

С.В. Сирак¹,
д.м.н., профессор, зав. кафедрой
стоматологии

С.П. Рубникович²,
д.м.н., профессор, зав. кафедрой
ортопедической стоматологии
и ортодонтии с курсом детской
стоматологии

Л.А. Григорьянц³,
д.м.н., зав. кафедрой стоматологии

М.М. Гарунов³,
старший лаборант кафедры стоматологии

М.О. Диденко¹,
аспирант кафедры гистологии

З.М. Кочкарова¹,
аспирант кафедры гистологии

А.А. Андреев¹,
аспирант кафедры стоматологии

Влияние гидроксиапатита кальция и β -трикальцийфосфата, модифицированных гиалуроновой кислотой, на регенерацию костной ткани альвеолярного отростка челюсти при экспериментальном периимплантите

Работа проведена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ на научные исследования и разработки по теме «Изучение механизмов регенерации при использовании новых биоинженерных конструкций на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток и материалов-матриц различного происхождения» совместно с Всероссийским НИИ овцеводства и козоводства и Ставропольским государственным аграрным университетом.

¹ СтГМУ

² Белорусская медицинская академия
последипломного образования, Минск

³ РУДН

Резюме. В статье представлены результаты исследования морфологических особенностей регенерации костной ткани экспериментальных животных с использованием гидроксиапатита кальция (ГП) и трикальцийфосфата (ТКФ), модифицированных гиалуроновой кислотой на модели периимплантита. Установлена высокая эффективность совместного использования ГП и ТКФ с гиалуроновой кислотой, благодаря стимулированию нео- и ангиогенеза периимплантных тканей, ускоренной регенерации послеоперационного дефекта челюсти с наименьшим количеством осложнений.

Ключевые слова: регенерация, гидроксиапатит кальция, трикальцийфосфат, гиалуроновая кислота, периимплантит

Summary. The article presents the results of the study morphological features of bone regeneration in experimental animals with the use of calcium hydroxyapatite (GP) and tricalcium phosphate (TCP), modified hyaluronic acid on the model of peri-implantitis. The high efficiency of the combined use of GP and TCP with hyaluronic acid was established, due to the stimulation of neo- and angiogenesis of peri-implant tissues, faster regeneration of postoperative jaw defect with the least number of complications.

Key words: regeneration, calcium hydroxyapatite, tricalcium phosphate, hyaluronic acid, periimplantitis

Воспаление тканей вокруг дентального имплантата (периимплантный мукозит и периимплантит) — неприятное и опасное осложнение, ведущее сначала к резорбции кости, а затем и к последующей потере всей имплантированной конструкции [1, 2]. Основной задачей врача становится не только устранение причины заболевания и купирование воспалительных явлений, но и борьба за сохранение жевательной функции, которая обеспечивается функциональной стабильностью установленного имплантата [3, 4]. Для поддержания этой стабильности и восстановления утраченной кости используют различные методы стимулирования

репаративной регенерации [5–7]. Однако регенерация костной ткани челюстей нередко протекает очень медленно, иногда при этом остаются большие дефекты кости вокруг имплантата, заполненные не новообразованной костной, а рыхлой соединительной, фиброзной рубцовой тканью [8–10].

Исследователей особо интересует стимуляция заживления костных ран периимплантных тканей, для которой предлагается замещение кости различными материалами [11, 12]. Преимуществом гидроксиапатита кальция (ГП) и β -трикальцийфосфата (ТКФ) является отсутствие выраженных антигенных свойств, при этом указанные

остеопластические материалы, обладая большой биологической активностью, значительно стимулируют регенерацию ткани, выступая в роли каркаса для роста сосудов и нервов [13, 14]. Особый интерес представляет возможность совместного использования ГП и ТКФ с гиалуроновой кислотой, которая, по данным ряда исследований, способна в такой комбинации стимулировать нео- и ангиогенез периимплантных тканей [15, 16].

