

УДК 616.71-74

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ГРАНУЛИРОВАННОГО КОСТНОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ ЧЕЛЮСТЕЙ

Д.В. Мальчикова

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России (Самара, Россия)

Для цитирования: Мальчикова Д.В. Предварительная подготовка гранулированного костнопластического материала для оптимизации репаративной регенерации костных дефектов челюстей. Аспирантский вестник Поволжья. 2023;23(4):59-65. doi: 10.55531/2072-2354.2023.23.4.59-65

■ Сведения об авторе

Мальчикова Д.В. – аспирант кафедры челюстно-лицевой хирургии и стоматологии. ORCID: 0000-0001-9077-2888
E-mail: dvmalchikova@gmail.com

Рукопись получена: 04.05.2023

Рецензия получена: 28.10.2023

Решение о публикации: 29.10.2023

■ Аннотация

Цель – разработать метод подготовки гранулированного костнопластического материала (ГКМ) для использования в клинических условиях в целях оптимизации качества репаративного остеогенеза костных дефектов челюстей.

Материал и методы. Исследование выполнено *in vitro* на 9 образцах (по 3 образца в каждой группе исследования). В группе 1 интактные образцы – Cerabone (Botiss biomaterials GmbH, Германия). В группе 2 – Cerabone (Botiss biomaterials GmbH, Германия), но после двухэтапного воздействия на них дегазации и экстракции пыли по разработанному нами методу. В группе 3 в качестве контроля использовалась культура мезенхимально-стромальных клеток (МСК), полученных из пупочного канатика человека. Для оценки цитотоксичности разработанного нами метода были использованы МСК человека. Определяли пролиферативный индекс и скорость удвоения культуры. Топографический анализ поверхности образца проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для оценки скорости дегазации эксперимент проводился в трех повторностях. Фиксировали объем жидкости каждые 2,5 мин. Для статистического анализа использовали программное обеспечение SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA).

Результаты. После проведения подготовки исследованных фракций ГКМ группы 2 методом дегазации и экстракции пыли выявлено уменьшение содержания крупнодисперсной и мелкодисперсной фракционной пыли на наружных и внутренних поверхностях пор и устьев межпоровых каналов и пустот во всех образцах. Фракция ГКМ, подготовленная к использованию методом дегазации и экстракции пыли, не оказывает токсического воздействия на рост и жизнеспособность клеточной культуры МСК человека.

Заключение. Предварительная подготовка ГКМ по разработанной нами методике дегазации и экстракции пыли в клинических условиях *ex tempore* значительно оптимизирует адсорбционные и дренажные свойства его фракции.

■ **Ключевые слова:** гранулированный костнопластический материал; дегазация; факторы роста кости; репаративный остеогенез, васкулогенез.

■ **Конфликт интересов:** не заявлен.

■ Список сокращений

ГКМ – гранулированный костнопластический материал; МСК – мезенхимально-стромальная клетка; КДЧ – костный дефект челюсти; НКР – направленная костная регенерация; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия.

PRE-TREATMENT OF GRANULAR OSTEOPLASTIC MATERIAL FOR IMPROVING THE REPARATIVE REGENERATION OF JAW BONE DEFECTS

Darya V. Malchikova

Samara State Medical University (Samara, Russia)

Citation: Malchikova DV. Pre-treatment of granular osteoplastic material for improving the reparative regeneration of jaw bone defects. Aspirantskiy vestnik Povolzhia. 2023;23(4):59-65. doi: 10.55531/2072-2354.2023.23.4.59-65

■ Information about author

Darya V. Malchikova – a postgraduate student of the Department of Maxillofacial Surgery and Dentistry. ORCID: 0000-0001-9077-2888
E-mail: dvmalchikova@gmail.com

Received: 04.05.2023

Revision Received: 28.10.2023

Accepted: 29.10.2023

■ Abstract

Aim – to develop a method for preliminary preparation of a granular osteoplastic material (GOM) for improving the quality of reparative osteogenesis of jaw bone defects that can be used in clinical setting.

Material and methods. The *in vitro* study was performed using 9 samples (3 samples in each study group). Group 1 included intact samples of grafting material Cerabone (Botiss biomaterials GmbH, Germany). In group 2, the samples of Cerabone (Botiss biomaterials GmbH, Germany) were subject to degassing and dust extraction in two stages using the original method developed by the author. In group 3, a culture of mesenchymal-stromal cells (MSC) obtained from the human umbilical cord was used as a control. The developed method was assessed for cytotoxicity using human MSC. The proliferative index and cell doubling time were registered. A topographic analysis of the sample surface was performed using scanning electron microscopy. To assess the rate of degassing, the experiment included three replicates. The fluid volume was recorded every 2.5 minute. For statistical data processing, we used SPSS 25.0 software (IBM Corporation, Armonk, New York, USA).

