет охарактеризовать структурные компоненты костной ткани, динамику остеогенеза и остеоклазии, протекающих в костном регенерате при трансплантации аутологичной костной ткани, тканеинженерных конструкций, имплантации остеопластических материалов, остеоинтеграции дентальных имплантатов.

Практические рекомендации

1. Гистологическая оценка эффективности репаративного остеогенеза при использовании методов его стимуляции должна проводиться с применением гистоморфометрического исследования, которое должно включать в себя оценку относительного объема костной и фиброзной ткани, остеопластического (костнозамещающего) материала; определение костного баланса, остеокластической резорбции и количественной характеристике клеток воспаления (макрофагов, гигантских многоядерных клеток).
2. При использовании в качестве стимулирующего агента трансплантата из собственной кости пациента следует измельчать его, например, в костной мельнице, а также обеспечить условия для его максимальной васкуляризации.
3. Применение непроницаемых мембран для отграничения области костной регенерации нежелательно, поскольку возникающий дефицит кровоснабжения негативно скажется на объеме образовавшейся ткани и ее структурной характеристике.
4. При разработке тканеинженерных конструкций на основе остеопрогениторных клеток следует учитывать биосовместимость остеопластического материала, входящего в ее состав, подтвержденную в экспериментальном исследовании. Предпочтение следует отдавать аутогенному происхождению клеточной культуры, поскольку ее аллогенность может потенцировать резорбцию новообразованной костной ткани, и тем самым снизить эффективность лечения.
5. При проведении клинических и экспериментальных исследований эффективности и безопасности остеопластических материалов следует учитывать феномен материал-ассоциированной костной резорбции, как прогностический признак эффективности репаративного остеогенеза. При получении негативных значений остеокластической

резорбции в экспериментальном исследовании, необходимо дорабатывать биосовместимость костнозамещающего материала, прежде чем использовать его в клиническом исследовании.

6. При изучении остеоинтеграции дентальных имплантатов следует определять не только относительную поверхность соприкосновения костного вещества и имплантата, но и давать характеристику толщин костной пластинки, окружающей имплантат, а также костных трабекул с ней связанных. Оптимальной точкой оценки эффективности остеоинтеграции имплантата без нагрузки следует считать 6-8 недель, в условиях нагрузки от 16 недель до 1 года, в зависимости от конкретных задач исследования.
7. Оптимальным временным интервалом для осуществления протезирования дентальных имплантатов следует считать интервал 6-8 недель. Назначение более ранних сроков протезирования имплантатов не подтверждаются зрелостью костного регенерата вокруг него, при более поздних сроках протезирования – остеоинтеграция может протекать на фоне атрофии новообразованной костной ткани вокруг имплантата.

Перспективы дальнейшей разработки темы.

Гистомофометрическая платформа для оценки репаративного остеогенеза открывает широкие перспективы развития не только челюстно-лицевой хирургии, но и всей остеологии. Полученные представления о закономерностях репаративного остеогенеза с использованием различных классов костнозамещающих материалов позволят не только развивать и модернизировать имеющиеся в арсенале врача методы костной пластики, но и разработать подходы к созданию остеопластических материалов нового поколения. Понимание механизмов материал-ассоциированной костной резорбции позволит развить новую отрасль материаловедения, а именно науку о биосовместимости материалов – биоматериаловедение. Полученные знания и выявленные закономерности о динамической остеоинтеграции и приживления внутрикостных имплантатов под нагрузкой позволят разработать математические модели остеоинтеграции, которые в свою очередь послужат отправной точкой в разработке оптимальных инженерных решений при изготовлении внутрикостных имплантатов не только для челюстно-лицевой хирургии, но и травматологии, ортопедии, нейрохирургии, онкологии, детской хирургии, вертебрологии и др.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. А.В. Волков, Б.С. Смбатян, Д.Н. Назарян, А.А. Мураев. Новая морфометрическая номенклатура для оценки остеоинтеграции внутрикостных имплантатов. СТМ, 2018, том 10, номер 3, стр. 7-13.
2. Волков А.В. К вопросу о безопасности остеопластических материалов. Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2015. № 1. С. 46-51.
3. Михайловский А.А., Кулаков А.А., Волков А.В. Сохранение объема костной ткани альвеолярного гребня при симметричной аугментации лунки удаленного зуба: клинικο-морфологическое исследование. Клиническая и экспериментальная морфология. 2015. № 1 (13). С. 8-18.
4. Смбатян Б.С., Волков А.В., Омаров Т.В., Ломакин М.В. Изучение остеоинтеграции имплантатов Конмет с биоактивной поверхностью. Российская стоматология. 2014. Т. 7. № 4. С. 15-24.
5. Алексеева И.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В., Волков А.В., Шураев А.И. Результаты клинικο-экспериментального исследования по использованию комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани для восстановления дефектов костной ткани. Российский биотерапевтический журнал. 2012. Т. 11. № 4. С. 67-69.
6. Алексеева И.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В., Волков А.В., Шураев А.И. Опыт использования тканеинженерной конструкции для увеличения объема костной ткани на верхней челюсти (срок наблюдения до 21 месяца). Российский биотерапевтический журнал. 2012. Т. 11. № 1. С. 75-77.
7. Алексеева И.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В., Волков А.В. Восстановление костной ткани после удаления зубов при использовании тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани. Стоматология. 2012. Т. 91. № 4. С. 32-35.
8. Кулаков А.А., Алексеева И.С., Рачинская О.А., Волков А.В., Гольштейн Д.В. Сравнительная оценка эффективности образования костной ткани при трансплантации тканеинженерной конструкции и остеопластического материала "Bio-Oss" в области дна верхнечелюстной пазухи. Стоматология. 2012. Т. 90. № 6. С. 38.