Цель исследования — сравнительное морфологическое изучение динамики формирования регенерата при введении в периимплантную область ГП и ТКФ, модифицированных гиалуроновой кислотой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 14 баранах северокавказской породы, массой 22,5–30 кг. Животных содержали в обычных условиях загона на привычном для них пищевом рационе. Всем животным под внутривенным рометаровым наркозом производили установку винтовых дентальных имплантатов Endure (США) в боковом отделе нижней челюсти. Для этого после дополнительной местной инфильтрационной анестезии 4% раствором артикаина гидрохлорида с адреналином 1:100 000 производили разрез слизистой оболочки (рис. 1, а) и отслаивали полный слизисто-надкостничный лоскут (рис. 1, б), трепанационной фрезой нарезали резьбу в кости и устанавливали дентальный имплантат (рис. 1, в). Особенность установки имплантатов по плану эксперимента состояла в том, чтобы сразу сформировать недостаток костной ткани в пришеечной части имплантатов, для чего последние недокручивали на 5–6 оборотов резьбы, дополнительно удаляя фиссурной фрезой 2–3 мм кортикальной кости. В основной группе (10 животных, 40 имплантатов) сформированный таким образом дефект вокруг имплантата заполняли композицией

из ГП (III подгруппа исследования) и ТКФ (IV подгруппа исследования), модифицированных гиалуроновой кислотой (рис. 1, з). Для этого перед внесением в рану ГП и ТКФ помещали в стерильную чашку Петри и депонировали в гиалуроновой кислоте в течение 15 минут. На противоположной стороне нижней челюсти по аналогичной методике дефекты вокруг установленных дентальных имплантатов заполняли ГП (I подгруппа исследования) и ТКФ (II подгруппа исследования) без гиалуроновой кислоты. После установки заглушек рану изолировали нерезорбируемой репереновой мембраной Cytoplast Regentex GBR-200 (США), выкраивая хирургическими ножницами по форме дефекта, и ушивали узловыми швами. В контрольной группе животных (4 животных, 8 дентальных имплантатов) воспроизведенный по вышеописанной методике костный дефект вокруг дентальных имплантатов вели под кровяным сгустком.

Через 14 суток, 1, 3 и 6 месяцев под общим обезболиванием дентальные имплантаты отделяли от окружающих тканей и удаляли вместе с подлежащей костной тканью, рану ушивали.

Имплантаты вместе с костной тканью фиксировали в 10% растворе забуференного формалина. Декальцинацию проводили в 5% растворе трихлоруксусной кислоты с ежедневной сменой раствора и проводили через банки спиртов восходящей плотности (50, 60, 70, 80 и 96%). Блоки заливали в парафин и готовили серийные срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори и по Ван-Гизону. Помимо изучения качественных характеристик регенерата, определяли морфометрические его показатели с помощью программы Видео Тест-Мастер Морфология 4.0 (Россия).

Данные подвергали статистической обработке с применением однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественных сравнений Ньюмена — Кейсла. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Рентгенологическое исследование выполняли с использованием высокочастотного рентгенологического аппарата Evolution с моноблоком ОХ/70-3 (Италия) и мобильного радиовизиографа Mercury DIGISENS (Италия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований, проведенных в ходе выполнения опытно-конструкторской работы по формированию экспериментальной модели периимплантита, подтвердили возможность эффективного воспроизведения патологии без ущерба для жизнедеятельности животного, гарантируя высокую точность полученных научных данных, носящих прецизионный характер.