Results. In Group 2, that included the samples of GOM fractions with the preliminary degassing and dust extraction, we revealed a decreased content of coarse and fine fraction dust on the outer and inner surfaces of the pores and mouths of inter pore channels and voids in all samples. The granular osteoplastic material prepared for the use by the method of degassing and dust extraction proved to have no toxic effect on the growth and viability of human mesenchymal-stromal cells.

Conclusion. A preliminary preparation of GOM by the method of degassing and dust extraction developed by the author in clinical conditions *ex tempore* significantly optimizes the adsorption and drainage properties of the GOM fraction.

■ **Keywords:** granular osteoplastic material; degassing; bone growth factors; reparative osteogenesis, vasculogenesis.

■ **Conflict of interest:** *nothing to disclose.*

ВВЕДЕНИЕ

Для устранения костных дефектов челюстей (КДЧ) применяются костнопластические материалы. Считается, что «золотым стандартом» регенерации кости при критических размерах дефекта являются аутологичные костные трансплантаты [1, 2]. В то же время часто наблюдаются осложнения донорских участков [3]. Преодолеть недостатки аутологичных трансплантатов позволяет применение гранулированных костнопластических материалов (ГКМ) [4].

Основными требованиями, предъявляемыми к ГКМ, являются следующие: биосовместимость; контролируемая биоразлагаемость со скоростью элиминации, соответствующей темпу формирования новой костной ткани в месте дефекта; обеспечение трехмерной стабильности реконструкции; отсутствие цитотоксичности; способность инициировать процессы регенерации костной ткани [5].

ГКМ дают предсказуемые результаты лечения в процедурах направленной костной регенерации (НКТР), поскольку обладают явными физическими преимуществами [6]. Их высокопористая структура с сообщающейся системой пор, макропоры, сквозные каналы, геометрия пор и топографические характеристики влияют на биологические свойства, такие как клеточная адгезия и пролиферация, а также остеогенная дифференцировка стволовых клеток и клеток-предшественников. Развитая система пор позволяет создать условия для поддержания пролиферации и дифференцировки клеток, обеспечивая возможность газообмена и циркуляции жидкостей [7].

Локальная геометрия поверхностей и трехмерная архитектура гранул ГКМ создают биологическую среду, которая по сравнению с плоскими поверхностями влияет на генетическую экспрессию и форму клеток, мигрирующих на имплантированный биоматериал, оказывает влияние на пространственно-временную организацию клеток и тканей [8, 9]. Искривление поверхности пористых материалов, асимметрия и наличие вогнутостей на их поверхностях повышают клеточную адгезию и выживание [10, 11].

ГКМ не только должны стимулировать остеобласты, рекрутировать их, но и участвовать в их механическом

кондиционировании [7]. Однако при производстве ГКМ образуется мелкодисперсная пыль, которая покрывает поверхности гранул, включая поверхности пор и устья каналов. Мелкодисперсная пыль изменяет геометрию пор и герметизирует отверстия каналов. В каналах образуются препятствия из пыли и воздушных пробок. Блокирование пространств каналов воздушными пробками и пылью уменьшает площадь доступных поверхностей ГКМ, препятствует соединению пор в единую дренажную систему и снижает адсорбционную емкость ГКМ, поэтому необходимо определить условия повышения дренажных возможностей ГКМ.

ЦЕЛЬ

Разработать метод подготовки ГКМ перед использованием в клинических условиях для оптимизации качества репаративной регенерации КДЧ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа с исходным материалом и клеточными культурами проходила в культуральном боксе в помещении класса С в стерильных условиях ламинаров (класс А) в центре «БиоТех» СамГМУ. Ростовские среды в процессе культивирования клеток регулярно контролировали на стерильность, контаминацию микоплазмами и вирусами, наличие грибковой флоры. Протокол исследования был одобрен комитетом по биоэтике при Самарском государственном медицинском университете (протокол №235 от 29.09.2021).

Исследование выполнено *in vitro* на 9 образцах (по 3 образца в каждой группе исследования). В группе 1 интактные образцы – Cerabone (Botiss biomaterials GmbH, Германия). В группе 2 – Cerabone (Botiss biomaterials GmbH, Германия), но после дегазации и экстракции пыли по разработанному нами методу [12].

