DOI: 10.26693/jmbs05.04.071

УДК 616.716.4-001.4-089-085.837-018.4

Варес Я. Е., Штибель Н. В.,
Логащ М. В., Штибель Д. В.

ГІСТОМОРФОМЕТРИЧНА ОЦІНКА ЗАГОЄННЯ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНИХ КІСТКОВИХ ДЕФЕКТІВ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПІД ВПЛИВОМ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОЇ УДАРНО-ХВИЛЬОВОЇ ТЕРАПІЇ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна

vares-dent@ukr.net

Метою дослідження була експериментальна оцінка динаміки змін структури кісткового регенерату в ділянці післяопераційного кісткового дефекту під впливом екстракорпоральної ударно-хвильової терапії на основі його кількісних характеристик. У експерименті було задіяно 18 статевозрілих кроликів віком від 6 місяців. Піддослідних тварин було стратифіковано на 2 рівні групи: основна група – загоєння кісткових дефектів шляхом аплікацій екстракорпоральної ударно-хвильової терапії; контрольна група – загоєння кісткових дефектів лише під кров'яним згустком без застосування фізичної стимуляції. Під комбінованим знечуленням внутрішньоротовим доступом білатерально на нижній щелепі моделювали порожнинні кісткові дефекти в межах лінгвальної та вестибулярної кортикальних пластинок. Тварин виводили з експерименту на 15, 45 та 90 добу. Гістоморфометричний аналіз проводився на платформі програми ImageJ. Визначали співвідношення площ міжклітинного матриксу і/або пухкої сполучної тканини, кровоносних судин, остеїду та кісткових балок. В основній групі у всіх ділянках післяопераційного кісткового дефекту спостерігалось поступове збільшення площі кісткової тканини із зменшенням площі остеїду. У середній та базальній третинах площа кісткової тканини у період від 45 до 90 доби спостереження зростає незначно, тоді як послідовне зменшення площі остеїду було статистично значущим. Значущої різниці між ділянками дослідження та часом спостереження для відносної площі судин нами не встановлено. Співвідношення структурних елемен-

тів кісткових дефектів в контрольній групі значуще не відрізнялося впродовж усього періоду спостереження з переважанням пухкої сполучної тканини. Тканини в ділянці кісткового дефекту у тварин, що отримували аплікації екстракорпоральної ударно-хвильової терапії в післяопераційному періоді, на різних порівнюваних етапах були більш зрілими та гістологічно спорідненими до інтактних тканин у порівнянні із контролем.

Ключові слова: порожнинні кісткові дефекти, щелепно-лицева ділянка, екстракорпоральна ударно-хвильова терапія, морфометричний аналіз.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Наукова робота проведена у рамках НДР «Пошук, впровадження і шляхи удосконалення методів діагностики та лікування запальних, травматичних процесів, дефектів та деформацій ЩЛД», № держ. реєстрації 0115U000046, шифр 10.01.001.15.

Вступ. Незважаючи на існування низки методів заміщення післяопераційних кісткових дефектів (ПКД) з метою відновлення анатомічної цілісності та функціональності зубощелепної системи [1], проблема реабілітації післяопераційних хворих в контексті біологічної повноцінності цієї системи залишається актуальною [2, 3]. На сьогодні, за повідомленнями різних авторів, частка порушень процесів репаративної регенерації становить 2,7-27,1% [2-4], що свідчить про необхідність пошуку додаткових засобів досягнення реституції ПКД щелеп.

Результати досліджень останніх років свідчать про ефективність застосування екстракорпоральної ударно-хвильової терапії (ЕУХТ) як методу фізичного впливу на загоєння ПКД [5-7]. Зокрема, застосування радіальної ЕУХТ індукує такі остеогенетичні фактори росту, як трансформуючий фактор росту бета-1 та кісткові морфогенетичні білки, що, як наслідок, ініціює активність остеобластів [7-10]. *Також ЕУХТ сприяє активації мітогенного ендотеліального фактору росту (VEGF), який забезпечує проліферацію клітин судинної стінки [11, 12], а відтак, покращує трофіку в ділянці кісткового регенерату.*

Проте, більшість наявної інформації ґрунтується лише на якісній оцінці результатів радіологічного і/або морфологічного досліджень, в той час, коли використання сучасних методів гістоморфометричного дослідження дозволяє статистично достовірно охарактеризувати тканинні зміни, що супроводжують процес загоєння ПКД за допомогою кількісних показників [13].