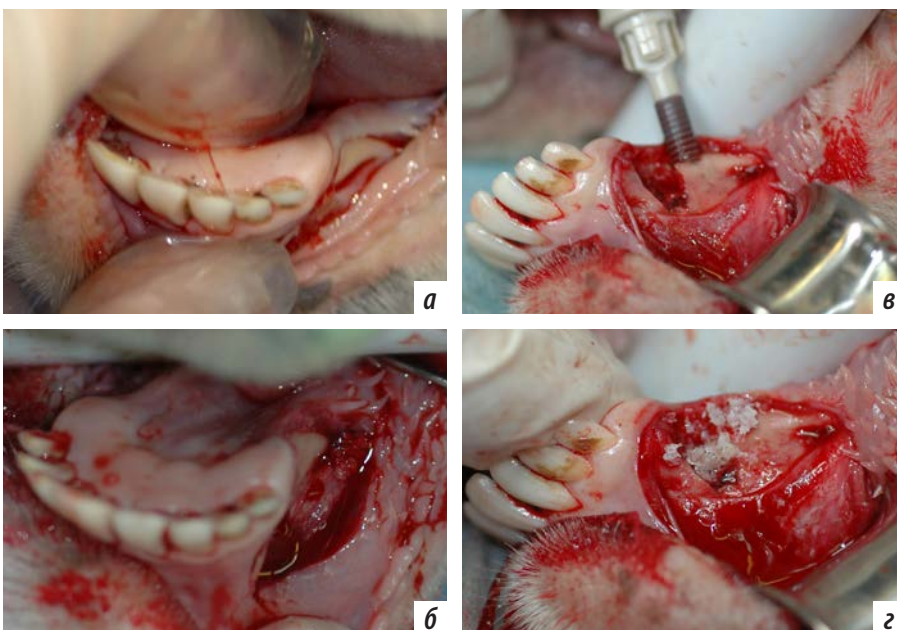


Рис. 1. Хирургический этап

Рентгенографическое исследование сразу после операции показало, что имплантаты установлены соосно, минимальная толщина кортикальной кости в вестибулярном и язычном отделах — 2 мм (рис. 2, а), минимальное расстояние между двумя имплантатами — 4 мм (рис. 2, б), структуры нижнего альвеолярного нерва не затронуты (рис. 2, в).

Рентгенологическое исследование через 7 суток показало, что пришеечный дефект в периимплантной области заполнен фрагментами гранул остеопластического материала различной величины и очертаний. Вследствие интерпозиции гранул дефект кортикальной кости вокруг шеек имплантатов контурировался нечетко. Через 1 месяц после операции за счет рассасывания гранул их тени стали менее интенсивными, очертания фрагментов потеряли четкость (рис. 2, г).

Через 3 месяца после операции вокруг имплантата видна интенсивная тень костного регенерата (рис. 2, д), а весь бывший дефект выполнен регенерирующей костью. Следует отметить, что кортикальная кость альвеолярного края челюсти недостаточно плотна; это единственное место, по которому можно определить ширину первоначально созданного дефекта. Через 6 месяцев дефект вокруг имплантата полностью замещен новообразованной костью. Хорошо различается ее петлистая структура. В области альвеолярного края челюсти кортикальная кость уже достаточно плотная. На рентгенограмме, сделанной спустя 6 месяцев после операции, определяется, что на месте бывшего дефекта имеется не отличающаяся от окружающей кости хорошо кальцифицированная петлистая новообразованная костная ткань; альвеолярный край челюсти полностью сформирован. Рентгенологические исследования контрольной группы показали более медленную регенерацию кости. Полного замещения бывшего костного дефекта, созданного вокруг установленного имплантата костью петлистой структуры, не отличающейся от окружающей кости, через 6 месяцев после операции не происходило.

Среди осложнений заживления костной раны у животных основной группы следует отметить прогрессирующую деструкцию костной ткани с последующим патологическим переломом нижней челюсти (у 1 животного). Среди осложнений интеграции внутрикостного имплантата в контрольной группе наблюдались деструкция прилежащей к имплантату костной ткани и как следствие дальнейшего течения патологического процесса патологический перелом с потерей имплантата (у 2 животных).

Результаты гистологического исследования также подтвердили эффективность разработанного способа получения модели хронического периимплантита, исключавшего операционную травму, обеспечивающего повышение достоверности патологического процесса у подопытных животных, сходного по патоморфологическим проявлениям с периимплантитом у человека.

Через 2 недели после имплантации в контрольной группе наблюдали гистологическую картину, характерную для локального воспаления при периимплантите.

