

DOI 10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-214-217

УДК 616.716.4-007.237-085.837-092.9

<sup>1</sup>Варес Я. Е., <sup>1</sup>Штибель Н. В., <sup>1,2</sup>Кучер А. Р., <sup>3</sup>Студент В. О., <sup>1,4</sup>Дудаш А. П.**МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОГО КІСТКОВОГО ДЕФЕКТУ ПІД ВПЛИВОМ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОЇ УДАРНО-ХВИЛЬОВОЇ ТЕРАПІЇ**<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)<sup>2</sup>Центр ультразвукової діагностики «Ультрамед» (м. Львів)<sup>3</sup>Центр медичної 3d діагностики (м. Львів)<sup>4</sup>Західноукраїнська гістологічна лабораторія (м. Львів)

shnw05@gmail.com

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Наукова робота проведена у рамках НДР «Пошук, впровадження і шляхи удосконалення методів діагностики та лікування запальних, травматичних процесів, дефектів та деформацій ЩЛД», № державної реєстрації 0115U000046, шифр 10.01.001.15.

**Вступ.** Впродовж десятиліть відновлення об'єму втраченої кісткової тканини залишається важливою проблемою, що стоїть на шляху реабілітації стоматологічних хворих хірургічного профілю [1]. Низкою вітчизняних та іноземних вчених було доведено ефективність застосування екстракорпоральної ударно-хвильової терапії (ЕУХТ) з метою оптимізації загоєння кісткових дефектів (КД) не лише в царині загальної ортопедії [2-4], а й у стоматології зокрема [5-7]. Проте, недостатньо вивченими є морфологічні зміни кісткового регенерату в ділянці загоєння післяопераційних порожнинних КД критичного розміру. Також дискусійним залишається питання вибору оптимального протоколу проведення ЕУХТ при необхідності впливу на репаративні процеси в кістковій тканині.

Тому, **метою цієї роботи** було вивчення в умовах експерименту змін якості кісткового регенерату та його тканинного складу в процесі загоєння післяопераційних порожнинних КД.

**Об'єкт і методи дослідження.** 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. 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, 1986 р.), 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 23.02.2017 р.).

Піддослідних тварин було стратифіковано наступним чином: група А – загоєння КД шляхом аплікацій ЕУХТ із сталою величиною максимального тиску на фронті хвилі; група В – загоєння дефекту шляхом аплікацій ЕУХТ із зростаючою величиною макси-

мального тиску; група С – контрольна: загоєння КД лише під кров'яним згустком.

Перед операційним втручанням та конусно-променевою комп'ютерною томографією (КПКТ) тваринам проводили седацію шляхом в/м ін'єкції літичної суміші (0,2 мл 1% Sol. Dimedroli, 0,1 мл 0,1% Sol. Atropinii Sulfatis та 0,1 мл 10% Sol. Nalbufini). Для місцевого знечуження перед моделюванням дефектів проводилась мандибулярна та інфільтраційна анестезія 0,5-0,7 мл 4% Ubistesini forte.

Внутрішньоротовим доступом білатерально на нижній щелепі в ділянці діастеми рівновіддалено від коронок різців та першого премоляра крестально проводили півмісяцевий розріз слизової оболонки довжиною 1 см та відшаровували слизово-окисний клапоть. За допомогою фізіодиспенсера Implantmed W&H (Австрія) та прямого наконечника на швидкості 40 000 об/хв із зрошенням 0,9% р-ном NaCl твердосплавною фрезою моделювали порожнинний КД діаметром 4 мм і глибиною 3 мм. Після заповнення КД кров'яним згустком, слизово-окисний клапоть мобілізували та ушивали монофіламентним матеріалом Serafast 5-0 (Serag-Wiessner, Німеччина). У післяопераційному періоді тварини отримували 0,2 мл 25% Sol. Analginu в/м двічі на добу впродовж 3 днів.

Для проведення аплікацій ЕУХТ було використано апарат Storz Medical Master Plus MP100 (Німеччина) в режимі роботи 500 імпульсів частотою 5 Гц та величиною максимального тиску на фронті хвилі від 1,2 Бар. Курс включав у себе 3 вищеописані процедури з інтервалом 1 тиждень, впродовж яких у групі А величина максимального тиску на фронті акустичної хвилі була сталою (1,2 Бар), а в групі В збільшувалась на 0,2 Бар з кожною наступною процедурою (від 1,2 Бар до 1,6 Бар).