9. Волков А.В., Бадалян В.А., Кулаков А.А., Бабиченко И.И., Капанадзе Г.Д., Станкова Н.В. Гистоморфологические исследования взаимоотношений костной ткани с дентальным имплантатом Биомедицина. 2012. № 4. С. 96-100.
10. Алексеева И.С., Волков А.В., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. Клинико-экспериментальное обоснование использования комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани челюстей Гены и клетки. 2012. Т. 7. № 1. С. 97-105.
11. Волков А.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Бухарова Т.Б., Хохлов С.Б. Создание индивидуальных трехмерных конструкций для восстановления челюстно-лицевых костных дефектов Пародонтология. 2011. Т. 16. № 4. С. 61-64.
12. Бухарова Т.Б., Арутюнян И.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Федюнина И.А., Логовская Л.В., Волков А.В., Ржанинова А.А., Григорьян А.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и материала "Остеоматрикс" для регенерации костной ткани Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 3. С. 167-173.
13. Кулаков, А. А. Сохранение объема костной ткани альвеолярного гребня при симметричной аугментации лунки удаленного зуба: клинико-морфологическое исследование / А. А. Кулаков, А. В. Волков. А.А. Михайловский // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2015. – № 1 (13). – С. 8–18.
14. Смбатян Б.С., Гольдштейн Д.В., Волков А.В. О клиническом применении нового метода восстановления костной ткани в дентальной имплантологии. метод Фуада Кьюри. Клиническая стоматология. 2010. № 4 (56). С. 38-45.
15. Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В., Григорьян А.С., Ржанинова А.А., Алексеева И.С., Арутюнян И.В., Волков А.В. Клиническое исследование эффективности применения комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани в области верхней и нижней челюсти. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2008. № 4. С. 206-210.
16. А.В.Волков, С.А.Шустров, К.С.Корсаненков, Е.Х.Набиева. Новый метод окраски недекальцинированной костной ткани // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. - №4 (20). – С.55-58.

17. А.В. Волков, А.П. Бонарцев, А.А. Мураев. Р.В. Деев. Материал-ассоциированная костная резорбция, СМТ, 2018, том 10, номер 4, стр. 26-32.
18. Smbatyan B.S., Volkov A.V., Omarov T.V., Lomakin M.V., Tetyukhin D.V., Zolotukhin E.A., Molchanov S.A. Evaluation of implant surface coating bioactivity obtained by atomic layer deposition technique. European Cells and Materials Vol. 29. Suppl. 2, 2015 (page 26).
19. Волков А.В., Большакова Г.Б. Гистоморфометрия костной ткани в регенеративной медицине. Клиническая и экспериментальная морфология. 2013. № 3 (7). С. 65-72.