На фоне пониженной плотности костной ткани неравномерной окраски отчетливо просматриваются лакуны с остеоцитами полигональной формы. Содержание Са и Р в исследуемой зоне челюстной кости составило $9,53 \pm 0,44$ и $7,82 \pm 0,93\%$ ($p > 0,05$) соответственно. Повсеместно отмечается дезориентация трабекулярного строения костных балочек, находившихся в контакте с поверхностью имплантата, с преимущественной дифференцировкой клеток путем фиброгенеза с последующей метаплазией в хрящевую и костную ткани (до 30% исследуемых препаратов контрольной группы). Транспозиция имплантата в группе контроля происходила одновременно с резорбцией костной ткани и заполнением окружающего имплантат пространства рыхлой соединительной или хрящевой тканью (рис. 3, а).

В эти же сроки наблюдения в препаратах основной группы на фоне клинически безупречной интеграции имплантата отмечена незначительная периостальная воспалительная реакция, сопровождавшаяся мелкоклеточной инфильтрацией с репродукцией и пролиферацией остеоцитов, гистиоцитов, фиброцитов, лимфоидных и эндотелиальных клеток. Характерным являлось уменьшение остеобластического слоя с дифференцировкой большинства клеток в препаратах основной группы в сторону образования остеоидной ткани. В препаратах отмечено умеренное прокрашивание костного матрикса, незначительное повышение плотности костной ткани: содержание Са и Р в исследуемой зоне кости составило $14,83 \pm 2,98$ и $15,75 \pm 1,66\%$ ($p > 0,05$) соответственно.

Через 1 месяц после оперативного вмешательства ни в одной группе не отмечено полной остеоинтеграции имплантата, выразившейся в образовании остеогенного дифферона. На границе с поверхностью имплантата в I и II подгруппах выявлена слабовыраженная клеточная инфильтрация, сопровождавшаяся формированием пучков грубоволокнистой соединительной ткани, на удалении от резбовой поверхности имплантата наблюдался отек с незначительной лейкоцитарной инфильтрацией и заполнением костномозговых пространств слабопрокрашивающимися нежными новообразованными коллагеновыми волокнами (рис. 3, б).

В III и IV подгруппах к данному сроку наблюдения матрикс кости окрашен неравномерно, в межтрабеку-

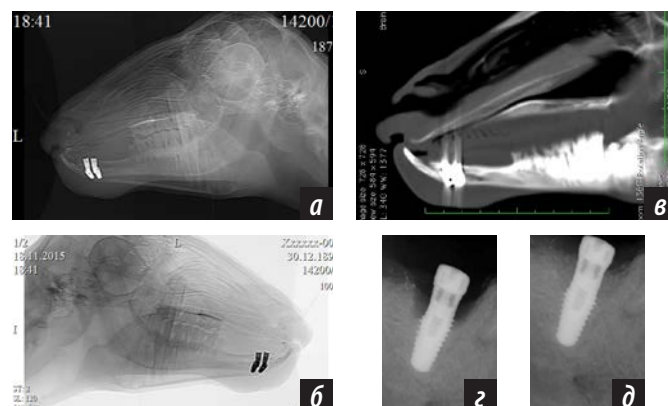
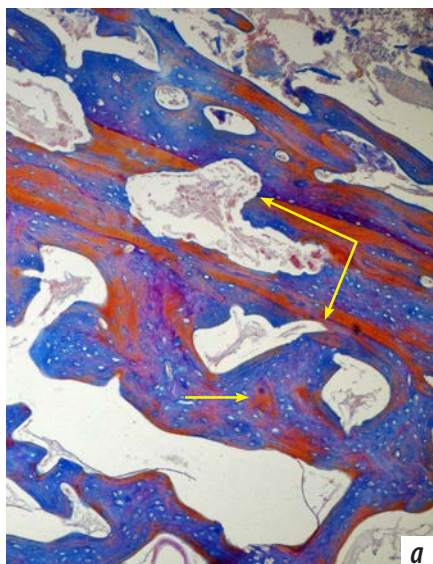


Рис. 2. Рентгенологическое исследование

лярном пространстве выявляются пучки грубоволокнистой соединительной ткани (рис. 3, в). Содержание в кости нижней челюсти Ca и P в III и IV подгруппах составило $18,26 \pm 1,23$ и $17,66 \pm 2,09\%$ и $19,89 \pm 0,72$ и $16,56 \pm 0,34\%$ соответственно, что статистически достоверно не отличалось от данных минерализации ко-

сти, полученных у интактных животных ($18,48 \pm 1,25$ и $19,45 \pm 0,33\%$ соответственно).

