

MORPHOLOGICAL AND RADIOLOGICAL ASPECTS OF POST-TRAUMATIC REMODELING OF THE LOWER JAW AFTER OCTACALCIUM PHOSPHATE TRANSPLANTATION

Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Lviv, Ukraine)

ilona.med75@gmail.com

The issue of finding ways to optimize the course of posttraumatic bone regeneration is very relevant today. The aim of this study was to determine the dynamics of morphological, radiological, and lectin-histochemical characteristics of bone-ceramic regeneration after transplantation of octacalcium phosphate into an experimental defect of the rabbit mandible. The study was conducted on laboratory animals (male rabbits) divided into appropriate groups. Intact animals were used to study the normal structure of the bone tissue of the investigated area of the mandible. The posttraumatic state of the bone tissue in the area of the defect was monitored for 84 days. Morphological examination of the experimental bone defect of the mandible after implantation of osteoplastic material with octacalcium phosphate revealed numerous macroscopic signs of osteoregeneration that correlated with the dynamics of changes in bone surfaces, on radiographs and radiovisiographs and with the lectin-histochemical characteristics of the bone-ceramic regenerate, the peculiarities of the mineral density of the bone tissue of the mandible of the rabbit and the restoration of its quality after implantation of octacalcium phosphate into its cavity were clarified. A fairly high osteoinductive ability of octacalcium phosphate and its effectiveness compared with the control in healing a bone injury under a blood clot were established.

Key words: mandible/lower jaw, bone tissue regeneration, osteoplastic materials, morphological study, lectin-histochemistry.

Connection of the publication with the planned research work.

The study was conducted within the framework of the initiative research work of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Danylo Halytsky Lviv National Medical University: "Morpho-functional and Immunohistochemical Features of Tissues and Organs in Norm and under Pathological Conditions." State registration number: 0122U000168.

Introduction.

The development of effective bone tissue restoration methods is a complex challenge in modern dentistry and traumatology [1]. Jaw defects, caused by various factors including infections, trauma, tumors, or congenital anomalies, are common. While bone has the capacity to regenerate, large defects, pathological fractures, or infections can significantly hinder healing. Surgical intervention with bone substitutes is often required for treating jaw defects, as indicated by Ferraz MP's literature review [2].

Bone grafting is a common method of treating bone defects. The choice of material for bone grafting depends on many factors, such as availability, size of the defect, biomechanical properties, ease of processing, cost, ethical aspects, biological properties, and possible complications [3]. Autologous bone from the iliac crest is widely considered the «gold standard» for bone grafting, particularly for large defects, as it contains osteogenic cells and provides a natural scaffold for new bone formation. Nevertheless, this approach has limitations. [3-5]. Alternative bone materials offer the advantage of reduced complication risks when used for treating smaller and medium-sized bone defects. However, their effectiveness depends on their ability to integrate seamlessly with bone tissue, preventing the formation of fibrous tissue. Successful bone graft materials must meet several key criteria for optimal results. They should stimulate osteogenesis without inducing an immune response. In addition, the materials should promote rapid revascu-

larization and stimulate osteoinduction and osteoconduction, which will ultimately lead to the replacement of the graft with bone tissue that matches the quality and quantity of the host tissue [3, 5]. Materials of animal origin, known as xenogenic materials or xenografts, are also widely used. These materials, which have been studied for over three decades, are known for their osteoconductive properties, primarily attributed to their inorganic structure, composed mainly of hydroxyapatite [6]. The removal of organic components from xenogenic materials leaves a scaffold that mimics the structure of human bone, promoting bone regeneration. This similarity in chemical structure, particularly the calcium to phosphate ratio (1.67), which matches human bone exactly, makes xenogenic materials ideal for transplantation [7]. The close resemblance in chemical structure, particularly in materials derived from bovine bone like Bio-Oss®, significantly enhances their ability to stimulate bone tissue regeneration. Octacalcium phosphate, a widely used material for filling bone defects, has proven effective due to its rapid degradation in the body, allowing natural bone tissue to readily replace its structure [8]. The advanced crystalline material octacalcium phosphate promotes factors that stimulate bone regeneration [9]. It has long been one of the most popular and frequently used xenogenic materials, especially in dentistry [10].

The aim of the study.

To determine the dynamics of morphological, radiological and lectin-histochemical characteristics of bone-ceramic regenerate after the transplantation of octacalcium phosphate into an experimental defect in the rabbit jaw.

Object and research methods.

The study was conducted on 45 adult male rabbits aged 6-7 months, weighing 2.5-3 kg. The animals were divided into control and experimental groups (20 animals in each). An additional 5 intact animals were used to study the normal structure of bone tissue in the stud-

ied area of the lower jaw. Under general anesthesia, by intraperitoneal injection of Thiopenate ("Brofarma", Ukraine), at a dose of 25 mg/kg of body weight, the animals in the control and experimental groups were subjected to a bone-destroying injury, a cavity 4 mm deep and 3 mm wide at the level of the toothless area of the mandibular part of the lower jaw using a dental burr. The control group consisted of animals with a bone defect that healed under a blood clot. The experimental group consisted of rabbits in which the bone defect was filled with CompactBoneB osteotropic material (Dentegris, Germany) – a natural bovine bone substitute, the main crystalline material of which is native octacalcium phosphate (OCP-N). The study of the condition of bone tissue in the area of the inflicted defect was performed at 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 and 84 days after the injury was inflicted. The following methods were employed: bone defect modeling, assessment of jaw macrostructure, radiographic examination, radiovisiography, examination of bone sections under a microscope, and lectin-histochemical analysis of decalcified bone sections. The Bioethics Committee of Danylo Halytsky Lviv National Medical University (protocol No. 3 dated March 11, 2020) determined that all animals were housed in a vivarium and procedures for cleaning, inspection, marking and all other manipulations were carried out in accordance with the provisions of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985), the "General Ethical Principles of Experiments on Animals" adopted by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, 2001), the Law of Ukraine No. 3447-IV "On the Protection of Animals from Cruel Treatment" in accordance with the Directive of the Council of the European Union 2010/63/EU on compliance with the regulations, laws, and administrative provisions of the EU Member States on the protection of animals used for scientific purposes [11, 12].

Research results and their discussion.

Macroscopic examination of macerated specimens of the interdental area of the alveolar part of the lower jaw at the intervention place on the first day of the experiment visualized a trepanation hole 4 mm deep and 3 mm wide with clear contours and a smooth surface on the periphery without macroscopic signs of osteoregeneration. Starting from the 8th day, the walls of the experimental defect exhibited characteristic scalloped edges, indicating the initiation of osteoregenerative processes under the influence of OCP-N (fig. 1). On the 28th day after the injury, a significant portion of the primary bone defect contained inorganic remnants of bone regenerate. From the 35th day until the end of observation, the newly formed regenerate almost completely filled the cavity. At the end of the experiment, the newly formed callus slightly protruded above the surface of the maternal bone.

Radiographic examination of the rabbit mandibles with defects filled with OCP-N revealed areas of lucency at the defect sites. Starting from day 14 post-surgery, the surgical area gradually became denser, and the injury site exhibited uneven darkening. By day 21, signs of regeneration appeared, with the soft tissue callus undergoing uneven remodeling into bone. From day 28 onwards, the injury site became darker, and the bone defect was completely closed by a heterogeneous bone

callus (fig. 2). The observed signs indicated the beginning of the bone regenerate remodeling stage. From day 35 to day 84, signs of bone remodeling completion were evident, with the defect fully closed by a typical bone callus, although some heterogeneous areas remained.