КПКТ проводилась на 2-ий, 15-ий, 45-ий, 90-ий дні після формування КД за допомогою апарату PointNix Combi500 (Південна Корея) із введенням кістково еквівалентного фантома в поле сканування. Було застосовано уніфіковані налаштування: об'єм сканування 9x12 см, величина вокселя 0,18 мм. Також, в усіх серіях сканувань, використовувались однакові показники роботи рентгенівської трубки, а саме 7 мА та 62 кВ, що було необхідним для нівелювання можливих оптичних похибок для визначення щільності кісткової тканини. Рендеринг отриманих сканів здійснювався на платформі програми PointNix RealScan 2.0.

Вимірювання щільності кісткової тканини (ЩКТ) в ділянці КД проводилось за оцінкою одиниць гра-

дацій сірого та оптичної щільності із калібруванням значень відповідно до відхилень рентгенологічної щільності фантома за наступними формулами:

$${}^d\text{ЩКТ} = {}^d\text{ЩКТ}' + \Delta^d\text{ph} \quad (1),$$

де  ${}^d\text{ЩКТ}'$  – вимірне безпосередньо на КПКТ значення кісткової щільності на 15-ий, 45-ий, 90-ий післяопераційні дні, а  $\Delta^d\text{ph}$  – відхилення значень щільності фантома для цієї КПКТ. При цьому,

$$\Delta^d\text{ph} = {}^o\text{ph} - {}^d\text{ph} \quad (2),$$

де  ${}^o\text{ph}$  – вихідне значення рентгенологічної щільності фантома на КПКТ другого післяопераційного дня,  ${}^d\text{ph}$  – отримане значення щільності фантома на 15-ту, 45-ту чи 90-ту добу відповідно. Для замірів було обрано ділянки КД на глибині 1 мм, 2 мм та 3 мм, що відповідало розташуванню кортикальної, трабекулярної кісток та ділянки дна дефекту.

Приріст кісткової тканини оцінювався за формулою:

$$\Delta^d\text{ЩКТ}_x = {}^d\text{ЩКТ}_x - {}^o\text{ЩКТ}_x \quad (3),$$

де  $x$  – рівень вимірювання щільності (1-3 мм),  $d$  – 15-ий, 45-ий або 90-ий дні після операції,  $o$  – 2-ий післяопераційний день. Для кращої наочності порівнювались відсоткові значення приросту ( ${}^d\Delta_x$ ) відносно нормальної рентгенологічної щільності інтактної кісткової тканини на відповідному рівні ( ${}^o\text{ЩКТ}_N$ ), отриманні з наступної пропорції:

$${}^d\Delta_x / 100\% = \Delta^d\text{ЩКТ}_x / \Delta^o\text{ЩКТ}_x \quad (4),$$

при чому

$$\Delta^o\text{ЩКТ}_x = {}^o\text{ЩКТ}_N - {}^o\text{ЩКТ}_x \quad (5).$$

Таким чином, за 100% було прийнято значення різниці ЩКТ між ділянками інтактної кістки та кісткового дефекту станом на 2-ий післяопераційний день, а загоєнням вважалася умова, при якій

$${}^d\Delta_x \approx 0\% \quad (6).$$

Згідно з пропорцією {4} та формулами {3} і {5} було обчислено відносні значення приросту, що достовірно та наочно характеризують перебіг загоєння кісткових порожнинних дефектів:

$${}^d\Delta_x = 100\% \times ({}^d\text{ЩКТ}_x - {}^o\text{ЩКТ}_x) / ({}^o\text{ЩКТ}_N - {}^o\text{ЩКТ}_x) \quad (7).$$

Тварин (по 2 з кожної групи) виводили з експерименту на 14, 45 та 90 добу шляхом 10-кратного передозування 10% Sol. Nalbufini, після чого здійснювали білатеральний забір 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® (Німеччина) впродовж 7 діб. Після промивання у проточній водопровідній воді препарати обезводнювали у спиртах зростаючої концентрації (70% – 100%), заливали розплавленим парафіном, а після його охолодження створювали зрізи товщиною 5мкм за допомогою ротаційного мікротому. Отримані зрізи перенесли на предметні скельця, депарафінізували ксилолом із проведенням у спиртах спадаючої концентрації (100% – 70%) та забарвлювали гематоксиліном Бемера та еозинном за стандартною методикою.