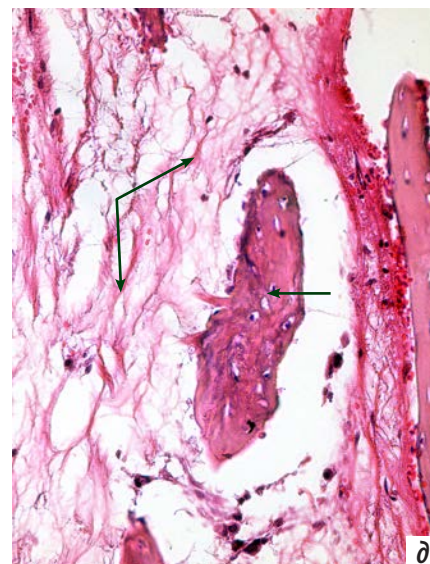
Через 3 месяца после операции в контрольной группе в месте дефекта вокруг имплантата располагается бесструктурная аморфная масса, состоявшая из фибрина и крови с наличием костных осколков, в то же время



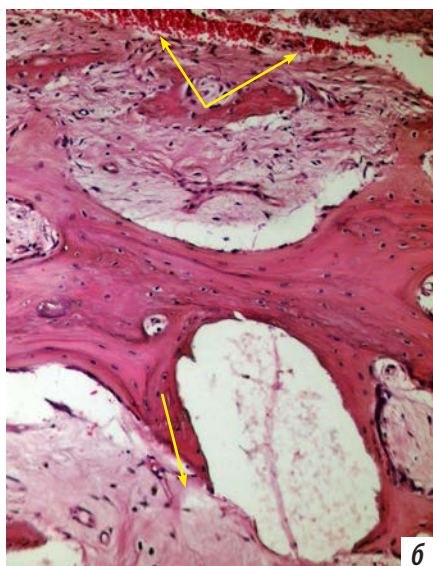
Контрольная группа: изменение формы лакун (отмечено двойной стрелкой), резорбция костной ткани вокруг имплантата с заполнением межтрабекулярных промежутков рыхлой соединительной тканью (отмечено одинарной стрелкой). Окраска по Маллори, ув. 200



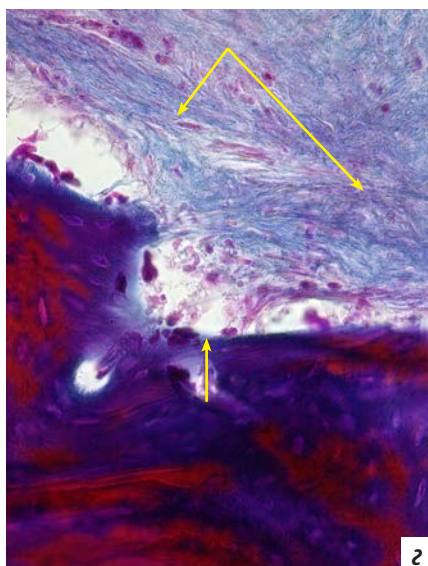
Основная группа (ГП и ТКФ, модифицированные ГК): неравномерная окраска матрикса кости (отмечено одинарной стрелкой), снижение количества лакун и остеоцитов на фоне слабовыраженной резорбции костной ткани и явлений метаплазии (двойная стрелка). Окраска по Маллори, ув. 200