In animals from the experimental group where the defect was filled with OCP-N material, bone density increased by 12% compared to normal values one day after injury, reaching 80.04 ± 2.79 HU. After 7 days of the experiment, the examined parameter decreased significantly to 59.18 ± 2.47 HU, which is 17% lower than normal. Over the following 14 days, bone density in the injury area increased again, reaching 68.13 ± 1.57 HU on day 14, approaching the normal value. By the end of day 21, bone density increased sharply – doubling compared to the previous period and exceeding the norm by 90%, reaching 135.67 ± 4.35 HU (fig. 3). On day 28, the examined parameter decreased to 82.48 ± 2.88 HU, and on day 35, it dropped to 70.19 ± 2.98 HU. From day 35 until the end of the experiment, bone density values in the injury area remained close to normal, reaching 71.18 ± 1.38 HU on day 56 and 70.94 ± 1.07 HU on day 84.

Comparison of bone density in the mandibular ramus area after filling the defect with OCP-N and control revealed a significant difference by day 21 of the experiment. While bone density increased in both groups during the first day, the increase was significantly greater in the control group. Unlike the control group, where bone den-

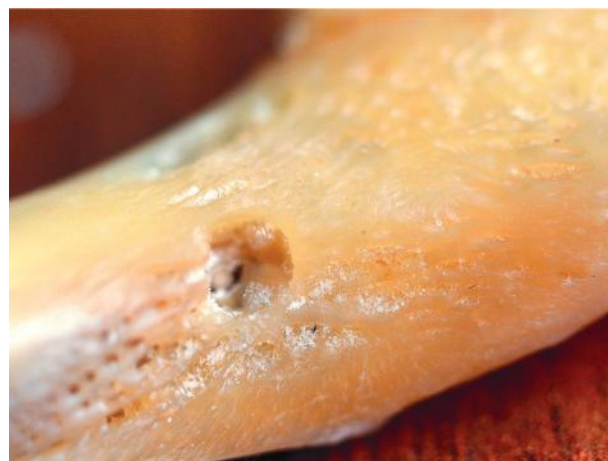


Figure 1 – Macro photograph of the rabbit mandible 7 days after injury and filling the defect with OCP-N material. Lateral projection.

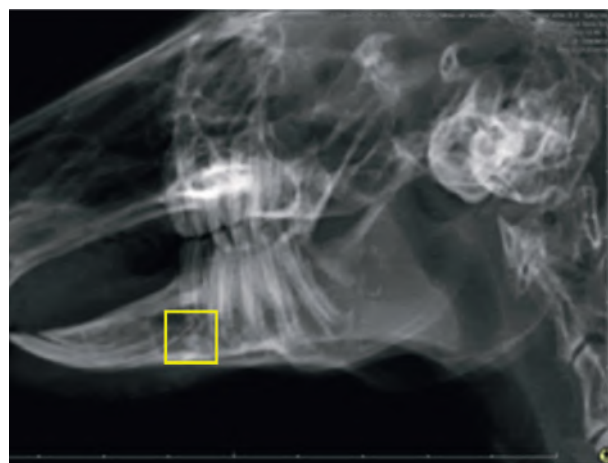


Figure 2 – Radiograph of the rabbit mandible 14 days after injury and filling the defect with OCP-N material. Lateral projection. The area of augmentation is highlighted in yellow.

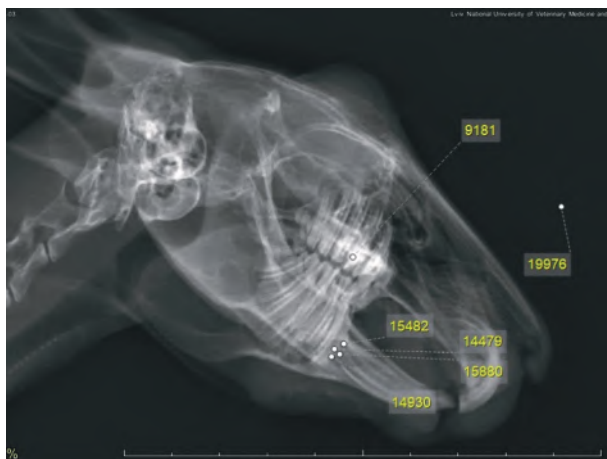


Figure 3 – Radiograph of the rabbit mandible 21 days after injury and filling the defect with OCP-N material. Determination of bone mineral density. Lateral projection.

sity continued to increase, reaching its peak on day 14, the OCP-N group showed a significant decrease in bone density (below normal) seven days after injury. This was followed by an increase and a rapid rise to peak density by day 21. From day 28 onwards, the bone density trend in both groups was similar. However, the experimental group's values approached normal levels by day 35, while the control group's values remained significantly higher (fig. 4). Overall, bone density values in the experimental group were lower than those in the control group at 1, 7, 14, 28, 35, 56, and 84 days (fig. 5).

A significant difference ($p < 0.001$) in bone density was observed between the experimental group and the control group at 1, 7, 14, 21, 35, 56, and 84 days post-experiment. A less significant difference ($p < 0.01$) was observed at 28 days. When comparing bone density measurements at different stages of bone defect healing after filling with OCP-N, a significant difference ($p < 0.001$) was detected. Moreover, there was no significant difference ($p > 0.05$) between the indicators established 14, 35, 56 and 84 days after the injury and between the norm and the indicators established at these terms of the experiment in the animals of this experimental group.

Microscopic examination of bone sections of the experimental bone defect of the lower jaw after implantation of OCP-N osteoplastic material revealed a number of

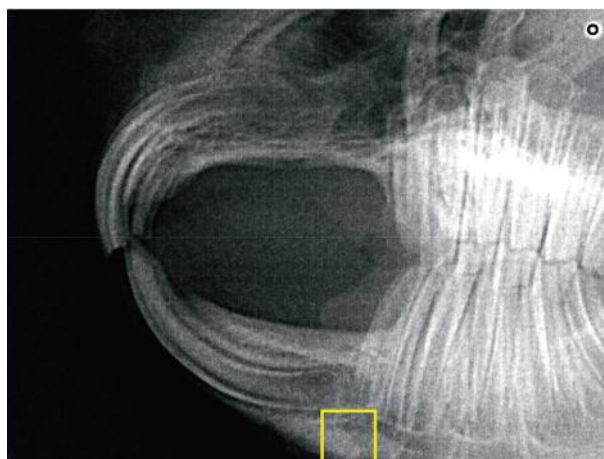


Figure 4 – Radiograph of the rabbit lower jaw in the control group 70 days after injury and defect filling with OCP-N material. Lateral projection. The place of augmentation is highlighted in yellow.

changes associated with both the development of trauma sequelae and the appearance of signs of reparative regeneration. Indeed, the structure of bone tissue at the site of the defect and in areas directly adjacent to it in the early stages of the experiment, up to day 21, did not differ significantly from the animals in the control group. However, starting from day 28, we documented a number of signs indicating a somewhat different course of restoration and remodeling of the destroyed bone. First of all, this concerns the architecture of the outer bone plate of the alveolar processes. If in the early stages in such plates we noted the destruction of the osteon layer, the appearance of clusters of amorphous dense masses, then starting from day 28, extensive homogeneous zones were observed in the areas of the outer bone plate, which probably arose as a result of increased osteolysis (fig. 6). Starting from day 35, against the background of such zones, islets of woven bone appeared surrounded by osteogenic cells. It should be noted the presence of signs of enhanced revascularization in such areas in contrast to the animals of the control group, in which the saturation of similar areas with microvessels was weaker. The consequences of the inflicted trauma for the inner bone plate of the alveolar processes were insignificant. The osteon layer, starting from day 28 of the experiment, was preserved. In the defect zone,

against the background of a homogeneous area, islets of woven bone appeared with signs of remodeling into lamellar compact bone tissue.