Мета дослідження – експериментально оцінити динаміку змін структури кісткового регенерату в ділянці ПКД, утвореного під впливом ЕУХТ в післяопераційному періоді на основі його кількісних характеристик.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проводилось із дотриманням принципів біоетики у відповідності з положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986р.), Директиви Ради Європи 2010/63/EU, Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», що підтверджено Протоколом №5 засідання комісії з питань етики при Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького від 23.02.2017р.).

У експерименті було задіяно 18 статевозрілих безпородних свійських кроликів (самців) віком від 6 місяців на початку експерименту та масою $2,5 \pm 0,2$ кг. Тварини утримувались у віварії ЛНМУ ім. Данила Галицького згідно санітарно-гігієнічних норм і правил із 3 разовим годуванням комбікормом та вівсом та вільним доступом до води. Піддослідних тварин було стратифіковано на 2 рівні групи наступним чином: основна група – загоєння ПКД шляхом аплікації ЕУХТ у післяопераційному періоді згідно нижче запропонованого нами протоколу; контрольна група - загоєння ПКД лише під кров'яним згустком без застосування фізичної стимуляції.

Перед операційним втручанням тварин знечувлювали за допомогою комбінації седативних середників та місцевого знеболення. Седацію проводили шляхом в/м ін'єкції літичної суміші, що скла-

далась із 0,2 мл 1% р-ну Димедролу (Галичфарм, Україна), 0,1 мл 0,1% р-ну Атропіну сульфату (Здоров'я, Україна) та 0,1 мл 10% р-ну Налбуфіну (Юрія-Фарм, Україна) [14, 15]. Місцевого знечулення досягали шляхом введення 0,5-0,7 мл Убістезину Форте (3М ESPE, Німеччина) за типом мандибулярної анестезії, адаптованої згідно топографічної анатомії нижньоальвеолярного нерва кролів.

Внутрішньоротовим доступом білатерально на нижній щелепі в ділянці діастеми рівновіддалено від коронок різців та першого премолара проводили півмісяцевий крестальний розріз слизової оболонки довжиною 1 см та відшаровували слизово-окисний клапоть. За допомогою фізюдиспенсера Implantmed (W&H, Австрія) та прямого наконечника на швидкості 40 000 об/хв із зрошенням 0,9% р-ном NaCl твердосплавною фрезою моделювали ПКД в межах лінгвальної та вестибулярної кортикальних пластинок без пошкодження періодонту нижніх різців. Після заповнення ПКД кров'яним згустком, слизово-окисний клапоть мобілізували та ушивали монофіламентним матеріалом, що розсмоктується на основі покритої капролактаном полігліколенової кислоти - Serafast 5-0 (Serag-Wiessner, Німеччина). У післяопераційному періоді тварини отримували 0,2 мл 25% р-ну Анальгін (Юрія-Фарм, Україна) в/м двічі на добу впродовж 2 днів та переводились на вівсяну дієту на цей період.

Для контролю морфометричних параметрів дефектів та навігації при заборі тканин для гістологічного дослідження, у програмі PointNix Real-Scan 2.0 (PointNix Co, Південна Корея) було створено віртуальні 3d-моделі лицевого скелету піддослідних тварин шляхом рендерингу DICOM-файлів, отриманих за допомогою конусно-променевої комп'ютерної томографії (КПКТ) (рис. 1). Для цього під описаною вище седацією на 2-ий день після формування ПКД проводили прижиттєву КПКТ за допомогою апарату PointNix Combi500 (PointNix Co, Південна Корея). З метою точного встановлення

Рис. 1. Віртуальна 3d-модель лицевого скелету кроля із ПКД в ділянці діастем нижньої щелепи

фрагмента щелепи, що підлягав гістологічному дослідженню, у вищезгаданому переглядачі комп'ютерних томограм визначали розташування ПКД подвійним методом: віддаленість від центральних різців нижньої щелепи у дистальному напрямку та від перших премолярів нижньої щелепи у мезіальному напрямку.