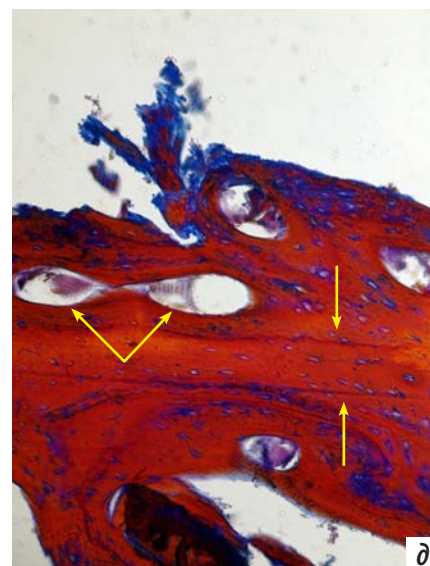
Контрольная группа: снижение плотности костной ткани (отмечено двойной стрелкой), массивная костная трабекула (отмечено одинарной стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400



Основная группа (ГП и ТКФ): утолщение фиброзного слоя (отмечено одинарной стрелкой), лейкоцитарная инфильтрация и отек (отмечено двойной стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400



Основная группа (ГП и ТКФ, модифицированные ГК): новообразованная нежная волокнистая соединительная ткань и полнокровные сосуды (двойная стрелка) в пространстве между резьбой имплантата и костью (одинарная стрелка). Окраска по Маллори, ув. 200



Основная группа (ГП и ТКФ, модифицированные ГК): формирование силовых распорок из костных трабекул (отмечено одинарной стрелкой), эрозивные лакуны в кости (отмечено двойными стрелками). Окраска по Маллори, ув. 200

Рис. 3. Микрофото фрагментов челюстной кости, удаленной из перимплантной зоны у экспериментального животного на 14-е сутки (а), через 1 (б, в), 3 (г) и 6 (д, е) месяцев после операции

со стороны периоста хорошо различаются формирующиеся балочки регенерирующей кости. Большая часть мелких фрагментов костных обломков резорбировалась и замещена остеоидными и молодыми костными балочками с отчетливо различными остеоцитами. По периферии костных балочек располагается цепочка остеобластов, свидетельствующих об активном костеобразовании; кровеносные сосуды резко полнокровны.

Через 3 месяца в I и II подгруппах на месте дефекта видны как уже сформированные, так и формирующиеся костные балочки, местами довольно широкие. Они напластовываются на компактную кость челюсти, образуя с этой последней единое целое. Костномозговые пространства заполнены клеточно-волокнистой, местами хрящевой тканью и полнокровными сосудами, однако наряду с вполне сформированными костными балочками встречаются костные трабекулы, сохраняющие первоначальный остеоидный вид.

Через 3 месяца в III и IV подгруппах остеопластический материал целиком замещен регенерирующей костью с вполне сформированными костными балочками, отчетливо видны остеоциты, костномозговые пространства заполнены нежной волокнистой соединительной тканью и полнокровными сосудами, причем последние целиком выполняют пространство между резьбой имплантата и костью (рис. 3, з).

Спустя 6 месяцев после операции в большей части (65%) препаратов контрольной группы на месте дефекта располагается вполне зрелая, имеющая мозаичное строение костная ткань с хорошо выраженными остеоцитами, гаверсовыми каналами и костномозговыми

пространствами, в которых располагаются полнокровные сосуды. В другой части препаратов (35%) наблюдалась пониженная плотность кости на фоне клеточной инфильтрации и отека со стороны периоста. Частичная резорбция костной ткани вокруг имплантата происходила на фоне резкого полнокровия сосудов и появлением единичных остеоцитов с пикнотическими ядрами в деформированных лакунах (рис. 3, д).