Аннотация

В представленном диссертационном исследовании было проведено определение особенностей и закономерностей репаративного остеогенеза, а так же связанных с ними патологических процессов при аутологичной трансплантации костной ткани, трансплантации аллогенных и аутогенных тканеинженерных конструкций, различных классов остеопластических материалов у человека. Определены закономерности остеointеграции дентальных имплантатов и определены сроки оптимальной остеointеграции их в экспериментальных условиях.

Для оценки морфологических изменений в костной ткани у человека и лабораторных животных проводили исследование с применением световой микроскопии, классических и специализированных гистохимических окрасок. Было установлено, что репаративный остеогенез имел гистоморфологические отличия в зависимости от типа и размера аутоотрансплантата, источника клеточной культуры (аллогенная или аутогенная) в составе тканеинженерной конструкции, класса остеопластического материала. Так же было установлено, что результатом остеointеграции дентальных имплантатов является формирование вокруг него специфических костных структур связанных с кортикальной пластинкой и губчатым веществом кости. Оптимальным сроком протезирования внутрикостных дентальных имплантатов является временной интервал 6-8 недель (по данным экспериментального исследования), совпадающий со зрелостью костных структур вокруг имплантата. Достоверность различий между группами подтверждена в ходе морфометрического исследования, на базе специально разработанной для этого гистоморфометрической системы, и последующего статистического анализа. Трансплантация собственной костной ткани, целью восполнения дефицита ее в области верхней или нижней челюсти у человека, приводит к максимальной стимуляции репаративного остеогенеза при условии измельчения трансплантата и обеспечения кровоснабжения воспринимающего ложа. Применение ксеногенных остеопластических материалов в составе тканеинженерных конструкции в сочетании с аллогенной клеточной культурой остеогенных клеток-предшественников потенцирует материал-ассоциированную костную резорбцию. Материал-ассоциированная костная резорбция – патологический процесс, реализующийся посредством воспалительной реакции на инородное тело, возникающей вследствие внесения в костную рану остеопластических (костнозамещающих) материалов (скафолдов), сопровождающейся резорбцией костной ткани в области регенерации, реализующейся остеокластами или гигантскими клетками

инородного тела в зависимости от класса материала. Материал-ассоциированная костная резорбция характерна как для человека, так и для лабораторных животных (крыса, кролик). Образующиеся вокруг внутрикостных дентальных имплантатов специфические костные структуры изменяются с течением времени и их изменения зависят от действующей на них разновекторной нагрузки.

Abstract

In the presented dissertation research, the features and regularities of reparative osteogenesis, as well as associated pathological processes in autologous bone transplantation, transplantation of allogeneic and autogenous tissue engineering structures, various classes of osteoplastic materials in humans were determined. The regularities of osseointegration of dental implants are determined and the terms of their optimal osseointegration in experimental conditions are determined.

To assess the morphological changes in bone tissue in humans and laboratory animals, a study was carried out using light microscopy, classical and specialized histological colors. It was found that reparative osteogenesis had histomorphological differences depending on the type and size of the autograft, the source of cell culture (allogeneic or autogenous) in the composition of tissue engineering design, the class of osteoplastic material. It was also found that the result of osseointegration of dental implants is the formation around it of specific bone structures associated with the cortical plate and spongy bone substance. The optimal period of prosthetics of intraosseous dental implants is a time interval of 6-8 weeks (according to the experimental study), coinciding with the maturity of bone structures around the implant. The significance of the differences between the groups was confirmed in the morphometric study, based on a specially developed histomorphometric system, and subsequent statistical analysis. Transplantation of own bone tissue, with the aim of filling its deficit in the upper or lower jaw in humans, leads to the maximum stimulation of reparative osteogenesis, provided that the graft is crushed and the blood supply to the receiving bed is provided. The use of xenogenic osteoplastic materials in the composition of tissue engineering structures in combination with allogeneic cell culture of osteogenic precursor cells potentiates the material-associated bone resorption. Material-associated bone resorption-a pathological process that is realized by means of an inflammatory reaction to a foreign body that occurs due to the introduction of osteoplastic (bone-

substituting) materials (scaffolds) into the bone wound, accompanied by bone tissue resorption in the regeneration area, realized by osteoclasts or giant cells of a foreign body, depending on the class of material. Material-associated bone resorption is typical for both human and laboratory animals (rat, rabbit). The specific bone structures formed around the intraosseous dental implants change over time and their changes depend on the multi-vector load acting on them.