Для проведення аплікацій радіальної ЕУХТ тваринам основної групи було використано апарат Storz Medical Master Plus MP100 (Storz Medical, Німеччина) в режимі роботи 500 імпульсів частотою 5 Гц та величиною максимального тиску на фронті хвилі від 1,2 Бар. Для кращої провідності ударних хвиль було використано гель «ECO Supergel 260» (Ceracarta SpA, Італія) середньої в'язкості. Завдяки неінвазивності методу необхідність знечулення піддослідних тварин була відсутня. Курс ЕУХТ включав у себе 3 вищеписані процедури з інтервалом 1 тиждень, впродовж яких величина максимального тиску на фронті акустичної хвилі збільшувалась на 0,2 Бар з кожною наступною процедурою (від 1,2 Бар до 1,6 Бар).

Тварин (по 3 з кожної групи) виводили з експерименту на 15, 45 та 90 добу шляхом 10-кратного передозування 10% р-ну Налбуфіну (Юрія-Фарм, Україна) [16]. За допомогою віртуальних 3d-моделей для кожного окремого досліджуваного випадку встановлювали розташування попередньо сформованих ПКД та здійснювали забір відповідних фрагментів кістки нижньої щелепи розміром 0,5x1x1,5 см із збереженням прилеглих м'яких тканин. Фрагменти фіксували у 10% нейтральному розчині формаліну понад 2 доби. Декальцинація відбувалась у готовому розчині EDTA OsteoSoft® (MilliporeSigma, Німеччина) впродовж 7 діб. Після промивання у проточній водопровідній воді препарати обезводнювали у спиртах зростаючої концентрації (від 70% до 100%) та заливали розплавленим парафіном. Після охолодження блоків, за допомогою ротаційного мікротому створювали серійні зрізи товщиною 5 мкм. Отримані зрізи переносили на предметні скельця, депарафінізували ксилолом із проведенням у спиртах спадаючої концентрації (від 100% до 70%) та забарвлювали гематоксиліном Бемера та еозином за стандартною методикою. З метою диференціації остеїду та міжтрабекулярної речовини наступні серійні зрізи фарбували за трихром-Масоном.

Мікрофотографування гістопрепаратів проводили при збільшенні x40 за допомогою світлового мікроскопа моделі MEIJI TECHNO MT4300L (Meiji Techno, Японія) із фотонасадкою Canon EOS 550D (Canon, Японія) при витримці 1/10 с та значенням ISO 200. При цьому керування здійснювали за допомогою програмного забезпечення Darktable

версії 2.0.3 з отриманням зображень розміром 5184x3456 пікселів в колірному спектрі моделі sRGB.

Гістоморфометричний аналіз проводився на платформі програми ImageJ версії 1.52a (NIH, USA), яка вважається «золотим» стандартом морфометричних досліджень в царині клінічної та фундаментальної медицини [13, 17], зокрема завдяки широкій доступності та легкій адаптації програми під конкретні потреби користувачів. Аналізу підлягали первинні зображення у форматі JPEG без будь-якого проміжного редагування.

Для визначення співвідношення тканинних структур в кістковому регенераті було використано гістофотографії поперечних зрізів ділянки ПКД при 40-кратному збільшенні із наступним масштабуванням із пікселів у мікрометри згідно стандартної масштабної лінійки MEIJI. Враховуючи топографо-фізіологічні особливості перебігу репаративного остеогенезу, було виокремлено 3 наближено рівні за площею ділянки: субперіостальна, середня та базальна третини. Площу зазначених ділянок видимого дефекту вимірювали у міжкортикальному просторі за допомогою інструменту «Polygonal selection». Після цього визначали окремо сумарну площу ділянок міжклітинного матриксу і/або пухкої сполучної тканини, кровоносних судин, остеїду та кісткових балок. Для кожного досліджуваного випадку відсоткове співвідношення площі структурних елементів визначали відносно загальної площі кісткового регенерату в досліджуваній третині ПКД, яку приймали за 100%.