When examining the sections of the lower jaws at a later date (35 days), an increase in regenerative processes was observed, followed by a significant remodeling of the bone and its acquisition of a typical structure, which was characteristic of intact animals. The manifestations of such processes were the reconstruction of the outer bone plate of the alveolar processes, where, against the background of increased neo-vascularization, the formation of new osteons was detected. The cancellous lamellar bone of the jaw base also underwent significant reconstruction, both in the area of defect augmentation and in the adjacent native bone. The signs of this were the for-

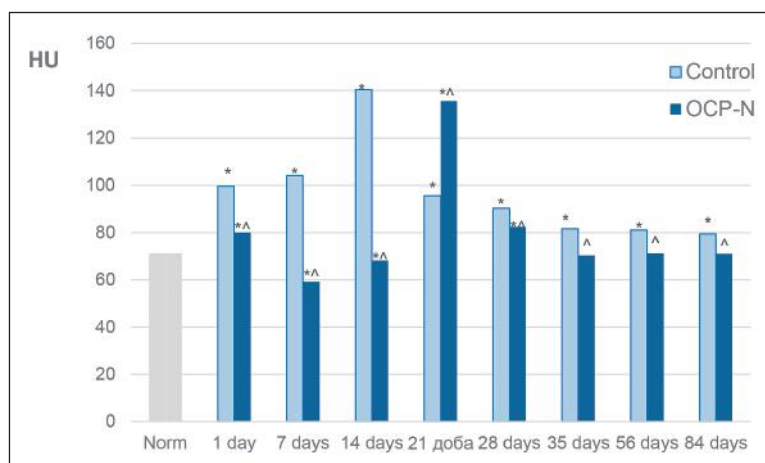


Figure 5 – Dynamics of bone density changes in the mandibular ramus area after defect filling with OCP-N material.

Notes: * – statistically significant difference compared to normal (71.25 HU); ^ – statistically significant difference compared to the control group.

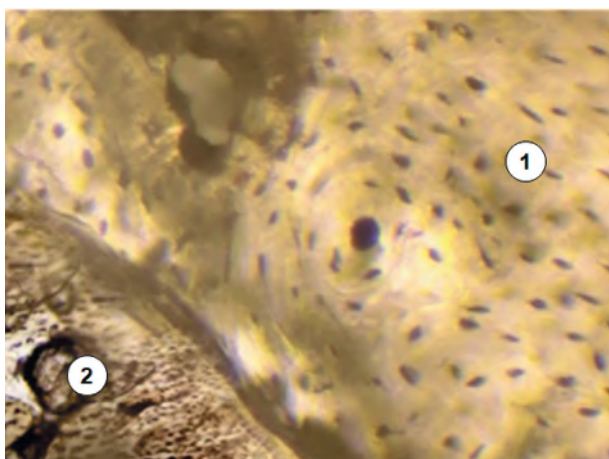


Figure 6 – Micrograph of a bone section from the rabbit mandible 28 days after the injury and filling of the defect with OCP-N material. Magnification: $\times 200$. Designations: 1 – native bone; 2 – regenerate formation.

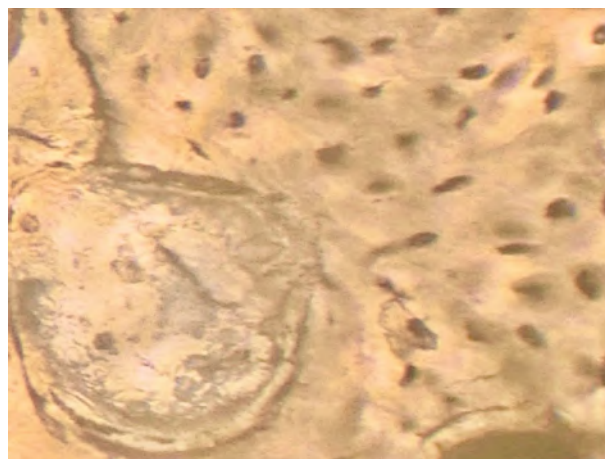


Figure 7 – Micrograph of a bone section from the rabbit mandible in the area of bone regenerate 84 days after injury and defect filling with OCP-N material. Magnification: $\times 400$.

mation of bone trabeculae with a sufficient content of ossein fibers, as well as the accumulation of osteogenic cells, which were detected at the final stages of the experiment (fig. 7). Thus, the results of microscopic analysis of bone sections of the lower jaw when filling the trepanation hole with OCP-N osteoplastic material indicate its fairly high osteoinductive ability.

Decalcified bone sections from the jaw treated with peroxidase-labeled lectins were studied. Among all lectins used, the most informative were WGA, LABA, CNFA. Specifically, when using WGA lectin, we registered variability in the intensity of binding to carbohydrate determinants of the structural components of bone tissue in the area of surgical intervention. These components were the alveolar processes, periodontium and gums. This lectin exhibited high reactivity to glycoconjugates of vascular endothelium of the microcirculatory bed, cellular elements of the periodontal ligament closer to the apex of the tooth root. This picture was characteristic of the 14th and 21st days of observation. During the same period, the cellular elements of the proper plate of the gum mucosa exhibited a positive reaction to WGA. Later (on the 56th and 84th days), this lectin exhibited a lower affinity for the above-mentioned structures. At the same time, during these same periods, individual fragments of the basal membranes of small blood vessels exhibited a weak positive reaction. Lectin-histochemically, the reactivity of the cellular elements of the studied structures did not undergo significant changes. This applies to both the experimental and control groups of animals.

When applying galactose- and fucose-specific LABA lectin after osteoplasty with OCP-N material in the studied group, in contrast to the animals of the control group and intact animals, a noticeable reactivity was predominantly shown by cellular elements in the early stages of the experiment (from day 1 to 28). Since it is known that LABA lectin is a specific marker for binding carbohydrate determinants of macrophages, in this case, there was a presence of a large number of macrophages in the focus of the inflammatory process, which was naturally caused by bone-destructive trauma.

When treating the corresponding preparations of animals of this experimental group with CNFA lectin and their visualization under a microscope, a number of features of its binding to carbohydrate determinants of the studied

structures were revealed. Thus, CNFA lectin unexpectedly showed affinity for carbohydrate residues of destroyed structures already on the first day of the experiment. The same picture was observed in the animals of the control group. With regard to subsequent observation periods in animals whose bone defect was filled with OCP-N, in the 35-56 days, this lectin selectively bound to the surface of single cells as part of the periodontium, the walls of hemocapillaries. The same picture was at the end of the experiment, but at the same time, the reactivity of the endothelium of the microcirculatory bed was relatively higher than in the animals of the control group. This fact can be interpreted as enhanced vasculogenesis in the defect zone filled with OCP-N material. It's important to note that CNFA lectin was able to selectively conjugate with carbohydrate residues of structural components of the endosteum of bone trabeculae, which was most clearly manifested at the end of the observation period. At the same time, we didn't observe such binding in the animals of the control group and in intact animals.