Мікрофотографування гістопрепаратів проводили при збільшенні 40x, 100x, 200x та 400x за допомогою світлового мікроскопа моделі MEIJI TECHNO MT4300L (Японія) із фотонасадкою Canon EOS 550D (Японія) та програмним забезпеченням Darktable версії 2.0.3.

Отримані результати дослідження були опрацьовані способом варіаційної статистики за допомогою програми StatSoft Statistica 10 із застосуванням параметричного критерію Мана-Уїтні при довірчому інтервалі репрезентативності  $p < 0,05$ . Середні значення приросту було подано у відсотках із вказанням стандартного відхилення (SD).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Згідно результатів оцінки КПКТ, ЩКТ в ділянці КД змінювалась залежно від ділянки вимірювання та обраного методу лікування. На 15-ий день спостереження приріст ЩКТ в групах А та В значуще не відрізнявся між ділянками дослідження. Відтак, на глибині 1 мм він становив  $+9,6 \pm 1,1\%$  і  $+11,0 \pm 2,8\%$  відповідно. У групі С приріст у вищезгаданій ділянці становив  $+3,4 \pm 4,1\%$ . На глибині 2 мм і 3 мм тенденції приросту ЩКТ були незмінними, проте спостерігалось зростання різниці між значеннями:  $+16,9 \pm 3,9\%$  і  $+13,2 \pm 3,8\%$  відповідно у групі А,  $+15,8 \pm 6,3\%$  і  $+14,2 \pm 6,9\%$  відповідно у групі В та  $+4,0 \pm 2,7\%$  і  $+6,5 \pm 2,0\%$  у групі С.

На 45-ту добу приріст ЩКТ був найбільш виражений у групі В у ділянці дна КД та становив  $+77,3 \pm 17,2\%$ . При цьому у вищезгаданій групі найменш виражений приріст спостерігався на глибині 2 мм і становив  $+36,9 \pm 6,8\%$  в той час, як на рівні кортикальної пластинки приріст ЩКТ становив  $+33,4 \pm 3,3\%$ . Дещо менші значення приросту ЩКТ зафіксовано в групі А:  $+27,9 \pm 6,9\%$ ,  $+29,3 \pm 13,2\%$  і  $+40,2 \pm 15,6\%$  на глибині 1 мм, 2 мм та 3 мм відповідно. На противагу, в групі С на 45-ий день спостереження значущого зростання ЩКТ не відбулось: відносний приріст щільності коливався від  $+4,0 \pm 3,5\%$  на глибині 2 мм до  $+3,4 \pm 1,3\%$  на рівні кортикальної пластинки.

На 90-ту добу спостереження у групах А та В достовірне визначення локалізації КД не було можливим у зв'язку з відсутністю будь-яких КТ-ознак порушення цілісності нижньої щелепи у 6 з 8 випадків спостережень. Рівномірність значень ЩКТ на усій протяжності досліджуваної ділянки як інтактної кістки, так і місця попередньо існуючого КД, свідчить про «рентгенологічне» загоєння. Натомість, у групі С ЩКТ залишалась практично незмінною (приріст становив від  $4,0 \pm 2,1\%$  на поверхні дефекту до  $6,8 \pm 3,5\%$  на глибині 3 мм).

У гістологічних препаратах нижньої щелепи, що відповідають стану кісткової та прилеглих тканин на 15 добу після моделювання КД, у тварин груп А та В ділянка КД периферично на 2/3 була заміщена композицією добре васкуляризованої волокнистої та пухкої сполучної тканини із незначно вираженою лімфоцитарно-макрофагальною інфільтрацією. За межами КД виявлено поодинокі остеокласти, що свідчить про процеси ремоделювання у операційно незмінній кістковій тканині. Зі сторони інтактних стінок КД та розволокненого періосту спостерігались поодинокі маломінералізовані остеоїдні балки з валіками остеобластів по периметру.