Отримані результати дослідження були опрацьовані способом варіаційної статистики за допомогою програми StatSoft Statistica 10 із застосуванням параметричного критерію Манна-Уїтні при довірчому інтервалі репрезентативності $p < 0,05$. Відносну площу утворених в ділянці ПКД тканин виражено через співвідношення площ та подано в усереднених відсотках (M) для кожної групи із вказанням стандартного відхилення (SD).

Результати дослідження та їх обговорення.

На 15 добу після моделювання ПКД у гістологічних препаратах нижньої щелепи тварин основної групи (рис. 2) ПКД були заміщені добре васкуляризованою волокнистою та пухкою сполучними тканинами, а також маломінералізованими остеїдом та юною кістковою тканиною у вигляді тонких балок з валиками остеобластів по периметру. Було виявлено ділянки залишкового запального інфільтрату, представленого лімфоцитами, макрофагами та плазматичними клітинами. За межами ПКД спостерігались поодинокі остеокласти, наявність яких вказує на процеси ремоделювання у інтактній кістковій тканині. На 45-ту добу (рис. 3) по всій площі

ПКД були неоднорідно виповнені переважно новоутвореною кістковою тканиною з різним ступенем мінералізації, остеїдом, оточеним остеобластичними валиками та пухкою сполучною тканиною. Гістологічна картина на 90 добу (рис. 4) в тварин основної групи відповідала реституції ПКД за рахунок губчастої кісткової тканини із балками різного розміру та різного ступеню мінералізації головним чином у субперіостальній третині.

Рис. 2. Загоєння порожнинного кісткового дефекту на 15 добу, основна група, поперечний зріз нижньої щелепи. 3б. х40

Рис. 3. Загоєння порожнинного кісткового дефекту на 45 добу, основна група, поперечний зріз нижньої щелепи. 3б. х40

На мікропрепаратах нижньої щелепи контрольної групи на 15-ту добу (рис. 5) ділянка ПКД була виповнена пухкою сполучною тканиною із запальним інфільтратом, представленим нейтрофілами та макрофагами. На 45-ту та 90-ту добу (рис. 6, 7) ПКД були виповнені незміненою пухкою сполучною тканиною із розсіяною лімфоцитарно-макрофагальною інфільтрацією. В середній та базальній третинах спостерігались поодинокі дрібні остеїдні

Рис. 4. Загоєння порожнинного кісткового дефекту на 90 добу, основна група, поперечний зріз нижньої щелепи. 3б. х40

Рис. 5. Загоєння порожнинного кісткового дефекту на 15 добу, контрольна група, поперечний зріз нижньої щелепи. 3б. х40

Рис. 6. Загоєння порожнинного кісткового дефекту на 45 добу, контрольна група, поперечний зріз нижньої щелепи. 3б. х40

Рис. 7. Загоєння порожнинного кісткового дефекту на 90 добу, контрольна група, поперечний зріз нижньої щелепи. 3б. х40

та маломінералізовані кісткові балки без ознак проліферації остеобластів. Що вказує на те, що змодельовані ПКД в контрольній групі не підлягали спонтанній остеорепації.

При дослідженні співвідношень площ структурних елементів кісткових регенератів в ділянці загоєння ПКД (табл. 1) було виявлено їхню зона- та періодоспецифічність, що також залежали від обраного методу лікування.

Відтак, у тварин основної групи у всіх досліджуваних ділянках ПКД спостерігалось поступове збільшення площі кісткової тканини із паралельним зменшенням площі остеоїду. Найбільш вираженими ці зміни були в ділянці субперіостальної третини: площа кісткових балок зросла від $10,55 \pm 1,73\%$ на 15 добу до $73,68 \pm 11,46\%$ на 90 добу; остеоїд, який на 15 добу виповнював $32,31 \pm 5,78\%$ площі ПКД, на 90 добу був відсутнім у всіх досліджуваних зразках. У середній та базальній третинах площа кісткової тканини у період від 45 до 90 доби спостереження зросла незначно, тоді як послідовне зменшення площі остеоїду було статистично значущим (від $28,05 \pm 6,09\%$ до $2,85 \pm 0,75\%$ у середній та від $25,16 \pm 3,54\%$ до $1,13 \pm 1,09\%$ у базальній третинах), що свідчить про стихання остеорепаративних та відновлення нормальних, остеорегенеративних процесів.