Conclusions.

1. Macroscopic examination revealed signs of an active osteoregenerative process under the influence of OCP-N already from the 14th day of the experiment.

2. The results of microscopic analysis of bone sections of the lower jaw when filling the trepanation shaft with OCP-N osteoplastic material indicate its fairly high osteoinductive ability.

3. X-ray examination of the lower jaws of animals whose bone defect was filled with OCP-N indicated the onset of the remodeling stage of the bone regenerate after 21 days of the experiment.

4. By the end of the 21st day, the density of the bone tissue increased sharply – twice in comparison with the previous period and exceeding the norm by 90%, reaching a value of 135.67 ± 4.35 HU. However, by the end of the experiment, the values of bone density indicators in the experimental group were lower than in the control group.

Prospects for further research.

Further studies are planned to investigate the ultrastructural features of regeneration of experimental bone tissue defects under conditions of using different osteoplastic materials, which will allow for the development of more effective innovative solutions that will improve bone regeneration outcomes in the maxillofacial region.

МОРФОЛОГІЧНІ ТА РЕНТГЕНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ПОСТТРАВМАТИЧНОГО РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ОКТАКАЛЬЦІЙФОСФАТУ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів, Україна)

ilona.med75@gmail.com

Питання пошуку шляхів оптимізації перебігу регенерації посттравматичної кістки є, на сьогоднішній день, дуже актуальним. Метою даної роботи було визначення динаміки морфологічних, рентгенологічних, та лектиногістохімічних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації октакальційфосфату в експериментальний дефект нижньої щелепи кролика. Дослідження було проведено на лабораторних тваринах (кроликах-самцях), яких було розділено на відповідні групи. Інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. Контроль посттравматичного стану кісткової тканини в ділянці дефекту здійснювали впродовж 84 діб. Морфологічне дослідження експериментального кісткового дефекту нижньої щелепи після імплантації остеопластичного матеріалу з октакальційфосфатом дозволило виявити численні макроскопічні ознаки остеорегенерації, що корелювали з динамікою змін у шліфах кістки, на рентгенограмах та радіовізіограмах та з лектиногістохімічними характеристиками кістково-керамічного регенерату, з'ясовані особливості мінеральної щільності кісткової тканини нижньої щелепи кролика та відновлення її якості при імплантації в його порожнину октакальційфосфату. Встановлено доволі високу остеоіндуктивну здатність октакальційфосфату та ефективність у порівнянні з контролем при загоєнні кісткової травми під кров'яним зусутком.

Ключові слова: нижня щелепа, регенерація кісткової тканини, остеопластичні матеріали, морфологічне дослідження, лектиногістохімія.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження проведено в рамках ініціативної НДР кафедри гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Морфофункціональні та імунітогістохімічні особливості тканин і органів в нормі та при патологічних станах». Державний реєстраційний номер 0122U000168.

Вступ.

Однією з ключових проблем сучасної стоматології та травматології є розробка ефективних методів відновлення кісткової тканини [1]. Дефекти щелеп, що виникають внаслідок інфекцій, травм, пухлин або вроджених аномалій, є поширеним явищем. Хоча кістка має природну здатність до регенерації, великі дефекти, патологічні переломи або інфекції можуть перешкоджати процесу загоєння. З літературних оглядів, опублікованих Ferraz MP. відомо, що в таких випадках необхідне хірургічне втручання з використанням кісткових замінників [2].

Кісткова пластика – поширений метод лікування кісткових дефектів. Вибір матеріалу для кісткової пластики залежить від багатьох факторів, таких як доступність, розмір дефекту, біомеханічні властивості, простота обробки, вартість, етичні аспекти, біологічні властивості та можливі ускладнення [3]. Для великих дефектів найчастіше використовують аутологічну кістку, взятую з гребеня клубової кістки. Цей матеріал вважається «золотим стандартом» кісткової пластики, оскільки він містить остеогенні клітини, які можуть створювати нову кістку, а його структура слугує природним каркасом. Однак, цей метод має свої недоліки [3-5]. Альтернативні кісткові матеріали стають все більш популярними для лікування дріб-

них та середніх дефектів кісток, адже вони допомагають зменшити ризик ускладнень. Однак, для ефективного застосування, такі матеріали повинні мати здатність до інтеграції з кістковою поверхнею без утворення фіброзної тканини. Для досягнення оптимальних результатів, кісткові трансплантаційні матеріали мають відповідати певним критеріям. Вони повинні стимулювати остеогенез без викликання імунної відповіді. Крім того, матеріали повинні сприяти швидкій ревазуляризації, стимулювати остеοіндукцію та остеокондукцію, що в кінцевому результаті призведе до заміщення трансплантату кістковою тканиною, що відповідає за якістю та кількістю до тканин організму-господаря [3, 5]. Також, широко застосовують матеріали тваринного походження, відомі як ксеногенні матеріали або ксенотрансплантати. Їх досліджують вже понад тридцять років і вони відомі своїми остеокондуктивними властивостями, що зумовлено їх неорганічною структурою, яка переважно складається з гідроксиапатиту [6]. Після видалення органічних компонентів залишається каркас, що імітує структуру людської кістки та сприяє кістковій регенерації. Ксеногенні матеріали вигідно відрізняються від інших матеріалів своєю хімічною структурою, яка дуже близька до структури людської кістки. Зокрема, співвідношення кальцію та фосфату в ксеногенних матеріалах (1,67) точно відповідає цьому показнику в людській кістці, що робить їх ідеальними для трансплантації [7]. Така схожість, особливо у матеріалах з бичачої кістки, таких як Bio-Oss®, значно покращує їх здатність стимулювати регенерацію кісткової тканини. До найчастіше застосовуваних з метою заповнення кісткових дефектів матеріалів належить октакальційфосфат. Він швидко розкладається в організмі, а його структуру легко замінює природна кісткова тка-

нина [8]. Удосконалений кристалічний матеріал октакальційфосфат сприяє факторам, що стимулюють регенерацію кісток [9]. Він давно став одним із найпопулярніших і найчастіше використовуваних ксеногенних матеріалів, особливо в стоматології [10].

Мета дослідження.

Визначити динаміку морфологічних, рентгенологічних, та лектиногістохімічних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації октакальційфосфату в експериментальний дефект нижньої щелепи кролика.

Об'єкт і методи дослідження.

Дослідження було проведено на 45 статевозрілих кроликах-самцях віком 6-7 місяців, вагою 2,5-3 кг. Тварини були розділені на контрольну та експериментальну групу (по 20 тварин кожна). Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. Тваринам контрольної та експериментальної груп під загальним наркозом, шляхом внутрішньоочеревинного введення Тіопенату («Брофарма», Україна), з розрахунку 25 мг/кг маси тіла тварини на рівні беззубої ділянки коміркової частини нижньої щелепи за допомогою стоматологічного бора наносили кісткоруйнуючу травму у вигляді шахти глибиною 4 мм та шириною 3 мм. До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини, який загоювався під кров'яним згустком. Експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали остеотропним матеріалом CompactBoneB (Dentegris, Німеччина) – натуральним замінником бичачої кістки, основним кристалічним матеріалом якого є нативний октакальційфосфат (ОКФ-Н). Дослідження стану кісткової тканини в ділянці нанесеного дефекту здійснювали через 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 та 84 доби після нанесення травми. Серед методик були використані: моделювання кісткового дефекту, оцінка макроструктури щелеп, рентгенографічне дослідження, радіовізіографічне дослідження, вивчення мікропрепаратів шліфів кістки та лектиногістохімічні дослідження зрізів декальцинованої кістки. Комітетом з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 3 від 11 березня 2020 р.) встановлено, що усі тварини знаходились в умовах віварію і процедури, що стосувалися питань утримання, догляду, маркування та всі інші маніпуляції проводилися із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Закону України № 3447 – IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» згідно з директивою Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання постанов, законів, адміністративних положень Держав ЄС з питань захисту тварин, які використовуються з науковою метою [11, 12].

Результати досліджень та їх обговорення.

Макроскопічне дослідження мацерованих препаратів міжзубної ділянки коміркової частини нижньої щелепи у місці втручання на першу добу експерименту візуалізувало трепанаційний отвір глибиною 4 мм та шириною 3 мм з чіткими контурами і глад-

кою поверхнею по периферії без макроскопічних ознак остеорегенерації. Починаючи з 14-ї доби стінки експериментального дефекту мали характерні фестончасті краї, що свідчило про початок остеорегенераторних процесів під впливом ОКФ-Н (рис. 1). На 28-у добу після нанесення травми значна частина первинного кісткового дефекту містила неорганічні залишки кісткового регенерату. З 35-ї доби і до кінця спостереження новоутворений регенерат практично повністю заповнив порожнину. При цьому, наприкінці експерименту новостворена кісткова мозоля дещо виступала над поверхнею материнської кістки.

При рентгенографії нижніх щелеп тварин, кістковий дефект яких заповнювали ОКФ-Н, у ділянках його розташування спостерігалось просвітлення. Починаючи з 14-ї доби операційна ділянка поступово ущільнювалася, а місце травми нерівномірно затемнювалося. На 21-у добу з'являлися ознаки відновлення, м'якотканинна мозоля неоднорідно перебудовувалася на кісткову. Починаючи з 28-ї доби ділянка травми ставала темнішою, кістковий дефект повністю закритий неоднорідною кістковою мозолею (рис. 2). Зареєстровані ознаки свідчили про початок стадії ремоделювання кісткового регенерату. Із 35-ї по 84-у добу виявлялися ознаки завершення ремоделювання кістки, а саме повністю закритий типовою кіст-

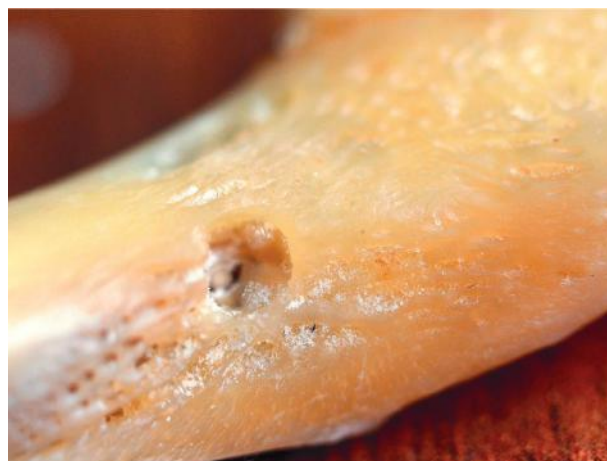


Рисунок 1 – Макрофотографія нижньої щелепи кролика через 7 діб після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н. Бічна проекція.

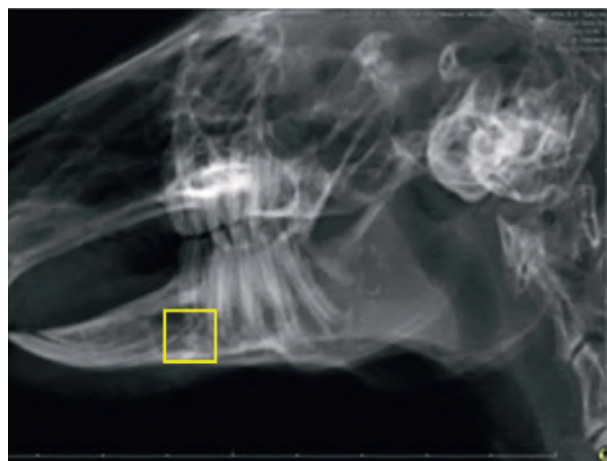


Рисунок 2 – Рентгенограма нижньої щелепи кролика через 28 діб після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н. Бічна проекція. Ділянка аугментації виділена жовтим кольором.

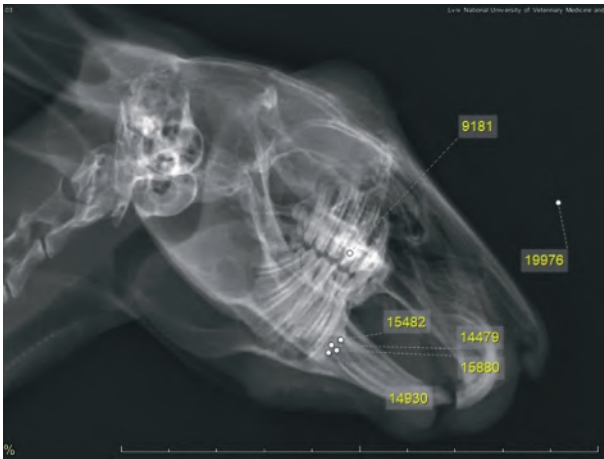


Рисунок 3 – Рентгенограма нижньої щелепи кролика через 21 добу після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н. Визначення мінеральної щільності кісткової тканини. Бічна проекція.

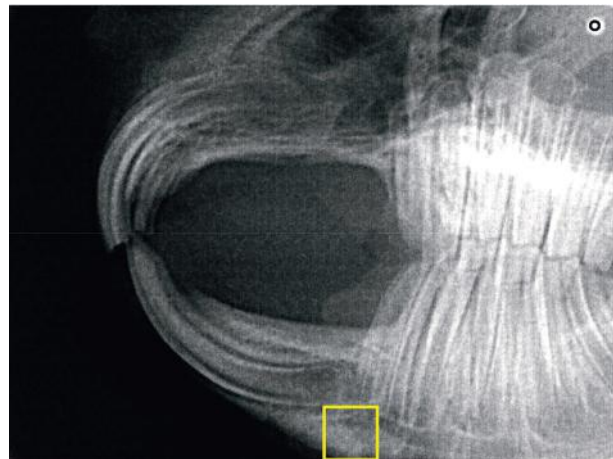


Рисунок 4 – Радіовізіограма нижньої щелепи кролика контрольної групи через 70 днів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н. Бічна проекція. Ділянка аугментації виділена жовтим кольором.

вою мозолею дефект, проте із збереженими неоднорідними ділянками.