Метод дегазации и экстракции пыли реализуется в 2 этапа. Первый этап – пассивная дегазация и экстракция пыли (удаление крупнодисперсной фракционной пыли и воздуха с поверхностей и пустот). Данный этап осуществляли в физиологическом растворе. В термостате температуру

физиологического раствора доводили до +37°C. В пробирку помещали фракцию ГKM, заливали физиологическим раствором в соотношении 1:2, где на каждый мл ГKM добавляли 2 мл физиологического раствора и инкубировали в термостате при температуре +37°C. Через 20 минут отделяли фракцию ГKM от физиологического раствора с помощью пипеточного дозатора (дозатор механический одноканальный с переменным объемом 20–200 мкл). Второй этап – активная дегазация и экстракция (удаление мелкодисперсной фракционной пыли и остаточных газов из устьев межпоровых каналов и пустот). Согласно данным [13], фракцию ГKM заливали раствором лимонной кислоты (pH1) при +37°C на 10 минут. Насыщенный раствор кислоты готовили путем медленного добавления безводной лимонной кислоты к 50 мл дистиллированной воды с использованием магнитной мешалки (Microfix, IP Selecta) для перемешивания раствора. Добавление кристаллов лимонной кислоты проводили до получения pH 1, который определяли с помощью pH-метра. К каждому мл ГKM добавляли 2 мл лимонной кислоты с pH 1 и инкубировали при +37°C в течение 10 минут. После десяти минут нахождения ГKM в растворе лимонной кислоты запускали ультразвуковые генераторы и проводили активную дегазацию и экстракцию пыли в ультразвуковой ванне (УЗУ - 0,25, Россия) с частотой 18 кГц, мощностью 250 Вт и временем экспонирования 60 секунд. После обработки ультразвуком лимонную кислоту отделяли от материала с помощью пипеточного дозатора. Для удаления остатков кислоты фракцию ГKM помещали в физиологический раствор при температуре +37°C и ультразвуковую ванну (УЗУ - 0,25, Россия) с частотой 18 кГц, мощностью 250 Вт и временем экспонирования 60 секунд.

В группе 3 использовали в качестве контроля культуру мезенхимально-стромальных клеток (МСК), полученных из пупочного канатика человека.

Анализ фракции ГKM, подготовленного по методу дегазации и экстракции пыли, на цитотоксичность

Для оценки цитотоксичности разработанного нами метода дегазации и экстракции пыли использовали МСК, полученные из пупочного канатика человека (донор №7000400025628), культуры 2-го пассажа. Жизнеспособность клеток при заморозке составляла 96%. Перед введением в эксперимент МСК размораживали на водяной бане при температуре +37°C в течение 2,5 минуты. В условиях ламинарного шкафа KS-12 Herasafe (Thermo Scientific, США) МСК двукратно отмывали от криопротектора стерильным раствором фосфатно-солевого буфера (раствор Дальбекко (DPBS, «Биолот», Россия)). Жизнеспособность клеток перед введением в эксперимент составляла 94% в количестве 5,8 млн.

Образцы каждой группы помещали в культуральные чашки Петри 100 см² (SPL, Корея). В группах 1 и 2 на поверхность материала с помощью дозатора переменного объема переносили 500 000 клеток. В группе 3 использовали чашку Петри площадью 100 см² с таким же количеством посаженных клеток. Через 15 минут после введения клеточной суспензии в каждую культуральную чашку добавляли ростовую среду – α-МЕМ жидкая, с L-глутамином, стерильная («Биолот», Россия), 2mM L-глутамин (ООО

«Биолот», Россия). Образцы в среде помещали в CO₂ инкубатор CB 210 (Binder, Германия) и инкубировали при стандартных условиях в течение 8 суток. Ежедневно проводился визуальный осмотр культуры и оценивалась морфология клеток. На восьмые сутки чашки трипсинизировались (раствор трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия)), производилась деагрегация клеток с пластика.

Для оценки жизнеспособности МСК в культуре использовали счетчик клеток Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, USA). Определяли пролиферативный индекс и скорость удвоения культуры. Оценку морфологии культивируемых клеток проводили в динамике на всех этапах культивирования с помощью микроскопа AXIO Observer A1 (Carl Zeiss, Германия).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Фрагменты фракции ГKM 1 и 2 групп устанавливали на углеродную проводящую ленту с двойным покрытием, затем напыляли золотом с использованием UNICOAT 600t. Топографический анализ поверхности образца проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega с микроанализатором Inga Energy (TES-CAN, Чехия) в режиме обнаружения вторичных электронов. Рабочее расстояние корректировали для получения подходящего увеличения. Ускоряющее напряжение было установлено 30 кВ.