Причиною переважання кістковоутворюючих процесів у субперіостальній третині Kearney CJ et al. зазначають посилення активації клітин камбіального шару періосту при застосуванні різних доз ЕУХТ, що стимулює періостальний остеогенез та потовщення періосту [18]. Окрім цього, Cheng JH & Wang CJ також повідомляють про пролонгований ефект аплікацій ЕУХТ на репаративний остеогенез [12], який простежується і в нашому дослідженні.

Таблиця 1 – Відносна площа утворених у ділянці ПКД тканин на різних етапах загоєння ($M \pm SD$, %)

Термін, дні	15		45		90	
група	Основна	Контроль	Основна	Контроль	Основна	Контроль
<i>субперіостальна третина</i>						
Кісткові балки	$10,55 \pm 1,73\%^*$	-	$47,01 \pm 4,64\%^*\lambda$	-	$73,68 \pm 11,46\%^*\lambda$	-
Остеоїд	$32,31 \pm 5,78\%^*$	-	$5,47 \pm 1,36\%^*\lambda$	$2,08 \pm 1,67\%^*\lambda$	$-^*\lambda$	$0,33 \pm 0,28\%$
Судини	$5,46 \pm 0,76\%$	$2,35 \pm 1,26\%$	$13,02 \pm 1,94\%^*$	$1,81 \pm 1,20\%$	$1,72 \pm 0,75\%^*\lambda$	$2,03 \pm 1,97\%$
Міжтканинний матрикс пухка сполучна тканина	$51,68 \pm 3,09\%^*$	$97,65 \pm 1,26\%$	$34,50 \pm 5,54\%^*\lambda$	$96,11 \pm 1,02\%$	$24,60 \pm 11,43\%^*$	$97,64 \pm 2,22\%$
<i>середня третина</i>						
Кісткові балки	$12,49 \pm 1,94\%^*$	$1,56 \pm 1,50\%$	$37,83 \pm 3,27\%^*\lambda$	$1,32 \pm 1,17\%$	$40,16 \pm 9,67\%^*$	$1,40 \pm 1,39\%$
Остеоїд	$28,05 \pm 6,09\%^*$	-	$8,70 \pm 2,32\%^*\lambda$	$0,39 \pm 1,01\%$	$2,85 \pm 0,75\%^*\lambda$	$0,38 \pm 0,69\%$
Судини	$5,60 \pm 0,77\%^*$	$0,60 \pm 0,52\%$	$8,36 \pm 2,25\%$	$2,19 \pm 1,17\%$	$14,80 \pm 3,04\%^*$	$2,61 \pm 2,71\%$
Міжтканинний матрикс пухка сполучна тканина	$53,87 \pm 4,96\%^*$	$97,84 \pm 1,16\%$	$45,11 \pm 1,76\%^*$	$96,09 \pm 2,71\%$	$42,19 \pm 8,78\%^*$	$95,61 \pm 1,83\%$
<i>базальна третина</i>						
Кісткові балки	$13,79 \pm 2,37\%^*$	$0,98 \pm 0,65\%$	$39,68 \pm 4,07\%^*\lambda$	$4,23 \pm 1,33\%$	$42,11 \pm 14,70\%^*$	$5,37 \pm 6,33\%$
Остеоїд	$25,16 \pm 3,54\%^*$	$0,24 \pm 0,33\%$	$10,23 \pm 2,41\%^*\lambda$	$1,52 \pm 1,02\%$	$1,13 \pm 1,09\%^*\lambda$	$2,00 \pm 1,41\%$
Судини	$3,59 \pm 0,38\%$	$1,03 \pm 0,57\%$	$6,74 \pm 1,63\%^*$	$1,71 \pm 2,31\%$	$10,96 \pm 1,05\%^*$	$2,49 \pm 2,93\%$
Міжтканинний матрикс пухка сполучна тканина	$57,46 \pm 4,28\%^*$	$97,75 \pm 1,07\%$	$43,36 \pm 4,96\%^*$	$92,54 \pm 2,52\%$	$45,80 \pm 13,91\%^*$	$90,14 \pm 8,22\%$

Примітки: * – різниця статистично значуща ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою; λ – різниця статистично значуща ($p < 0,05$) у порівнянні з попереднім терміном спостереження.