У тварин експериментальної групи із заповненням дефекту матеріалом ОКФ-Н через 1 добу після нанесення травми щільність кісткової тканини підвищувалась на 12% у порівнянні з нормою і становила $80,04 \pm 2,79$ УОС. Через 7 днів експерименту досліджуваний показник різко знижувався до $59,18 \pm 2,47$ УОС, що на 17% поступалося нормі. Упродовж наступних двох тижнів щільність кісткової тканини в ділянці травми знову зростала і на 14-у добу становила $68,13 \pm 1,57$ УОС, наближаючись до показника норми. До кінця 21-ї доби щільність кісткової тканини різко збільшувалась – удвічі порівняно з попереднім терміном і перевищуючи норму на 90%, сягаючи величини $135,67 \pm 4,35$ УОС (рис. 3). На 28-у добу досліджуваний показник знижувався до $82,48 \pm 2,88$ УОС, на 35-у добу – до $70,19 \pm 2,98$ УОС. Починаючи з 35-ї доби і до кінця експерименту показники щільності кісткової тканини в ділянці травми знаходилися на наближеному до норми рівні та становили $71,18 \pm 1,38$ УОС та $70,94 \pm 1,07$ УОС на 56-у та 84-у добу відповідно.

При порівнянні динаміки щільності кісткової тканини коміркової ділянки нижньої щелепи після заповнення дефекту ОКФ-Н з контролем встановлено, що

до 21-ї доби експерименту між ними існувала суттєва різниця. Хоча упродовж першої доби досліджувані показники зростали у тварин обох експериментальних груп, його збільшення в контролі було значно істотнішим. На відміну від контролю, де показник щільності кісткової тканини продовжував зростати і сягав максимального значення на 14-у добу експерименту, при заповненні кісткового дефекту ОКФ-Н через 7 днів після нанесення травми спостерігалось максимальне зниження показника щільності кісткової тканини (нижче норми) з наступним його підвищенням і різким зростанням до максимального показника через 21 добу експерименту. Починаючи від 28-ї доби спостережень динаміка досліджуваного показника у тварин обох груп була схожою, при цьому показники експериментальної групи від 35-ї доби максимально наближались до норми, а показники контролю залишалися значно вищими. (рис. 4). Загалом, значення показників щільності кісткової тканини в експериментальній групі через 1, 7, 14, 28, 35, 56 та 84 днів були нижчими, ніж у контролі (рис. 5).

Істотну різницю ($p < 0,001$) між показниками даної групи з контролем встановлено через 1, 7, 14, 21, 35, 56 та 84 днів експерименту, менш істотну – через 28 днів ($p < 0,01$). При порівнянні показників щільності кісткової

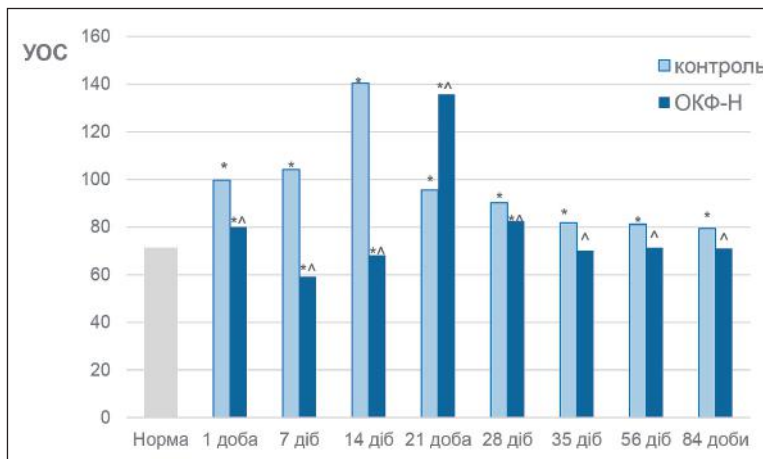


Рисунок 5 – Динаміка змін щільності кісткової тканини коміркової ділянки нижньої щелепи після заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н.

Примітки: * – різниця статистично значуща при порівнянні з нормою ($71,25$ УОС); ^ – різниця статистично значуща при порівнянні з контрольною групою.

вої тканини упродовж різних термінів загоєння кісткового дефекту після його заповнення ОКФ-Н між ними виявлено істотну різницю ($p < 0,001$). При цьому не було істотної різниці ($p > 0,05$) між показниками, встановленими через 14, 35, 56 та 84 днів після нанесення травми та між нормою і показниками, встановленими на цих термінах експерименту у тварин даної експериментальної групи.

При мікроскопічному вивченні препаратів шліфів кістки нижньої щелепи з нанесеною кістковоруйнівною травмою у вигляді дефекту кістки з наступним заміщенням його остеопластичним матеріалом ОКФ-Н виявлено ряд змін, пов'язаних як з розвитком наслідків травми, так і з появою ознак репаративної регенерації. Так, структура кісткової тканини у місці дефекту та в ділянках,

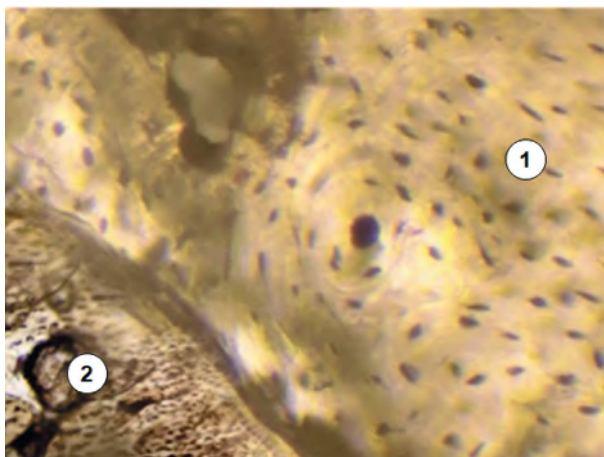


Рисунок 6 – Мікрофотографія шліфа кістки нижньої щелепи кролика через 28 діб після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом матеріалом ОКФ-Н. Збільшення: $\times 200$. Позначення: 1 – материнська кістка; 2 – формування регенерату.

безпосередньо прилеглих до нього, у ранні терміни експерименту аж до 21-ї доби суттєво не відрізнялася від тварин контрольної групи. Проте, вже починаючи від 28-ї доби нами задокументовано ряд ознак, що свідчили про дещо інший перебіг відновлення та ремоделювання зруйнованої кістки. Перш за все це стосується архітекtonіки зовнішньої кісткової пластинки коміркових відростків. Якщо у ранні терміни у таких пластинках ми відмічали руйнування остеонного шару, появу скупчень аморфних щільних мас, то починаючи з 28-ї доби у ділянках зовнішньої кісткової пластинки спостерігалися обширні гомогенні зони, які виникли, ймовірно, внаслідок посилення остеолізу (рис. 6). Починаючи з 35-ї доби на тлі таких зон з'являлися острівці грубоволокнистої кістки в оточенні клітин остеогенного ряду. Слід зазначити наявність у таких ділянках ознак посиленої реваскуляризації на відміну від тварин контрольної групи, у яких насичення аналогічних ділянок мікросудинами було слабше. Наслідки нанесеної травми для внутрішньої кісткової пластинки коміркових відростків проявлялися несуттєво. Остеонний шар починаючи із 28-ї доби експерименту був збережений, а в зоні дефекту, на тлі гомогенної ділянки, з'являлися острівці грубоволокнистої кістки з ознаками ремоделювання у пластинчасту компактну кісткову тканину.

При вивченні шліфів нижніх щелеп у більш пізні терміни (35 діб) спостерігалася посилення регенераторних процесів із наступним суттєвим ремоделюванням кістки і набуття нею типової будови, що була притаманна інтактним тваринам. Проявами таких процесів була перебудова зовнішньої кісткової пластинки коміркових відростків, де на тлі посиленого неоваскулогенезу виявлено формування нових остеонів. Суттєвої перебудови зазнавала також губчаста пластинчаста кістка основи щелепи як у ділянці аугментації дефекту, так і у прилеглий материнській кістці. Ознаками цього були формування кісткових трабекул з достатнім вмістом осеїнових волокон, а також накопичення остеогенних клітин, що виявлялися на прикінцевих термінах експерименту (рис. 7). Отже, результати мікроскопічного аналізу препаратів шліфів кістки нижньої щелепи при заповненні трепанційної шахти остеопластичним матеріалом ОКФ-Н

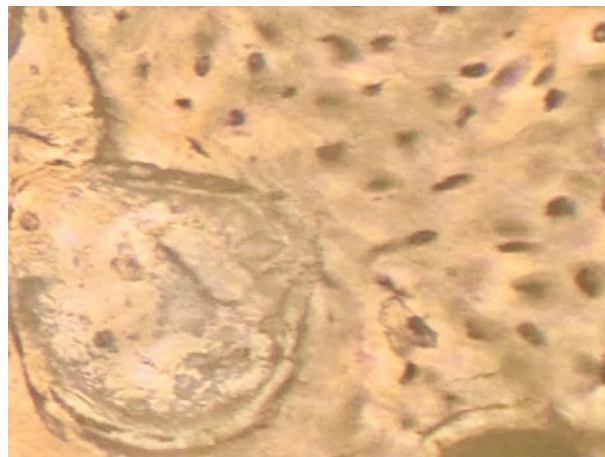


Рисунок 7 – Мікрофотографія шліфа кістки нижньої щелепи кролика в ділянці кісткового регенерату на 84-у добу після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом матеріалом ОКФ-Н. Збільшення: $\times 400$.

свідчать про доволі високу його остеоіндуктивну здатність.

Були досліджені препарати декальцинованих зрізів кістки щелепи, оброблених лектинами, міченими пероксидазою. Серед усіх використаних при цьому лектинів найбільш інформативними виявилися лектини зав'язків пшениці (WGA), лектин кори золотого дощу (LABA) та лектин гриба грузлика димчастого (CNFA). Зокрема, при використанні лектина WGA нами зареєстровано варіабельність інтенсивності зв'язування з вуглеводними детермінантами структурних компонентів кісткової тканини в ділянці оперативного втручання. Такими компонентами були коміркові відростки, періодонт та ясна. Означений лектин проявляв високу реактивність стосовно глікокон'югатів ендотелію судин мікроциркуляторного русла, клітинних елементів зубної зв'язки ближче до верхівки кореня зуба. Така картина була характерною для 14-ї та 21-ї доби спостереження. У ці ж терміни позитивну реакцію на WGA чинили клітинні елементи власної пластинки слизової ясен. У подальшому (56-й та 84-й день) вказаний лектин виявляв меншу спорідненість з вищезначеними структурами. Водночас, у ці ж терміни незначну позитивну реакцію виявляли окремі фрагменти базальних мембран дрібних кровоносних судин. Лектиногістохімічно реактивність клітинних елементів досліджуваних структур суттєвих змін не зазнавала. Це стосувалося як дослідної, так і контрольної груп тварин.

При застосуванні галактозо- та фукозоспецифічного лектину LABA після остеопластики матеріалом ОКФ-Н у досліджуваній групі, на відміну від тварин контрольної групи та інтактних тварин, помітну реактивність виявляли переважно клітинні елементи у ранні терміни дослідження (від 1-ї доби до 4-го тижня). Оскільки відомо, що лектин LABA є специфічним маркером зв'язування вуглеводних детермінант макрофагів, то у даному випадку мала місце присутність великої кількості макрофагів у вогнищі запального процесу, що закономірно зумовлювалась кістково-руйнівною травмою.

При обробці відповідних препаратів тварин даної дослідної групи лектином CNFA та їхній візуалізації під мікроскопом виявлено низку особливостей його зв'язування з вуглеводними детермінантами дослі-

джуваних структур. Так, лектин CNFA досить несподівано проявляв спорідненість із вуглеводними залишками зруйнованих структур вже на першу добу експерименту. Така ж картина спостерігалася у тварин контрольної групи. Стосовно подальших термінів спостереження у тварин, кістковий дефект яких заповнювали ОКФ-Н, на 35-56 доби вказаний лектин селективно зв'язувався з поверхнею поодиноких клітин у складі періодонту, стінками гемокапілярів. Така ж картина була притаманною наприкінці експерименту, але водночас реактивність ендотелію судин мікроциркуляторного русла була порівняно вищою, ніж у тварин контрольної групи. Такий факт можна розцінювати як посилений васкулогенез у зоні дефекту, заповненого матеріалом ОКФ-Н. Важливо зазначити, що лектин CNFA мав здатність вибірково кон'югувати з вуглеводними залишками структурних компонентів ендосту кісткових трабекул, що найбільш чітко проявлялося наприкінці терміну спостереження. Водночас, такого зв'язування ми не спостерігали у тварин контрольної групи та у інтактних тварин.

Висновки.

1. Макроскопічне дослідження виявило ознаки активного остеорегенераторного процесу під впливом ОКФ-Н вже з 14-ї доби експерименту.

2. Результати мікроскопічного аналізу препаратів шліфів кістки нижньої щелепи при заповненні трепанційної шахти остеопластичним матеріалом ОКФ-Н свідчать про доволі високу його остеоіндуктивну здатність.

3. Рентгенографія нижніх щелеп тварин, кістковий дефект яких заповнювали ОКФ-Н, засвідчила початок стадії ремоделювання кісткового регенерату після 21-ї доби експерименту.

4. До кінця 21-ї доби щільність кісткової тканини різко збільшувалась – удвічі порівняно з попереднім терміном і перевищуючи норму на 90%, сягаючи величини $135,67 \pm 4,35$ УОС. Проте, до кінця експерименту значення показників щільності кісткової тканини в експериментальній групі були нижчими, ніж у контролі.

Перспективи подальших досліджень.

У подальшому планується дослідити ультраструктурні особливості регенерації експериментального дефекту кісткової тканини за умов застосування різних остеопластичних матеріалів, що дозволить розробити більш ефективні інноваційні рішення, які покращать результати регенерації кісткової тканини в щелепно-лицьовій ділянці.