Фрагменты фракции ГKM 1 и 2 групп после культивирования фиксировали в 4% формальдегиде на фосфатном буфере Ph 7.0-7.4. Перед исследованием препараты высушивались естественным образом при комнатной температуре в течение 10 минут. Дополнительная химическая дегидратация не проводилась. Препараты устанавливали на алюминиевые столики и крепили с помощью двустороннего карбонового скотча (SPI, США), напыляли золотом в SPI-Module Sputter Coater (SPI, США), толщина слоя 5 нм. Анализировали в сканирующем двулучевом ионно-электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company, США) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Статистический анализ

Для статистического анализа использовали программное обеспечение: SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). Для оценки скорости дегазации проводили эксперимент в трех повторностях. Фиксировали объем жидкости каждые 2,5 минуты. В интервале от 0 минут (начало дегазации) до 20 минут (окончание выхода пузырьков газа) в каждый изучаемый момент времени вычисляли среднее арифметическое оставшегося объема жидкости, его стандартное отклонение, ошибку средней, границы 95% доверительного интервала. Экспериментальные данные – 9 временных точек по 3 измерения в каждой, итого 27 пар наблюдений – с высокой степенью точности сглаживаются 4-параметрической логистической кривой, уравнение которой в общем виде следующее:

$$f(t) = d + (c-d) / (1 + \exp(-a(t-b))),$$

где:

$f(t)$ – процент от исходного объема жидкости; t – время в минутах; d – максимальный процент (без дегазации), в настоящем исследовании мы приняли его равным 100%; c – параметр, отражающий минимальный процент



Рисунок 1. ГКМ Cerabone на этапе пассивной дегазации и экстракции пыли.

Figure 1. GOM Cerabone at the stage of passive degassing and dust extraction.

исходного объема жидкости после завершения дегазации; а – параметр, отражающий скорость дегазации; b – параметр, характеризующий время, в которое происходит половинная дегазация.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Опытным путем мы установили, что на стадии пассивной дегазации при погружении фракции

ГКМ на 20 минут в физиологический раствор при +37°C из ГКМ происходит выделение пузырей газа и мелкодисперсной пыли (рисунок 1).

На рисунке 2 видно, что начальный спуск кривой наблюдается через 2,5 минуты после погружения ГКМ в физиологический раствор при +37°C, что соответствует уменьшению исходного объема жидкости и выделению

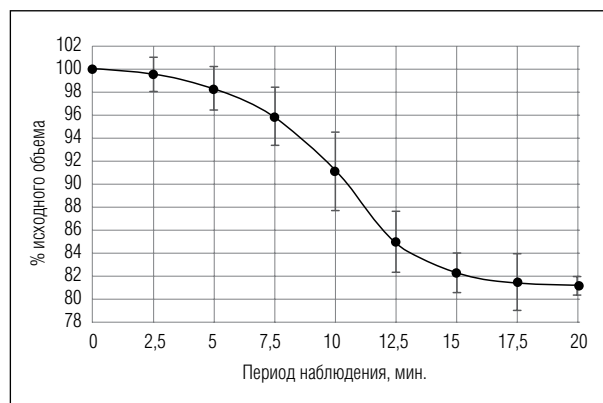


Рисунок 2. Этап пассивной дегазации и экстракции пыли ГКМ.

Figure 2. Stage of passive degassing and extraction of GOM dust.

пузырей газа из ГКМ. Наибольшее выделение пузырей газа происходит между 7,5 до 12,5 минуты. С 13 по 17 минуте образуется мелкодисперсная пыль в виде взвеси. Затем следует плато между 17,5 и 20 минутами, когда выделения пузырей газа выявлено не было.

Мы определили изменения исходного объема жидкости при дегазации и экстракции пыли, средние значения и их 95% доверительные интервалы (таблица 1).

В среде статпакета SPSS проведена аппроксимация наблюдаемых значений S-образной функцией – 4-параметрической логистической регрессией. Получены следующие значения регрессионных коэффициентов и их стандартных ошибок, отражающие параметры зависимости процента дегазации от времени: А 0,51±0,04; В 10,10±0,17; С 81,01±0,35.

Уравнение зависимости процента дегазации от времени t следующее:

$$f(t) = 100 + (81,01 - 100) / (1 + \exp(-0,51(t - 10,10)))$$

Коэффициент детерминации построенной модели R²=99%, что характеризует ее как очень точную.

Согласно построенной математической модели процесса дегазации и экстракции пыли установлено, что через 10 минут происходит выход половины имеющегося в пустотах ГКМ газа, а через 20 минут от начала дегазации и экстракции пыли кривая выходит на плато.

СЭМ

Проведенный топографический анализ поверхности образцов 1 и 2 групп для определения площади наружных и внутренних поверхностей каналов и пор, объема пор и каналов, а также отношения пор к каналам в ГКМ позволил выявить, что исследуемые образцы Cerabone обладают сквозными каналами внутри частиц с распределением по размерам от 50 до 190 мкм.

Таблица 1 / Table 1

Процент исходного объема жидкости в зависимости от времени: средние значения и их 95% доверительные интервалы

Percentage of initial fluid volume versus time: mean values and their 95% confidence intervals

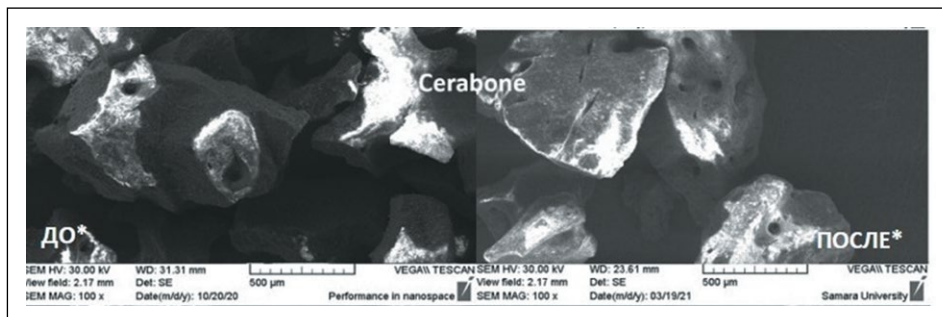
Время, мин.	% исходного объема, средние значения	% исходного объема, нижняя граница 95% ДИ	% исходного объема, верхняя граница 95% ДИ
0,0	100,0	100,0	100,0
2,5	99,6	98,2	101,0
5,0	98,3	96,4	100,3
7,5	95,9	93,3	98,4
10,0	91,2	87,7	94,6
12,5	85,0	82,4	87,7
15,0	82,3	80,7	84,0
17,5	81,5	79,1	83,9
20,0	81,3	80,4	82,1

Таблица 2 / Table 2

Показатели жизнеспособности МСК в культуре, их пролиферативного индекса, скорости удвоения культуры и описательная статистика в виде средних и стандартных отклонений (M±SD)

Indicators of viability of mesenchymal-stromal cells in culture, their proliferative index, culture doubling rate and descriptive statistics in the form of mean and standard deviations (M±SD)

Группа	Количество посаженных клеток в 1 мл*10 ⁶	Жизнеспособность, %	Количество собранных клеток в 1 мл* 10 ⁶	Скорость удвоения в день
1	0,4	94,3	3,44 ± 0,29	0,4884 ± 0,2457
2	0,4	94,6	3,51 ± 0,38	0,5162 ± 0,1148
3	0,4	96,0	3,62 ± 0,24	0,5212 ± 0,2354



Примечания. ДО * – поверхность исследованных ГKM группы 1 без подготовки по методу дегазации и экстракции пыли. На наружных и внутренних поверхностях визуализируется крупнодисперсная и мелкодисперсная фракционная пыль. ПОСЛЕ * – поверхность исследованных ГKM группы 2, подготовленных по методу дегазации и экстракции пыли. Наружные поверхности ГKM освободились от крупнодисперсной фракционной пыли, внутренние поверхности пор и устьев межпоровых каналов и пустот – от мелкодисперсной пыли.

Рисунок 3. СЭМ-микрофотографии, Cerabone.

Figure 3. SEM micrographs, Cerabone.

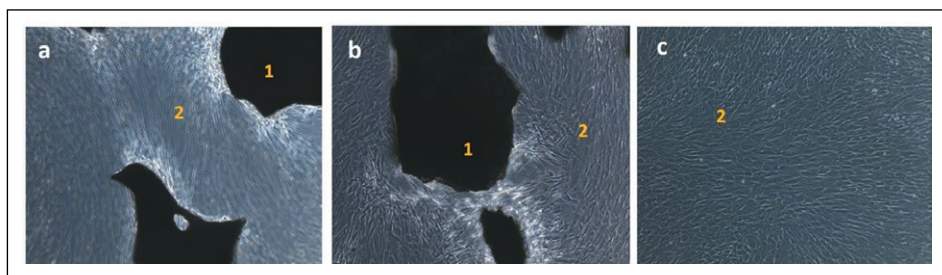


Рисунок 4. а – ГKM Cerabone без подготовки по методу дегазации и экстракции пыли, группа 1; б – ГKM Cerabone, подготовленный по методу дегазации и экстракции пыли, группа 2; с – контроль – группа 3. 1 – Cerabone, 2 – культивируемые МСК человека.

Figure 4. a – GOM Cerabone without preparation according to the protocol of degassing and dust extraction, group 1; b – the GOM Cerabone, prepared according to the protocol of degassing and dust extraction, group 2; c – control – group 3. 1 – Cerabone, 2 – cultured human MSC.

После проведения подготовки исследованных фракций ГKM группы 2 методом дегазации и экстракции пыли мы выявили уменьшение содержания крупнодисперсной и мелкодисперсной фракционной пыли на наружных и внутренних поверхностях пор и устьев межпоровых каналов и пустот во всех образцах группы 2 (**рисунок 3**). Площадь свободных поверхностей пор и устьев сквозных пор увеличилась.

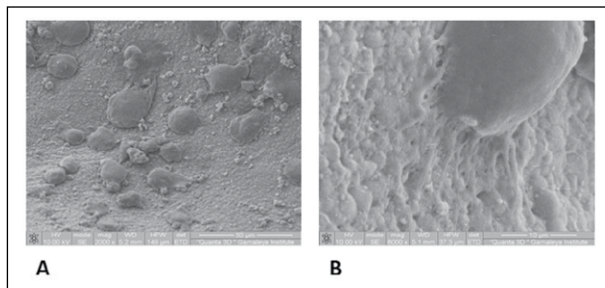


Рисунок 5. СЭМ. МСК человека, размещенные на ГKM на культуральной среде *in vitro*. А. Прикрепление, миграция и пролиферация клеток на поверхности ГKM, x2000; В. МСК через 8 дней после размещения на ГKM, x8000.

Figure 5. SEM of MSC placed on GOM *in vitro* on a culture medium. A. Attachment, migration and proliferation of cells on the surface of the GOM, x2000; B. MSC 8 days after placement on the GOM, x8000.

Анализ фракции ГKM, подготовленный по методу дегазации и экстракции пыли, на цитотоксичность

Исследование показателей жизнеспособности МСК человека в культуральной среде *in vitro* показало, что количество снятых клеток не имеет значительных расхождений в группах 1 и 2, группы 1 и 2 сопоставимы между собой и группой 3 (**таблица 2**).

На всем протяжении культивирования МСК имели типичную веретенообразную морфологию, края цитоплазмы ровные; признаков апоптоза отмечено не было. При микроскопическом исследовании в 1 и 2 группах отмечалось краевое прикрепление МСК к поверхностям гранул ГKM (**рисунок 4**).

Таким образом, подготовленная к использованию фракция ГKM по разработанному нами

методу дегазации и экстракции пыли не оказывает токсического воздействия на рост и жизнеспособность клеточной культуры МСК человека. Мы не выявили цитотоксического влияния на МСК человека, размещенные на фракции ГKM и культивируемые *in vitro* (**рисунок 5**).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ксеногенные ГKM бычьего происхождения известны своей биосовместимостью, низкой скоростью резорбции или ее отсутствием, а также сходством с человеческой костью за счет сохраненной микроструктуры костного каркаса [14–16].

Мы использовали коммерчески доступный ксеногенный ГKM Cerabone (Botiss biomaterials GmbH, Германия). Cerabone производится путем трехступенчатой температурной обработки, включая окончательное спекание при температуре $>1200^{\circ}\text{C}$, в результате чего удаляются все органические соединения и потенциальные прионы, бактерии и вирусы. Кроме того, высокая температура спекания повышает кристалличность и стабильность объема [17, 18]. Сообщалось, что спеченный при высокой температуре Cerabone показал лучшую жизнеспособность клеток остеобластов человека и их метаболическую активность по сравнению с другими ГKM бычьего происхождения, приготовленными при более низких температурах [19, 20].

Необходимым условием для оптимизации репаративного остеогенеза и увеличения площади поверхности фракции ГKM считается наличие макропор [21, 22]. Поры с большими размерами в диаметре улучшают диффузию кислорода во внутренние пространства ГKM, это повышает жизнеспособность клеток [23]. Считается, что бимодальное распределение пор со средним размером 38,3 мкм повышает эффективность посева клеток, жизнеспособности клеток и пролиферации [24].

Успех устранения костных дефектов челюстей методом направленной костной регенерации определяется способностью ГKM к прогрессивному клеточно-тканевому росту по всему объему.

Известно, что пролиферативная активность на поверхностях гранул при наличии пыли существенно снижается [25]. На этапах производственного цикла в каналах ГKM создаются препятствия из пыли и воздушных пробок. Эта физическая причина приводит к подавлению миграции факторов роста кости и продвижению внутрь фракции ГKM сосудов и волокнистых структур из реципиентного ложа и мягкотканного окружения. Сосудистая система является не только источником кислорода и питательных веществ, необходимых для остеогенной дифференцировки, но и несет с собой кроме биологически активных веществ еще и МСК, способные дифференцироваться в ангиогенные клетки [26, 27]. Ангиогенные источники клеток, такие как эндотелиальные клетки или остеопрогениторные клетки, являются центральным и основным источником неоваскуляризации, участвуют в васкулогенезе и могут стимулировать неоваскуляризацию. Таким образом, недостаток кислорода и питательных веществ препятствует миграции клеток на расстояние более 500 мкм от поверхности гранул и снижает их выживаемость [28].

Следовательно, для повышения дренажных возможностей ГKM необходимо проводить подготовку фракции ГKM нашим методом дегазации и экстракции пыли. СЭМ показала, что после проведения дегазации и удаления производственной пыли на наружных и внутренних поверхностях гранул в порах и устьях каналов сквозных пор произошло уменьшение содержания крупнодисперсной и мелкодисперсной пыли. Таким образом, на этапе пассивной дегазации освобождаются наружные поверхности фракции ГKM от крупнодисперсной пыли и воздуха. На этапе активной дегазации освобождаются внутренние поверхности пор, сквозных пор и пустот гранул ГKM от мелкодисперсной пыли и остаточных газов. Ультразвук, используемый на этапе активной дегазации, создает эффект кавитации, который инициирует гидроудары на наружно-внутренних поверхностях гранул, неровности этих поверхностей приводят к возникновению интерференции и дифракции волн, в результате чего происходит выход газов и свободной мелкодисперсной пыли из гранул материала в омывающую жидкость. Наблюдается стабильный процесс удаления гидродинамических заслонок за счет объединения мелких воздушных пузырей в крупные с последующим их схлопыванием и выделением из пространств ГKM в омывающий раствор [29]. Очищенные поры и каналы сквозных пор увеличивают площадь контакта факторов роста кости

с внутренними поверхностями фракции ГKM компонентов микроциркуляторного русла и жидкости, клеточных элементов, мигрирующих с периферии реципиентного ложа в глубь ГKM.

Выводы

1. Предварительная подготовка ГKM по разработанной нами методике дегазации и экстракции пыли в клинических условиях *ex tempore* значительно оптимизирует адсорбционные и дренажные свойства фракции ГKM.

2. Увеличение соотношения площади свободных поверхностей к объему наружных и внутренних пространств фракции ГKM повышает диффузию тканевой жидкости и плазмы крови, оптимизирует фиксацию и миграцию клеток, создает условия для инвазии кровеносных сосудов и неоваскуляризации в свободных пространствах фракции ГKM.

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Miron R, Hedbom E, Saulacic N, et al. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. *J Dent Res*. 2011;90:1428-33. doi: 10.1177/0022034511422718
2. Shalash M, Rahman H, Azim A, et al. Evaluation of horizontal ridge augmentation using beta tricalcium phosphate and demineralized bone matrix: a comparative study. *J Clin Exp Dent*. 2013;5(5):e253-9. doi: 10.4317/jced.51244
3. Grabowski G, Cornett C. Bone graft and bone graft substitutes in spine surgery: current concepts and controversies. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013;21:51-60. doi: 10.5435/JAAOS-21-01-51
4. Nkenke E, Stelzle F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:124-33. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01776.x
5. Tsiourvas D, Sapalidis A, Papadopoulos T. Hydroxyapatite/chitosan-based porous three-dimensional scaffolds with complex geometries. *Mater Today Commun*. 2016;7:59-66. doi: 10.3390/molecules25204785
6. Wang R, Lang N. Ridge preservation after tooth extraction. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23:147-56. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02560.x
7. Bing W, Chengmin F, Yiming L, et al. Recent advances in biofunctional guided bone regeneration materials for repairing defective alveolar and maxillofacial bone: A review. *Japanese Dental Science Review*. 2022;58:233-248. doi: 10.1016/j.jdsr.2022.07.002
8. Lee S, Choi B, Li J, et al. Comparison of corticocancellous block and particulate bone grafts in maxillary sinus floor augmentation for bone healing around dental implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(3):324-8. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.12.020
9. Mohd A, Buenzli P. Modeling the Effect of Curvature on the Collective Behavior of Cells Growing New Tissue. *Biophysical Journal*. 2017;112:193-204. doi: 10.1016/j.bpj.2016.11.3203
10. Mour M, Das D, Winkler T, et al. Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications. *Materials*. 2010;3:2947-2974. doi: 10.3390/ma3052947
11. Hegarty-Cremer S, Simpson M, Andersen T, et al. Modelling cell guidance and curvature control in evolving biological tissues. *J Theor Biol*. 2021;520:110658. doi: 10.1016/j.jtbi.2021.110658
12. Slesarev OV, Bairicov IM, Malchikova DV, et al. *Method for degassing granular osteoconductive osteoplastic material*.

- Patent RUS №2758570 C1/29.10.2021. (In Russ.). [Слесарев О.В., Байриков И.М., Мальчикова Д.В., и др. Способ дегазации гранулированного остеокондуктивного костнопластического материала. Патент РФ на изобретение №2758570 C1/ 29.10.2021]. Available at: <https://patenton.ru/patent/RU2758570C1>
13. Shetty B, Dinesh A, Seshan H. Comparative effects of tetracyclines and citric acid on dentin root surface of periodontally involved human teeth: A scanning electron microscope study. *J Indian Soc Periodontol*. 2008;12(1):8-15. doi: 10.4103/0972-124X.44090
 14. Klein M, Kämmerer P, Götz H, et al. Long-term bony integration and resorption kinetics of a xenogeneic bone substitute after sinus floor augmentation: histomorphometric analyses of human biopsy specimens. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013;33:101-110. doi: 10.11607/prd.1469
 15. Dau M, Kämmerer P, Henkel K, et al. Bone formation in mono cortical mandibular critical size defects after augmentation with two synthetic nanostructured and one xenogenous hydroxyapatite bone substitute - *in vivo* animal study. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27:597-603. doi: 10.1111/clr.12628
 16. Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res*. 2018;62:152-161. doi: 10.1016/j.jpor.2017.08.010
 17. Kusurini E, Sontang M. Characterization of x-ray diffraction and electron spin resonance: effects of sintering time and temperature on bovine hydroxyapatite. *Radiat Phys Chem*. 2012;81:118-125. doi: 10.1016/j.radphyschem.2011.10.006
 18. Riachi F, Naaman N, Tabarani C, et al. Influence of material properties on rate of resorption of two bone graft materials after sinus lift using radiographic assessment. *Int J Dentis*. 2012;737262. doi: 10.1155/2012/737262
 19. Kyiak S, Blatt S, Schiegnitz E, et al. Activation of human osteoblasts via different bovine bone substitute materials with and without injectable platelet rich fibrin *in vitro*. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:71. doi: 10.3389/fbioe.2021.599224
 20. Rajkovski B, Jaunich M, Beuer F, et al. Hydrophilicity, Viscoelastic, and Physicochemical Properties Variations in Dental Bone Grafting Substitutes. *Materials*. 2018;11:215. doi: 10.3390/ma11020215
 21. Bertazzo S, Zambuzzi W, Campos D, et al. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;78(2):177-84. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.02.027
 22. Cyster L, Grant D, Howdle S, et al. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26(7):697-702. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.03.017
 23. Zambuzzi W, Oliveira R, Pereira F, et al. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. *Braz Dent J*. 2006;17(4):274-8. doi: 10.1590/s0103-64402006000400002
 24. Salerno A, Guarnieri D, Iannone M, et al. Effect of micro- and macroporosity of bone tissue three-dimensional-poly(epsilon-caprolactone) scaffold on human mesenchymal stem cells invasion, proliferation, and differentiation *in vitro*. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(8):2661-73. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0494
 25. Turco G, Porrelli D, Marsich E, et al. Three-Dimensional Bone Substitutes for Oral and Maxillofacial Surgery: Biological and Structural Characterization. *J Funct Biomater*. 2018;9(4). doi: 10.3390/jfb9040062
 26. Tian T, Zhang T, Lin Y, et al. Cai. Vascularization in Craniofacial Bone Tissue Engineering. *Journal of Dental Research*. 2018;97(9): 969-976. doi: 10.1177/0022034518767120
 27. Helder M, Bravenboer N, BruGOMenkate C, et al. Bone Tissue Regeneration in the Oral and Maxillofacial Region: A Review on the Application of Stem Cells and New Strategies to Improve Vascularization. Hindawi. *Stem Cells International*. 2019;6279721:15. doi: 10.1155/2019/6279721
 28. Fernandez G, Keller L, Idoux-Gillet Y, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of Tissue Engineering*. 2018;9:18. doi: 10.1177/2041731418776819
 29. Hu Y, Jiang R, Li X, et al. Effect of Ultrasonic-Assisted Casting on the Hydrogen and Lithium Content of Al-Li Alloy. *Materials*. 2022;15(3):1081. doi: 10.3390/ma15031081

■ Автор для переписки

Мальчикова Дарья Вячеславовна
Адрес: Самарский государственный университет,
ул. Чапаевская, 89, г. Самара, Россия, 443099.

E-mail: dvmalchikova@gmail.com

■ Corresponding Author

Darya V. Malchikova
Address: Samara State Medical University,
89 Chapaevskaya st., Samara, Russia, 443099.