Враховуючи відносно невелику площу судин та її широку варіабельність в усіх досліджуваних зразках гістопрепаратів щелеп тварин основної групи, значущої різниці між ділянками дослідження та часом спостереження для цього показника нами не встановлено. Проте наявна статистична різниця у частці площі ПКД, що припадає на судини між основною та контрольною групами. Аналогічні за суттю результати було отримано Cheng JH & Wang CJ, 2015 та C. Bereket et al., 2018 у експерименті на нижній щелепі кролів: при одноразовому застосуванні ЕУХТ дозою 500 та 1000 імпульсів в ділянці кісткового регенерату, отриманого шляхом дистракційного остеогенезу, відзначали збільшення об'єму судин у порівнянні із контролем [7, 12].

У той же час, аналіз динаміки площі міжтканинного матриксу вказує на його роль буфера у формуванні об'єму ПКД. Зазначимо, що співвідношення структурних елементів ПКД в контрольній групі значуще не відрізнялося впродовж усього періоду спостереження. А враховуючи, що в контрольній групі кісткова тканина виповнювала не більше 10% площі дефекту, то отримані ПКД згідно C. Bosch et al [19] належать до дефектів критичного розміру та

є достовірною моделлю для вивчення процесів репаративного остеогенезу.

Таким чином, при застосуванні радіальної ЕУХТ за пропонуванням нами протоколом, загоєння ПКД відбувається шляхом поступової реституції кісткової тканини, в той час як у контролі спостерігалась значно виражена субституція пухкою сполучною тканиною.

Висновки. Тканини в ділянці ПКД у тварин, що отримували ЕУХТ в післяопераційному періоді, на різних порівнюваних етапах були більш зрілими та гістологічно спорідненими до інтактних тканин у порівнянні із контролем. Також для них була характерною поява значної кількості остеоїду на більш ранніх етапах та, відповідно, зменшення його кількості наприкінці за рахунок збільшення площі новоутвореної кісткової тканини.

Перспективи подальших досліджень. У вивченні впливів ЕУХТ в царині щелепно-лицевої хірургії перспективним є дослідження якісних змін суміжних із ПКД ділянок інтактною кісткою, з'ясування впливу ЕУХТ на пошкоджений та інтактний періодонт та проведення клінічних досліджень у вказаному напрямку.