На 45-ту добу (рис. 1, 2) по всій площі КД були неоднорідно виповнені переважно остеоїдом (О), кістковою тканиною *de novo* різного ступеню мінералізації (МК) із остеобластичними валіками (Об) та пухкою сполучною тканиною (ПСТ). При цьому маломінералізований остеоїд переважав у групі А, в той час як для групи В більш характерною була значна кількість кісткових балок, зокрема зі сторони

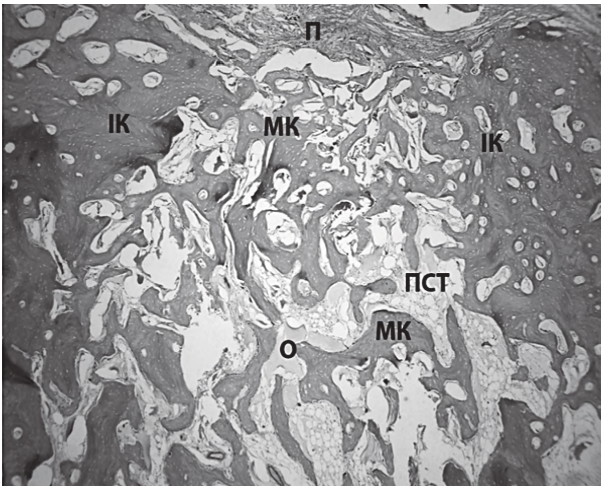


Рисунок 1 – Загоєння порожнинного кісткового дефекту на 45 добу, група В, поперечний зріз нижньої щелепи, збільшення 40х (пояснення в тексті).

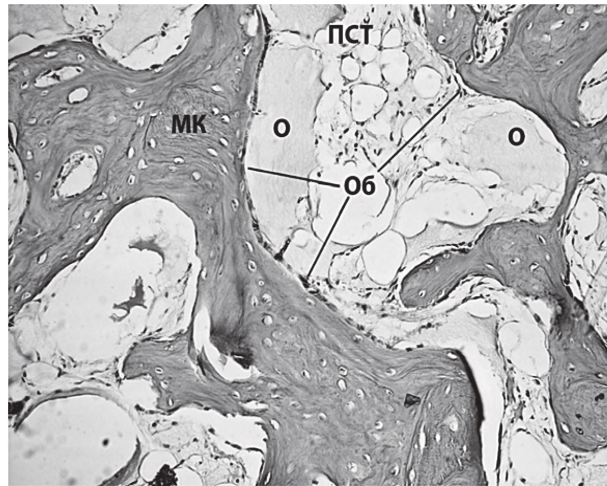


Рисунок 2 – Заміщення дефекту кістковими балками різного ступеню осифікації на 45-ту добу, група В, поперечний зріз нижньої щелепи, збільшення 200х (пояснення в тексті).

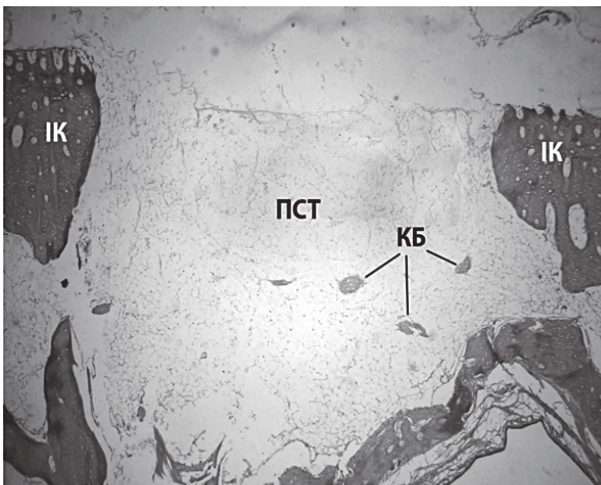


Рисунок 3 – Порожнинний кістковий дефект на 45 добу, група С, поперечний зріз, збільшення 40х (пояснення в тексті).

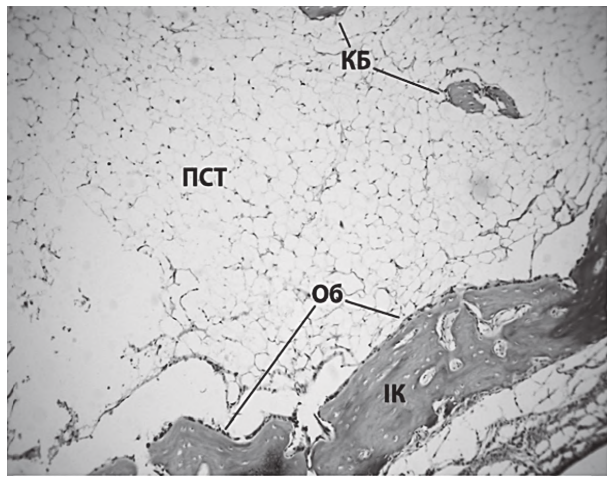


Рисунок 4 – Стінка кісткового дефекту, група С, поперечний зріз, збільшення 100х (пояснення в тексті).