По истечении 6 месяцев после операции в серии препаратов основной группы видна мощная компактная кость с многочисленными гаверсовыми каналами. Патогистологическое исследование показало, что наблюдалось ускоренное построение кости, более интенсивное и быстрое, чем при ведении раны под кровяным сгустком, перестройка новообразованной кости происходила значительно раньше. Спустя 6 месяцев после операции на месте дефекта располагалась вполне зрелая, имеющая мозаичное строение, костная ткань с хорошо выраженными остеонами (рис. 3, е).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение в периимплантную область ГП и ТКФ, модифицированных гиалуроновой кислотой, способствует сравнительно более быстрой регенерации послеоперационного дефекта челюсти. Можно заключить, что регенерация кости в дефекте челюсти при применении ГП и ТКФ, модифицированных гиалуроновой кислотой, шла скорее и с меньшим количеством осложнений, поэтому данная методика может быть рекомендована для применения в клинике.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Борисенко А.В., Кодлубовский Ю.Ю., Вум В.В. Гистологическое исследование регенерации костной ткани нижней челюсти при воздействии трикальций фосфата и гиалуроновой кислоты. — *Вестник стоматологии*. — 2015; (1): 6—10.
2. Чумакова Ю.Г., Николаенко Т.В. Влияние геля, содержащего 0,2% гиалуроновую кислоту, на процесс ремоделирования костной ткани челюстей крыс при экспериментальном пародонтите. — *Вестник стоматологии*. — 2015; (3): 29—33.
3. Ефимович О.И. Использование препаратов гиалуроновой кислоты в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта. Обзор литературы. — *Клиническая стоматология*. — 2018; (1): 28—33.
4. Oliveira F.S., Pinfieldi C.E. et al. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon. — *Lasers Surg Med*. — 2009; 41 (4): 271—6.
5. Sirak S.W., Entschladen F., Shchetinin E.W., Grimm W.D. Low-level laser irradiation (810 nm) with toluidinblue photosensitizer promotes proliferation and differentiation of human oral fibroblasts evaluated in vitro. — *Journal of Clinical Periodontology*. — 2015; 42 (S17): 328a—328.
6. Петров И.Ю., Ларионов Е.В. и др. Морфогистохимические исследования остеопластического материала на основе гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и недеминерализованного костного коллагена для восстановления костных дефектов в эксперименте. — *Вестник новых медицинских технологий*. — 2018; (3): 41—6.
7. Ивашенко С.В. Минеральный состав костной ткани челюсти кролика после фонофореза кальцийсодержащих веществ в эксперименте. — *Медицинский журнал*. — 2009; (2): 51—4.
8. Grimm W.D., Dannan A., Giesenhagen B., Schau I., Varga G., Vukovic M.A., Sirak S.V. Translational research: palatal-derived ecto-mesenchymal stem cells from human palate: a new hope for alveolar bone and craniofacial bone reconstruction. — *Int J Stem Cells*. — 2014; 7 (1): 23—9.
9. Hsieh Y.L. et al. Analgesic effects of transcutaneous ultrasound nerve stimulation in a rat model of oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and cold allodynia. — *Ultrasound Med Biol*. — 2017; 43 (7): 1466—75.
10. Goyal N., Thatai P., Sapra B. Surging footprints of mathematical modeling for prediction of transdermal permeability. — *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. — 2017; 12 (4): 299—325. DOI: 10.1016/j.ajps.2017.01.005
11. Canavese G. et al. Nanoparticle-assisted ultrasound: A special focus on sonodynamic therapy against cancer. — *Chem Eng J*. — 2018; 340: 155—72.
12. Pires-de-Campos M.S. et al. Ultrasound associated with caffeine increases basal and beta-adrenoceptor response in adipocytes isolated from subcutaneous adipose tissue in pigs. — *J Cosmet Laser Ther*. — 2016; 18 (2): 116—23.
13. Maresca D., Lakshmanan A. et al. Biomolecular ultrasound and sonogenetics. — *Annu Rev Chem Biomol Eng*. — 2018; 9: 229—52.
14. Azagury A. et al. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. — *Adv Drug Deliv Rev*. — 2014; 72: 127—43.
15. Щетинин Е.В., Сирак С.В., Петросян Г.Г. и др. Оценка механизмов минерализации костной ткани в различные стадии репаративного остеогенеза в условиях лекарственного ультрафонофореза. — *Медицинский вестник Северного Кавказа*. — 2019; 14(1): 260—4.
16. Токарев С.М., Говоров С.В., Штейнберг А.С. Клинические и гистологические результаты использования бета-трикальцийфосфата при периимплантите. — *Дентальная имплантология и хирургия*. — 2016; 4 (25): 10—7.