References

1. Sheikh Z, Hamdan N, Abdallah M-N, Glogauer M, Grynpas M. Natural and synthetic bone replacement graft materials for dental and maxillofacial applications. In: *Advanced dental biomaterials*. Elsevier, Amsterdam, 2019: 347-76.
2. Stewart S, Bryant SJ, Ahn J, Hankenson KD. Bone Regeneration. *Translational Regenerative Medicine*. 2015; 2015: 313-33. doi: 10.1016/b978-0-12-410396-2.00024-4
3. Ansari M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in Biomaterials*. 2019; 8: 223-237 doi: 10.1007/s40204-019-00125-z
4. Gertsen GI, Se-Fey, Ostapchuk RM, Lisovyy OV, Slabospyskyi AV. Vplyv ekstrakorpornoj udarno-khvylovoj terapiji na zroshchennya perelomiv kistok (oglyad literatury) [The effect of extracorporeal shock wave therapy on the fusion of bone fractures (literature review)]. *Visnyk ortopediyi, travmatologiyi ta protezuvannya*. 2017; 1: 61-5. [Ukrainian]
5. Inanmaz ME, Uslu M, Isik C, Kaya E, Tas T, Bayram R. Extracorporeal shockwave increases the effectiveness of systemic antibiotic treatment in implant-related chronic osteomyelitis: experimental study in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2014 Jun; 32(6): 752-6. doi: 10.1002/jor.22604
6. Pfaff JA, Boelck B, Bloch W, Nentwig GH. Growth Factors in Bone Marrow Blood of the Mandible With Application of Extracorporeal Shock Wave Therapy. *Implant Dentistry*. 2016 Oct; 25(5): 606-12. doi: 10.1097/ID.0000000000000452
7. Bereket C, Çakir-Özkan N, Önger ME, Arici S. The Effect of Different Doses of Extracorporeal Shock Waves on Experimental Model Mandibular Distraction. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 2018 Sep; 29(6): 1666-70. doi: 10.1097/SCS.00000000000004571
8. Hausdorf J, Sievers B, Schmitt-Sody M, Jansson V, Maier M, Mayer-Wagner S. Stimulation of bone growth factor synthesis in human osteoblasts and fibroblasts after extracorporeal shock wave application. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011; 131(3): 303-9. doi: 10.1007/s00402-010-1166-4
9. Romeo P, Lavanga V, Pagani D, Sansone V. Extracorporeal shock wave therapy in musculoskeletal disorders: a review. *Med Princ Pract*. 2014; 23(1): 7-13. doi: 10.1159/000355472
10. Huang HM, Li XL, Tu SQ, Chen XF, Lu CC, Jiang LH. Effects of Roughly Focused Extracorporeal Shock Waves Therapy on the Expressions of Bone Morphogenetic Protein-2 and Osteoprotegerin in Osteoporotic Fracture in Rats. *Chin Med J*. 2016; 129: 2567-75.
11. Griffin V, Iqbal SA. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *J Bone Joint Surg Br*. 2011; 93(4): 427-34.
12. Cheng JH, Wang CJ. Biological mechanism of shockwave in bone. *Int J Surg*. 2015 Dec; 24(PtB): 143-6. doi: 10.1016/j.ijsu.2015.06.059

13. Malhan D, Muelke M, Rosch S, Schaefer AB, Merboth F, Weisweiler D, et al. An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry. *Front Endocrinol.* 2018; 9: 666. doi: 10.3389/fendo.2018.00666
14. Lester PA, Gaynor JS, Hellyer PW, Mama K, Wagner AE. The sedative and behavioral effects of nalbuphine in dogs. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2003; 42: 27-31.
15. Gomes, VH, Oliveira, RL, Marques, JL, Coelho, CM, Silva, MF. Comparison of the sedative effects of nalbuphine and butorphanol, alone or in combination with acepromazine in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia.* 2018; 45(1): 68-72. doi:10.1016/j.vaa.2017.08.003
16. Logash M, Pokotylo P, Zboina B, Stępień RB. Nalbuphine: some aspects of the research and applications. *Medical Studies/Studia Medyczne.* 2017; 33(2): 146-54. doi: 10.5114/ms.2017.68710
17. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods.* 2012; 9(7): 671-5.
18. Kearney CJ, Lee JY, Padera RF, Hsu HP, Spector M. Extracorporeal shock wave-induced proliferation of periosteal cells. *J Orthop Res.* 2011; 29(10): 1536-43. doi:10.1002/jor.21346
19. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *The Journal of Craniofacial Surgery.* 1998; 9(4): 310-6.

УДК 616.716.4-001.4-089-085.837-018.4

ГИСТОМОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЗАЖИВЛЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ УДАРНО-ВОЛНОВОЙ ТЕРАПИИ

Варес Я. Э., Штибель Н. В., Логаш М. В., Штибель Д. В.