періосту (П). Залишковий запальний інфільтрат був представлений лімфоцитами, макрофагами та плазматичними клітинами. Гістологічна картина на 90 добу в тварин групи А відповідала реституції КД за рахунок різномінералізованої губчастої кістки, тоді як у тварин групи В новоутворена кісткова тканина структурно не відрізнялась від інтактної.

На 15-ту добу на мікропрепаратах нижньої щелепи у групі С ділянка КД була виповнена пухкою сполучною тканиною, інфільтрованою нейтрофілами та макрофагами (як наслідок операційної травми). На 45-ту (рис. 3, 4) та 90-ту добу КД були виповнені незміненою пухкою сполучною тканиною (ПСТ) із розсіяною круглоклітинною лімфоцитарно-макрофагальною інфільтрацією. По периферії інтактної кісткової тканини (ІК) спостерігалась проліферація остеобластів (ОБ). Не зважаючи на появу поодиноких дрібних маломінералізованих кісткових балок (КБ) змодельовані післяопераційні порожнинні КД не підлягали спонтанній репарації.

**Висновки.** В умовах експерименту застосування ЕУХТ як зі сталою величиною максимального тиску на фронті хвилі, так і зі зростаючою, зумовлюють загоєння післяопераційних порожнинних КД критичного розміру. При цьому, рентгенологічно та гістологічно виявлені зміни кісткової тканини вказують на ініціацію процесів репарації як в межах інтактної кістки, що оточує кістковий дефект, так і зі сторони періосту. При використанні з терапевтичною метою ЕУХТ зі сталою величиною максимального тиску на фронті хвилі заміщення КД відбувається за рахунок різномінералізованої губчастої кістки, тоді як при зростаючій величині максимального тиску від 1,2 Бар до 1,6 Бар новоутворена кісткова тканина структурно не відрізняється від інтактної.

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

### Література

1. Stewart S, Bryant SJ, Ahn J, Hankenson KD. Bone Regeneration. *Translational Regenerative Medicine*. 2015;313-33. DOI: 10.1016/b978-0-12-410396-2.00024-4
2. Schaden W, Mittermayr R, Haffner N, Smolen D, Gerdesmeyer L, Wang CJ. Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) – First choice treatment of fracture non-unions? *International Journal of Surgery*. 2015 Dec;24(PtB):179-83. DOI: 10.1016/j.ijssu.2015.10.003

- Hertsen HI, Se-Fei, Ostaychuk RN. Dynamika aktyvnosti imunnykh klityn syrovatky krovi pid vplyvom ekstrakorporealnoyi udarno-khvylovoi terapiyi pry eksperymentalnomu ushkodzhenni kistky. *Travma*. 2016;17(2):43-8. [in Ukrainian].
- Massari L, Benazzo F, Falez F, Perugia D, Pietrogrande L, Setti S, et al. Biophysical stimulation of bone and cartilage: state of the art and future perspectives. *International Orthopaedics*. 2019;43(3):539-51. DOI: 10.1007/s00264-018-4274-3
- 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
- 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
- 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

## МОРФОЛОГІЧНІЗМІНИПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОГОКІСТКОВОГОДЕФЕКТУПІДВПЛИВОМЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОЇ УДАРНО-ХВИЛЬОВОЇ ТЕРАПІЇ

Варес Я. Е., Штибель Н. В., Кучер А. Р., Студент В. О., Дудаш А. П.

**Резюме.** 18 статевозрілим кролям на нижній щелепі було сформовано порожнинні кісткові дефекти діаметром 4 мм та глибиною 3 мм. Тварини двох дослідних груп тричі отримували ЕУХТ по 500 імпульсів частотою 5 Гц та величиною максимального тиску на фронті хвилі 1,2 Бар або із збільшенням цього параметру (від 1,2 Бар до 1,6 Бар), дефекти у контролі гоїлись під кров'яним згустком. Згідно результатів оцінки щільності кісткової тканини на сканах КПКТ та гістологічних досліджень застосування ЕУХТ як зі сталою величиною максимального тиску на фронті хвилі, так і зі зростаючою, зумовлюють загоєння післяопераційних порожнинних кісткових дефектів критичного розміру.

**Ключові слова:** порожнинні кісткові дефекти, щелепно-лицева ділянка, екстракорпоральна ударно-хвильова терапія, конусно-променева комп'ютерна томографія, щільність кісткової тканини.

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО КОСТНОГО ДЕФЕКТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ УДАРНО-ВОЛНОВОЙ ТЕРАПИИ

Варес Я. Е., Штибель Н. В., Кучер А. Р., Студент В. О., Дудаш А. П.

**Резюме.** 18 половозрелым кроликам на нижней челюсти было сформировано полостные костные дефекты диаметром 4 мм и глубиной 3 мм. Животные двух подопытных групп трижды получали ЭУВТ по 500 импульсов частотой 5 Гц и величиной максимального давления на фронте волны 1,2 Бар или с увеличением этого параметра (от 1,2 Бар до 1,6 Бар), в контроле заживление происходило под кровяным сгустком. Согласно результатам оценки плотности костной ткани на сканах КЛКТ и гистологических исследований применения ЭУВТ как с постоянной величиной максимального давления на фронте волны, так и с растущей, обуславливают заживления послеоперационных полостных костных дефектов критического размера.

**Ключевые слова:** полостные костные дефекты, челюстно-лицевая область, экстракорпоральная ударно-волновая терапия, конусно-лучевая компьютерная томография, плотность костной ткани.

## MORPHOLOGICAL CHANGES OF POSTOPERATIVE BONE DEFECT UNDER EXTRACORPOREAL SHOCK WAVE THERAPY

Vares Y. E., Shtybel N. V., Kucher A. R., Student V. O., Dudash A. P.

**Abstract.** Restoring the integrity and volume of bone loss has been a major medical problem for decades. Extracorporeal shock wave therapy is one of the effective methods of impact on reparative osteogenesis.

*The aim* was to study the changes in the quality of bone regenerate and its tissue composition in the process of postoperative bone defects healing in the experiment.

*Object and methods.* Bone defects with a diameter of 4 mm and a depth of 3 mm were modeled in the area of the mandible diastema in 18 mature rabbits over 6 months of age with a mean body weight  $2.5 \pm 0.2$  kg under combined anesthesia and following bioethics principles. Animals were stratified as follows: group A – bone defect healing under ESWT applications with constant maximum wave front pressure (1,2 Bar); group B – healing of the defect under ESWT applications with increasing maximum pressure (1,2-1,6 Bar); group C – control: bone defects healing under a blood clot only. In the early postoperative period, animals of groups A and B received ESWT, which included 3 applications of 500 pulses with a frequency of 5 Hz. CBCT was performed on the 2nd, 15th, 45th, 90th day with a bone-equivalent phantom in the scanning field. Bone density (BD) in the area of bone defect was measured at a depth of 1 mm, 2 mm and 3 mm (which corresponded to the cortical, cancellous bone and the floor of the defect) on grayscale units and the optical density evaluation with calibration of values according to the deviations of radiographic density of the phantom. For better clarity were compared the percentage meaning of the increase relative to the normal X-ray density of intact bone. Histological investigation was performed on 15, 45, 90 days after surgery.

*Results.* According to the CBCT assessment, BD in the defect area varied depending on the measurement site and the chosen treatment method. Thus, at all stages of the observation, the increase in BD was highest in group B, slightly lower in group A and non-significant in the control group. Defects treated with ESWT with constant maximum wave front pressure were replaced with cancellous bone with different mineralization level and a significant amount of osteoid in the early stages, while with increasing maximum pressure from 1.2 Bar to 1.6 Bar, the newly formed bone tissue for 90 days did not differ structurally from intact ones. The bone defects in the control group were replaced by loose connective tissue.

*Conclusions.* In the experiment, the use of ESWT with both a constant value of the maximum pressure at the wave front and with increasing, cause healing of postoperative critical size bone defects. Radiographical and histological changes in bone tissue indicate the initiation of repair processes both within the intact bone surrounding the defect and from the periosteum.

**Key words:** bone defects, maxillofacial area, extracorporeal shock wave therapy, cone-beam computed tomography, bone density.

Рецензент – проф. Проніна О. М.  
Стаття надійшла 03.10.2019 року