References / Література

1. Xue N, Ding X, Huang R, Jiang R, Huang H, Pan X, et al. Bone tissue engineering in the treatment of bone defects. *Pharmaceuticals*. 2022;15:879. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15070879>.
2. Ferraz MP. Bone grafts in dental medicine: an overview of autografts, allografts and synthetic materials. *Materials (Basel)*. 2023;16:4117. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma16114117>.
3. Szwed-Georgiou A, Płociński P, Kupikowska-Stobba B, Urbaniak MM, Rusek-Wala P, Szustakiewicz K, et al. Bioactive materials for bone regeneration: biomolecules and delivery systems. *ACS Biomater Sci Eng*. 2023;9:5222-54. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.3c00609>.
4. Migliorini F, Cuzzo F, Torsiello E, Spiezia F, Oliva F, Maffulli N. Autologous bone grafting in trauma and orthopaedic surgery: an evidence-based narrative review. *J Clin Med*. 2021;10:4347. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10194347>.
5. Gillman CE, Jayasuriya AC. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2021;130:112466. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>.
6. Huang X, Lou Y, Duan Y, Liu H, Tian J, Shen Y, et al. Biomaterial scaffolds in maxillofacial bone tissue engineering: A review of recent advances. *Bioact Mater*. 2024;33:129-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.10.031>.
7. Adhikara AG, Maharani AP, Puspitasari A, Nuswantoro NF, Juliadmi D, Maras MAJ, et al. Bovine hydroxyapatite for bone tissue engineering: Preparation, characterization, challenges, and future perspectives. *Eur Polym J*. 2024;214:113171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113171>.
8. Hamada S, Mori Y, Shiwaku Y, Hamai R, Tsuchiya K, Baba K, et al. Octacalcium phosphate/gelatin composite (OCP/Gel) enhances bone repair in a critical-sized transcortical femoral defect rat model. *Clin Orthop Relat Res*. 2022;480:2043-55. DOI: <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000002257>.
9. Jeong C-H, Kim J, Kim HS, Lim S-Y, Han D, Huser AJ, et al. Acceleration of bone formation by octacalcium phosphate composite in a rat tibia critical-sized defect. *J Orthop Transl*. 2022;37:100-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jot.2022.09.007>.
10. Pyo SW, Paik JW, Lee DN, Seo YW, Park JY, Kim S, et al. Comparative analysis of bone regeneration according to particle type and barrier membrane for octacalcium phosphate grafted into rabbit calvarial defects. *Bioengineering*. 2024;11:215. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering.11030215>.
11. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. 1986;123:52.
12. European Parliament. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. *Off J Eur Union*. 2010;53(L276):33-79.

МОРФОЛОГІЧНІ ТА РЕНТГЕНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ПОСТРАВМАТИЧНОГО РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ОКТАКАЛЬЦІЙФОСФАТУ

Челпанова І. В.

Резюме. Остеопластичні матеріали широко застосовуються для лікування кісткових дефектів, однак повна та якісна регенерація кісток щелепно-лицьової ділянки, її механізми та динаміка залишаються недостатньо вивченими. Актуальність даної роботи полягає у використанні морфологічних, рентгенологічних та лектиногістохімічних методів дослідження для поглибленого вивчення динаміки ремоделювання кісткової тканини після створення дефекту та його заповнення остеопластичним матеріалом.

Мета дослідження – визначити динаміку морфологічних, рентгенологічних, та лектиногістохімічних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації октакальційфосфату в експериментальний дефект нижньої щелепи кролика.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження було проведено на 45 статевозрілих кроликах-самцях віком 6-7 місяців, вагою 2,5-3 кг. Тварини були розділені на контрольну та експериментальну групу (по 20 тварин кожна). Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини,

який загоювався під кров'яним згустком. Експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали остеотропним матеріалом з октакальційфосфатом. Контроль посттравматичного стану кісткової тканини в ділянці дефекту здійснювали впродовж 84 діб. Серед методик були використані: моделювання кісткового дефекту, оцінка макроструктури щелеп, рентгенографічне дослідження, радіовізіографічне дослідження, вивчення мікропрепаратів шліфів кістки та лектиногістохімічні дослідження зрізів декальцинованої кістки.

Результати. Морфологічне дослідження експериментального кісткового дефекту нижньої щелепи після імплантації остеопластичного матеріалу з октакальційфосфатом дозволило виявити численні макроскопічні ознаки остеорегенерації, що корелювали з динамікою змін у шліфах кістки, на рентгенограмах та радіовізіограмах та з лектиногістохімічними характеристиками кістково-керамічного регенерату після трансплантації матеріалу в експериментальний дефект нижньої щелепи кролика, з'ясовані особливості мінеральної щільності кісткової тканини нижньої щелепи кролика та відновлення її якості при імплантації в його порожнину октакальційфосфату.

Висновки. Встановлено, що в експериментальній групі тварин, у яких пластику дефекту проводили з використанням матеріалу з октакальційфосфатом виявили доволі високу його остеоіндуктивну здатність та ефективність у порівнянні з контролем при загоєнні кісткової травми під кров'яним згустком.

Ключові слова: нижня щелепа, регенерація кісткової тканини, остеопластичні матеріали, морфологічне дослідження, лектиногістохімія.

MORPHOLOGICAL AND RADIOLOGICAL ASPECTS OF POST-TRAUMATIC REMODELING OF THE LOWER JAW AFTER OCTACALCIUM PHOSPHATE TRANSPLANTATION

Chelpanova I. V.

Abstract. Osteoplastic materials are widely used to treat bone defects, but the complete and qualitative regeneration of maxillofacial bones, its mechanisms, and dynamics remain incompletely understood. This study aims to use morphological, radiological, and lectin-histochemical methods to investigate the dynamics of bone tissue remodeling after defect creation and filling with osteoplastic material.

The aim of the study is to determine the dynamics of morphological, radiological, and lectin-histochemical characteristics of bone-ceramic regenerate after the transplantation of octacalcium phosphate into an experimental defect in the rabbit mandible.

Object and research methods. The study was conducted on 45 adult male rabbits aged 6-7 months, weighing 2.5-3 kg. The animals were divided into control and experimental groups (20 animals in each). An additional 5 intact animals were used to study the normal structure of bone tissue in the studied area of the lower jaw. The control group consisted of animals with a bone defect that healed under a blood clot. The experimental group consisted of rabbits in which the bone defect was filled with an osteotropic material containing octacalcium phosphate. Post-traumatic bone tissue status within the defect area was monitored for 84 days. The following methods were employed: bone defect modeling, assessment of jaw macrostructure, radiographic examination, radiovisiography, examination of bone sections under a microscope, and lectin-histochemical analysis of decalcified bone sections.

Results. Morphological examination of the experimental bone defect in the rabbit mandible after implantation of osteoplastic material with octacalcium phosphate revealed numerous macroscopic signs of osteoregeneration, which correlated with the dynamics of changes in bone sections, radiographs and radiovisiographs, and with the lectin-histochemical characteristics of the bone-ceramic regenerate after the transplantation of the material into the experimental defect in the rabbit mandible. The study elucidated the features of mineral density of the bone tissue of the rabbit mandible and the restoration of its quality after implantation of octacalcium phosphate into its cavity.

Conclusions. It was established that in the experimental group of animals in which defect repair was performed using material with octacalcium phosphate, a fairly high osteoinductive ability and effectiveness were revealed compared to the control group during the healing of bone trauma under a blood clot.

Key words: mandible/lower jaw, bone tissue regeneration, osteoplastic materials, morphological study, lectin-histochemistry.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Chelpanova I. V.: <https://orcid.org/0000-0001-5215-814X> ^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Chelpanova Iлона Vladyslavivna / Челпанова Ілона Владиславівна

Danylo Halytsky Lviv National Medical University / Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ukraine, 79010, Lviv, 52 Pekarska str. / Адреса: Україна, 79010, м. Львів, вул. Пекарська 52

Tel.: +380677209852 / Тел.: +380677209852

E-mail: ilona.med75@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 15.07.2024 / Стаття надійшла 15.07.2024 року

Accepted 14.11.2024 / Стаття прийнята до друку 14.11.2024 року