Резюме. Целью исследования была экспериментальная оценка динамики изменений структуры костного регенерата в области послеоперационного костного дефекта под влиянием экстракорпоральной ударно-волновой терапии на основе его количественных характеристик. В эксперименте было задействовано 18 половозрелых кроликов в возрасте от 6 месяцев. Подопытных животных было стратифицировано на 2 равные группы: основная группа – заживление костного дефекта путем аппликаций экстракорпоральной ударно-волновой терапии; контрольная группа – заживление костного дефекта только под кровяным сгустком без применения физической стимуляции. Под комбинированным обезболиванием внутривенным доступом билатерально на нижней челюсти моделировали полостные послеоперационные костные дефекты в пределах лингвальной и вестибулярной кортикальных пластинок. Животных выводили из эксперимента на 15, 45 и 90 сутки. Гистоморфометрический анализ проводился на платформе программы ImageJ. Определяли соотношение площади межклеточного матрикса и/или рыхлой соединительной ткани, кровеносных сосудов, остеоида и костных балок. В основной группе у всех участках костного дефекта наблюдалось постепенное увеличение площади костной ткани с уменьшением площади остеоида. В средней и базальной третях площадь костной ткани в период от 45 до 90 суток наблюдения выросла незначительно, тогда как последовательное уменьшение площади остеоида было статистически значимым. Значимой разницы между участками исследования и временем наблюдения для относительной площади сосудов не установлено. Соотношение структурных элементов послеоперационных костных дефектов в контрольной группе значимо не отличалось в течение всего периода наблюдения с преобладанием рыхлой соединительной ткани. Ткани в области костных дефектов у животных, получавших экстракорпоральную ударно-волновую терапию в послеоперационном периоде, на различных сравнимых этапах были более зрелыми и гистологически родственными к интактным тканям по сравнению с контролем.

Ключевые слова: полостные костные дефекты, челюстно-лицевая область, экстракорпоральная ударно-волновая терапия, морфометрический анализ.

UDC 616.716.4-001.4-089-085.837-018.4

Histomorphometric Evaluation of Postoperative Mandibular Bone Defects Healing under Extracorporeal Shock Wave Therapy

Vares Y. E., Shtybel N. V., Logash M. V., Shtybel D. V.

Abstract. The last-year scientific data claims the efficiency of extracorporeal shock wave therapy, as method of physical stimulation on postoperative bone defects healing. Furthermore, majority of that data is based on quality evaluation of results of radiological and morphological investigations only.

The purpose of study was experimental dynamics evaluation of structural changes of tissues in postoperative hollow bone defects area under extracorporeal shock wave therapy, based on quantity characteristics.

Material and methods. The study was performed according to bioethical principles approved on local ethics committee. 18 mature male rabbits aged from 6 months were stratified as follows: healing of postoperative bone defect under blood clot with applications of extracorporeal shock wave therapy was performed in the main group; healing under blood clot only was performed in the control group. Under combined anesthesia via intraoral semilunar crestal approach bilaterally on area of mandible's diastema were modeled hollow bone defects, limited with lingual and vestibular cortical plates. Muco-periosteal flaps were mobilized; wounds were sutured to get primary healing of mucosa. Three-time extracorporeal shock wave therapy was applied in area of bone defects on mandible in main group with one-week interval. Animals were sacrificed on the 15th, 45th and 90th day. Histomorphometry was performed using ImageJ application. Microphotographs with 40-x magnification were used for evaluation of tissue ratio in modeled bone defects. We measured the area of subperiosteal, medial and basal defect's regions in intracortical space. Then we measured the total area of separate tissues as soft connective tissue, blood vessels, osteoid and cancellous bone and presented as relative-to-defect area.

Results and discussion. We observed gradual increase of cancellous bone with osteoid area decrease in all postoperative bone defects regions in the main group. Between 45th and 90th days of investigation, the area of bone tissue in medial and basal thirds increased not significantly. However, gradual decrease of osteoid area was statistically significant. In the area of blood vessels, we observed significant difference among groups, and no investigated thirds or evaluation time. Tissue ratio of postoperative bone defects area in control group had no difference along all investigation period, mostly presented by soft connective tissue with poor separate osseous areas.

Conclusion. Tissues in postoperative bone defects area in animals, who received extracorporeal shock wave therapy, were more mature and histologically close to intact tissues comparing to postoperative bone defects healed under blood clot only.

Keywords: bone defects, maxillofacial area, extracorporeal shock wave therapy, morphometry.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 17.05.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування