ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ხელნაწერის უფლებით

თეიმურაზი გრძელიძე

ახალი ძვლოვანი მინერალის გამოყენება დენტალურ იმპლანტაციაში

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი
დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი 2019

თემის აქტუალობა

სტომომატოლოგიურ პრაქტიკაში ბოლო ათი წლის განმავლობაში დენტალური იმპლანტაცია ერთ-ერთ წამყვან ადგილს იკავებს. ლიტერატურული მონაცემები მოწმობენ, რომ ორთოპედიულ სტომატოლოგიაში დენტალური იმპლანტაციის მეთოდი ფართოდ გამოიყენება კბილთა მწკრივის დეფექტის შესავსებად. ამან გარკვეულ წილად გადაჭრა იმ სტომატოლოგიური დაავადებების რეაბილიტაციის პრობლემა, რასაც თან ახლავს პაციენტების კბილთა და კბილების გარშემო არსებული ქსოვილების დაზიანება.

დენტალურ იმპლანტაციაში მიღწეული წარმატებებისა და სამეცნიერო მიღწევების მიუხედავად, ჯერ კიდევ აქტუალურ პრობლემად რჩება პროთეზის კონსტრუქციის ღრძილზე საყრდენ ქსოვილებში განვითარებული ანთებითი პროცესის გართულებების პროფილაქტიკა.

კბილთა რიგის დეფექტები და განსაკუთრებით კბილთა სრული არ არსებობა, ძალიან ხშირად პროტეზების სრულფასოვანი ფიქსაციის და ფუნქციონირების პრობლემებს ქმნის. ალვეოლარული წანაზარდების ატროფია რაციონალური პროტეზირების ძირითადი ხელის შემშლელი ფაქტორია. კბილების მოცილებიდან მე-6 თვეზე ალვეოლური წანაზარდის სიმაღლის

საშუალო დანაკარგი შეადგენს ქვედა ყბისთვის 2,3 მმ-ს, ზედა ყბისთვის კი - 4,4მმ-ს. კბილების ექსტრაქციის შემდეგ მოცემული ანატომიური ზონის თავისებურება ძვლოვანი ქსოვილის საწყისი ზომების შენარჩუნების საშუალებას არ იძლევა, შესაბამისად დაკარგული მოცულობა შეიძლება შეივსოს მხოლოდ ბიომასალის ქირურგიული ჩანერგვის გზით, რომელსაც უნარი აქვს ან მექანიკურად შეასრულოს ძვლის ფუნქცია ან მისი რეგენერაციის პროცესებზე მოახდინოს მაინდუცირებელი ზეგავლენა. იმპლანტების გამოყენებით ორთოპედიული მკურნალობისთვის ოპტიმალური პირობების შესაქმნელად ოპერაციული ჩარევის ცალკე მიმართულება არსებობს. ამ მიმართულების ძირითად ჯგუფს შეადგენს რეკონსტრუქციულ-ძვლოვანპლასტიკური ოპერაციები, რომელიც მიმართულია იმპლანტის ადგილას ძვლოვანი ქსოვილის მოცულობის გაზრდისკენ. დღესდღეობით სამედიცინო ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით ყბის ძვლოვანი ქსოვილის მინერალური შემადგენლობა, მისი რეგენერაციის და რემოდელირების თავისებურებები დეტალურადაა შესწავლილი. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით ბიოკომპოზიციური მასალების დიდი არჩევანი არსებობს.

გამოყენებული ძვლოვან-პლასტიკური მასალები, ძვლის დეფექტის მარტივად შევსების გარდა, ოსტეოგენეზის ინდუქციის, პროგენიტორულ უჯრედებზე ზემოქმედების, კერაში სამკურნალო ნივთიერებების მიტანის რთულ ფუნქციებსაც ასრულებენ. ამ მიზნით გამოიყენება მასალის ფართო სპექტრი: კოლაგენი, ჰიდროქსიაპატიტი და მათი სხვადასხვა კომბინაციები, კონსერვირებული ალო, ქსენო და აუტოძვალი. ერთერთ ყველაზე ხშირად გამოყენებად აუტოლოგიურ მასალად რჩება თეძოს ძვლის ქედისგან (crista iliaca) დამზადებული იმპლანტი, რომელიც სიცოცხლისუნარიან ოსტეობლასტებს და ოსტეოგენეზის პოტენციის უნარის მქონე ძვლის ღეროვან უჯრედებს შეიცავს. როგორც ქირურგიული გამოცდილება აჩვენებს იმპლანტაციისთვის გამოსაყენებელი არსებული მასალები (გამოყენებისას მკაცრად პროგნოზირებადი ეფექტურობის არ არსებობის გამო) სრულყოფილად ვერ აკმაყოფილებს ქირურგების მოთხოვნებს, რაც ჩვენი აზრით დაკავშირებულია იმასთან, რომ ამ მასალებს მხოლოდ ოსტეოკონდუქტური თვისებები გააჩნიათ. აუტოლოგიური მასალის გამოყენების ძირითადი უარყოფითი მხარეებია დამატებითი ტრვმების მიყენება, რომლის ხარისხიც ძვლის

დეფექტის ზომის პროპორციულია და პროთეზის ქსოვილებთან შეხების მიდამოში ტკივილის ხანგრძლივი სინდრომი ახასიათებს. ყველა ზემოთ აღნიშნულმა განაპირობა კვლევის მიზნის შერჩევა.

კვლევის მიზანი და ამოცანები

ბიოტოლერანტული ძვლის მატრიქსის შემუშავება, რომელიც წარმატებულად იქნება გამოყენებული იმპლანტის ჩანერგვის ადგილას ძვლოვანი ქსოვილის მოცულობის გასაზრდელად.

1. მსხვილი რქოსანი პირუტყვის ძვლოვანი ქსოვილისგან დეცელულარიზირებული ნატურალური ძვლოვანი მატრიქსის მიღების ტექნოლოგიური ეტაპების შემუშავება და დახვეწა;
2. ძვლოვანი ქსოვილის დეცელულარიზაციის მეთოდის ოპტიმიზაცია;
3. მაქსიმალურად კლინიკურ პირობებთან მიახლოვებული ქვედა ყბის ძვლოვანი დეფექტის მოდელირება ექსპერიმენტში ცხოველებზე;
4. ქვედა ყბის ძვლოვანი დეფექტის აღსადგენად ჩვენს მიერ შემუშავებული ახალი ნატურალური ძვლოვანი მატრიქსის ეფექტურობის შესწავლა;
5. ქვედა ყბის ძვლოვანი დეფექტის აღსადგენად ნატურალური, მინერალური მატრიქსის (Bio-Oss)-

ისა და ტიტანის იმპლანტის ერთეტაპიანი იმპლანტაცია;

6. ქვედა ყბის ძვლოვანი დეფექტის აღსადგენად ჩვენს მიერ შემუშავებული ახალი ნატურალური ძვლისა და ტიტანის იმპლანტის ერთეტაპიანი იმპლანტაცია;

7. ძვლოვანი ქსოვილის მოცულობის გაზრდის მიზნით ჩვენს მიერ შემუშავებული დეცელულიზირებული ძვლის მატრიქსის და ნატურალური ძვლის მინერალის "Bio-Oss"- ის (შვეიცარია) ეფექტურობის შედარებითი ანალიზის ჩატარება რენტგენოლოგიური და მორფოლოგიური კვლევის მეთოდების გამოყენებით.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

- პირველად მსხვილფეხა რქოსანი საქონლის ბარძაყის ძვლისგან იქნა მიღებული ბიოტოლერანტული ნატურალური ძვლოვანი იმპლანტი, რომელსაც აპატიტის მსგავსი ნანოკრისტალური სტრუქტურა გააჩნია.

- პირველად ექსპერიმენტში ცხოველებზე შესწავლილი იქნა ჩვენს მიერ შემუშავებული იმპლანტის ეფექტურობა, რაც მისი ჩანერგვის ადგილას ძვლოვანი ქსოვილის მოცულობის მატებაში გამოიხატა.

- ადრეული და შორეული შედეგების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ ჩვენს მიერ შემუშავებული ნატურალური ძვლოვანი მატრიქსი შეიძლება აუტოგენური ძვლის ალტერნატივა გახდეს სხვადასვა ძვლოვანი დეფექტების აღმოსაფხვრელად.

- პირველად შემუშავდა დენტალური იმპლანტისა და ძვალ-პლასტიკური კომპოზიტის ერთეტაპიანი იმპლანტაცია.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება

ჩატარეული კვლევები ახალი თაობის მაკრო და მიკროფოროვანი, ადამიანის ძვლის ღრუბლოვანი ნივთიერების ანალოგიური სტრუქტურის მქონე, ბიოკომპოზიციური მასალის სამედიცინო პრაქტიკაში გამოყენების საშუალებას მოგვცემს. ვინაიდან ნატურალური ძვლოვანი მატრიქსი ბუნებრივი წარმოშობისაა და დეცელულარიზირებულია იგი შეიძლება ადამიანის მინერალურ ძვალთან შეთავსებადად ჩაითვალოს.

დასაცავად გამოტანილი ძირითადი დებულებები

1. ჩვენს მიერ შემუშავებული ნატურალური დეცელულარიზირებული ძვლოვანი მატრიქსი

ხელს უწყობს ჭრილობაში ანგიო და ოსტეოგენეზის სტიმულაციას და სრულყოფილი ძვლოვანი რეგენერატის წარმოქმნას, რაც განპირობებულია მისი ოსტეოკონდუქტური და ოსტეოინდუქტური თვისებებით.

2. ნატურალური დეცელულარიზირებული ძვლოვანი მატრიქსი წარმოადგენს ადამიანის ძვლის ღრუბლოვანი ნივთიერების ანალოგიურ მაკრო და მიკრო ძვლოვან სტრუქტურას;

3. ნატურალური დეცელულარიზირებული ძვლოვანი მატრიქსის ფორების დიდი მოცულობა და ბუნებრივი მინერალური შემადგენლობა ხელს უწყობს უჯრედების კარგ ადგეზიას, მის ვასკულარიზაციას და ახალი ძვლოვანი ქსოვილის სწრაფ განვითარებას.

4. ქსოვილების კომპლექსური რეაქცია ნატურალურ დეცელულარიზირებულ ძვლოვან მატრიქსზე მიმდინარეობს ტოქსიური ეფექტისა და იმუნური კონფლიქტის გარეშე

5. ნატურალური დეცელულარიზირებული ძვლოვანი მატრიქსი დენტალური იმპლანტაციის პირობებში უზრუნველყობს ძვლის ქსოვილის სრულყოფილ რეპარაციულ რეგენერაციას და საგრძნობლად ამცირებს ძვლის რეგენერაციის ვადებს

6. ტიტანის იმპლანტისა და ძვალ-პლასტიკური კომპოზიტის ერთეტაპიანი იმპლანტაცია უზრუნველყოფს დენტალური იმპლანტების სტაბილურობას.

7. ჩვენს მიერ შემუშავებული დეცელულარიზირებული ძვლოვანი მატრიქსი შეიძლება აუტოლოგიური ძვლის ალტერნატივა გახდეს;

მასალა და მეთოდები

ექსპერიმენტული კვლევებისათვის გამოყენებული იქნა ორივე სქესის, 6 თვის ასაკის ლევისის ხაზის 120 ვირთაგვა (30 ცხოველი ჯგუფში), სხეულის მასით 150- 200გ. ყველა ქირურგიული მანიპულაცია ჩატარებულ იქნა ზოგადი გაუტკივარების პირობებში (ნატრიუმის ეტამინალის ინტრაპერიტონეული ინექციით, 0,5 მგ/კგ-ზე) და ასეპტიკისა და ანტისეპტიკის ყველა წესის სრული დაცვით, ექსპერიმენტულ ცხოველებთან მოპყრობისა და მათი გამოყენების გაიდლაინების შესაბამისად.

ცხოველები დაყოფილ იქნა 4 ექვივალენტურ ჯგუფად. ყველა ცხოველს წინასწარ ექმნებოდა ქვედა ყბის ძვლოვანი დეფექტი. ძვლოვანი მატრიქსის მისაღებად ვიყენებდით მსხვილი რქოსანი საქონლის ბარძაყის ძვალს.

დეცელულიზირებული ძვლის მატრიქსის მიღების მეთოდი.

საქონლის დაკვლიდან 1 საათის შემდეგ ბარძაყის ძვალს ვათავისუფლებდით რბილი ქსოვილებისგან. ოსტეოტომით ბარძაყის ძვლის სხეულის ღრუბლისებურ სტრუქტურას ვჭრიდით პატარა 10X5X1 სმ ზომის ფრაგმენტებად. მათ გასარეცხად ვათავსებდით 0.9%-იან NaCl–ის ხსნარში. 12 საათის განმავლობაში ვყინავდით მაცივარში - 800C –ზე. გამოყინვის შემდეგ ძვლის ფრაგმენტები ისევ ირეცხებოდა 0.9%-იან NaCl–ის ხსნარში. ამის შემდეგ, ძვლის ფრაგმენტები თავსდებოდა მაგნიტურ მდღვებავზე და პირველი 24 საათის განმავლობაში ირეცხებოდა 0,01%- იან SDS (Sigma) ხსნარში, შემდეგი 24 საათის განმავლობაში SDS (Sigma)–ის 0,1%-იან- ში და ბოლო 24 საათის განმავლობაში კი - 2%-იან SDS (Sigma)-ხსნარში. ამის შემდეგ ფრაგმენტებს ისევ ვრეცხავდით 0.9%-იან NaCl–ის ხსნარში. გარეცხვის შემდეგ ფრაგმენტები 24 საათით თავსდებოდა ხსნარში, რომელიც 25% აცეტონს და 75% ეთანოლს შეიცავდა. შემდეგი ეტაპი მოიცავდა ძვლის ფრაგმენტების გარეცხვას გამოხდილ წყალში ერთი საათის განმავლობაში და მათ მოთავსებას 2 საათის განმავლობაში 3%-

იან წყალბადის ზეჟანგის ხსნარში. ძვლის ფრაგმენტები იჭრებოდა ნაჭრებად ზომით – 1X1X1სმ. ზემოთ აღნიშნული წესით შექმნილ ძვლის იმპლანტებს ვამუშავებდით ვაკუუმიან ლიოფილურ საშრობში (QUARCO, Germany); ტრანსპლანტაციისათვის გამზადებულ დეცელულიზირებულ და ლეოფილიზებულ იმპლანტებს ვინახავდით სტერილურ შუშის ჭურჭელში.

ქვედა ყბის ძვლოვანი ქსოვილის დეფექტის მოდელირება.

ცდების პირველ სერიაში ზოგადი გაუტკივარების პირობებში, ასეპტიკისა და ანტისეპტიკის წესების სრული დაცვით, ცხოველს ვათავსებდით საოპერაციო მაგიდაზე. კანის თმიანი საფარველისაგან განთავისუფლების შემდეგ, ქვედა ყბის ქვედა კიდის გასწვრივ ვატარებდით 1,5-2 სმ სიგრძის განაკვეთს, საღეჭი კუნთის აშრევებას და ქვედა ყბის ძვლის ზედაპირის გაშიშვლებას .სტომატოლოგიური ბორით, ბრუნების გარკვეული სიხშირით. ქვედა ყბის ძვლის კუთხეზე იქმნებოდა მრგვალი ღრუ დიამეტრით 2 მმ, რომელიც არ უკავშირდებოდა პირის ღრუს. ქვედა ყბის ძვლოვანი დეფექტის

მოდელირების შემდეგ, ჭრილობა შრეობრივად იხურებოდა ყრუთ.

მეორე სერიაში ზოგადი გაუტკივარების პირობებში, ასეპტიკისა და ანტისეპტიკის წესების სრული დაცვით, ცხოველს ვათავსებდით საოპერაციო მაგიდაზე. კანის თმიანი საფარველისაგან განთავისუფლების შემდეგ, ისევე, როგორც პირველ სერიაში, ქვედა ყბის ქვედა კიდის გასწვრივ ვატარებდით 1,5-2 სმ სიგრძის განაკვეთს, საღეჭი კუნთის აშრევებას და ქვედა ყბის ძვლის ზედაპირის გაშიშვლებას .სტომატოლოგიური ბორით, ბრუნების გარკვეული სიხშირით. ქვედა ყბის ძვლის კუთხეზე იქმნებოდა მრგვალი ღრუ დიამეტრით 2 მმ, რომელიც არ უკავშირდებოდა პირის ღრუს. ამის შემდეგ, ქვედა ყბის ძვლოვანი დეფექტს ვავსებდით ჩვენს მიერ შემუშავებული დეცელულიზირებული ძვლოვანი მატრიქსით. დეფექტის მჭიდროდ შევსების შემდეგ მას საღეჭი კუნთით ვფარავდით, კანს ვიკრილის ნაკერით ვხურავდით და სპირტით ვამუშავებდით.

მესამე სერიაში ზოგადი გაუტკივარების პირობებში, ასეპტიკის და ანტისეპტიკის წესების დაცვით, ცხოველებს საოპერაციო მაგიდაზე პირაღმა ვათავსებდით. პირის ღრუს კიდიდან ლოყის უბნის რბილი ქსოვილებზე ვაკეთებდით 2

სმ სიგრძის განაკვეთს. რასპატორის მეშვეობით ვაშრევებდით საღეჭ კუნთს და ქვედა ყბის ძვლის ზედაპირს ვაშიშვლებდით. ყბის სახსრის მარჯვენა მხარეს ვახდენდით პირველი მოლარის ექსტრაქციას და შემდეგ სტომატოლოგიური ბორის საშუალებით ვაშორებდით კბილთაშუა ძგიდეს. ქვედა ყბის ძვალზე ვაფართოებდით ძვლოვან დეფექტს, რომელსაც ვავსებდით ტიტანის იმპლანტით. ჭრილობა ყრუდ იხურებოდა.

მეოთხე სერიაში ზოგადი გაუტკივარების პირობებში, ასეპტიკის და ანტისეპტიკის წესების დაცვით, ცხოველებს საოპერაციო მაგიდაზე პირაღმა ვათავსებდით. პირის ღრუს კიდიდან ლოყის უბნის რბილი ქსოვილებზე ვაკეთებდით 2 სმ სიგრძის განაკვეთს. ისევე, როგორც მესამე სერიაში, რასპატორის მეშვეობით ვაშრევებდით საღეჭ კუნთს და ქვედა ყბის ძვლის ზედაპირს ვაშიშვლებდით. ყბის სახსრის მარჯვენა მხარეს ვახდენდით პირველი მოლარის ექსტრაქციას და შემდეგ სტომატოლოგიური ბორის საშუალებით ვაშორებდით კბილთაშუა ძგიდეს. ქვედა ყბის ძვალზე ვაფართოებდით ძვლოვან დეფექტს. ძვლის მიღებულ დეფექტს ვავსებდით ჩვენს მიერ დამზაებული დეცელულიზირებული ძვლის

მატრიქსით, რომლის ზომა ხვრელის დიამეტრს ოდნავ აღემატებოდა.

აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ტიტანის იმპლანტს წინასწარ ვათავსებდით დეცელულიზირებულ ძვლოვან მატრიქსში, და მხოლოდ ამის შემდეგ ვავსებდით ქვედა ყბის ძვლის დეფექტს.

ცხოველები იმყოფებონენ ვივარიუმის სტანდარტულ პირობებში და ექსპერიმენტიდან გამოყვანა ხდებოდა ოპერაციიდან 1, 3, 6, 14, 25, 40, 60, 90, 150, 180, 240 დღეს. აუტოპსიაზე ვაკეთებდით ქვედა ყბის რეზექციას. ქვედა ყბის ძვლის ფრაგმენტებს ვაფიქსირებდით ფოსფატის ბუფერიან პარაფორმალდეჰიდის 4%-იან ხსნარში (pH 7,4) არაუმცირეს 24 საათისა. ფიქსაციის შემდეგ ვაშორებდით კანს, კანქვეშა ცხიმოვანს და საღეჭ კუნთებს. 24 საათიანი დეკალცინირების შემდეგ ვახდენდით დეჰიდრატაციას ეთანოლის მზარდ კონცენტრაციებში, ვაუფერულებდით ქსილოლში და ვაფიქსირებდით პარაფინში. 5-7 მკმ ანათლებს ვღებავდით ჰემატოქსილინ ეოზინით და მასონ-ტრიქრომით. იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდებიდან გამოვიყენეტ უჯრედების პროლიფერაციის მარკერი Ki-67. შედეგების სტატისტიკური დამუშავება ხდებოდა სტიუდენტის მეთოდით.

პირველი სერიის კვლევის შედეგები.

ექსპერიმენტების პირველ სერიაში მოდელირებიდან 24 საათის შემდეგ ქვედა ყბის ძვლის დეფექტის გარშემო არსებულ რბილ ქსოვილებში აღინიშნებოდა შეშუპება, ჰიპერემია და ქსოვილების ინფილტრაცია. მესამე დღეს მკვეთრად გამოვლინდა მწვავე ანთებითი რეაქცია. ეს რეაქცია განვითარდა როგორც პასუხი ქირურგიული ჩარევით გამოწვეულ ქსოვილის დაზიანებაზე. კოლაგენურ ბოჭკოებში ადგილი ჰქონდა ფიბრილური სტრუქტურის და ზოგადი არქიტექტონიკის ცვლილებებს. კაპილარებში კი შეიმჩნეოდა სისხლსავსეობა, ერითროციტების ფენა და კაპილარის სანათურის სრული ობლიტერაციით მიმდინარე კაპილარული ქსელის რედუქციის ნიშნები. დეფექტის მოდელირებიდან მე-4 დღეს დეფექტის გარშემო ღრძილის რბილ ქსოვილებში

აღმოჩენილია დადებითი დინამიკის მქონე გარკვეული მორფოფუნქციური ცვლილებები. მცირდებოდა მრავალშრიანი ბრტყელი ეპითელის უჯრედების და უჯრედშორისი სივრცის შეშუპება. რქოვანი გარსის დესქვამაცია საგრძნობლად შემცირდა. მე-10 დღეს ამ სერიის

ყველა ცხოველში ძვლოვანი დეფექტს მკვეთრად გამოხატული მომრგვალო–ოვალურ ფორმა გააჩნდა. დეფექტის ღრუ ძვლოვანი ფრაგმენტების შემცველ ნეკროზულ მასას შეიცავდა. ოპერაციიდან მე-15 დღეს ტრავმის ზონაში ჯერ კიდევ შეიმჩნეოდა ანთებითი რეაქციის ნარჩენი მოვლენები, რომელიც დიფუზურად განლაგებულ ლეიკოციტებს მოიცავდა. აღდგენითი პროცესის საწყისი ეტაპები შენარჩუნებული სტრუქტურის საზღვარზე ძვლოვანი ქსოვილის წარმოქმნაში გამოიხატებოდა, ხოლო დეფექტის დანარჩენი ნაწილი ამ დროისთვის შემაერთებელი ქსოვილით იყო შევსებული. აქ განლაგებული მიკროცერკულაციური სისხლძარღვების უმრავლესობა უზრუნველყოფდა პერივასკულარული უჯრედების შეღწევას, რომელთაც ოსტეობლასტური დიფერონის უჯრედებად დიფერენცირების უნარი გააჩნიათ.

დეფექტის ზონაში, ერთი თვის შემდეგ ძვლოვანი ტიხრები შემოსაზღვრული იყო მკვეთრად ბაზოფილური ციტოპლაზმიანი ოსტეობლასტებით და განლაგებული იყო შენარჩუნებულ ძვლოვან სტრუქტურებზე. ახლადწარმოქმნილი ძვლის ტიხრებს შორის ჯერ კიდევ შენარჩუნებული იყო უჯრედული ელემენტებით და სისხლძარღვებით მდიდრი,

ფაშარი, ბოჭკოვანი შემაერთებელი ქსოვილი. ტრავმის მთელ ზონაში ჩანდა გაფართოებული და ჰიპერემირებული სისხლძარღვები. ამ ვადებში მიმდინარე ცვლილებები შეიძლება დავახასიათოთ, როგორც რეგენერაციის აქტიური ფაზა.

დეფექტის ფორმირებიდან მე-60 დღეს მდგომარეობა არსებითად იცვლებოდა. ტრავმულ ზონას მთლიანად ავსებდა ახლადწარმოქმნილი ძვალი. ტიხრებს შორის შუალედები გაცილებით ნაკლები იყო, ვიდრე 30-ე დღეს, მაგრამ დეფექტის ცენტრში ტიხრები უფრო მეჩხერად იყო განლაგებული, ვიდრე პერიფერიაზე. ახლადწარმოქმნილი ძვლის ტიხრების გაყოლებაზე გვხვდებოდა მრავალბირთვიანი ოსტეოკლასტები, რომლებიც განლაგებული იყვნენ ღრუებში, რაც ძვლოვანი ქსოვილის გარდაქმნასა და ამავდროულად მის ფორმირებაზე მიუთითებდა.

90 დღისთვის დეფექტი უკვე თითქმის მთლიანად შევსებული იყო ფიზიოლოგიური გარდაქმნის ყველა ნიშნის მქონე სრულფასოვანი ახლადწარმოქმნილი ძვლოვანი ქსოვილით, თუმცა ამ რეგენერატის შემადგენელ ნაწილებს დიფერენცირების სხვადასხვა ხარისხი გააჩნდათ. გამოვლინდა ახლადწარმოქმნილი ძვლის

ტიხრებს შორის ბოჭკოვანი ქსოვილის ელემენტები. მკვეთრად იყო გამოყოფილი საზღვარი ახლადწარმოქმნილ ძვალსა და დეფექტის შემდეგ დარჩენილ ძვალს შორის.

რენტგენოგრამამ აჩვენა, რომ მე-60 დღეს ძვლოვანი ქსოვილის დეფექტს გააჩნდა არასწორი კონტურები და პერიმეტრზე გარშემორტყმული იყო პერიფოკალური ანთების ზონით – ძვლოვანი ქსოვილის არაჰომოგენური შესქელებით, რომელსაც ბადისებური სახე ჰქონდა. თუმცა, ძვლოვან დეფექტს შედარებით უფრო მცირე ზომები გააჩდა, ვიდრე ექსპერიმრნტის დასაწყისში და მისი ღრუ ამოვსებული იყო რენტგენოლოგიური თვალსაზრისით ძვალზე ნაკლებად მკვრივი ქსოვილით. ზემოთ თქმული, კვლევის ამ ვადისათვის ძვლოვანი რეგენერატის არასაკმაო სიმწიფესა და მინერალიზაციას ადასტურებს.

ამგვარად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ამ სერიის ცხოველებში ქვედა ყბის ძვლის პოსტოპერაციული დეფექტის რეპარაციული რეგენერაცია მიმდინარეობს დეფექტის ნაპირების აპოზიციურად დესმოგენური ოსტეოგენეზის სტადიის გავლით. 60 დღის შემდეგ დეფექტის ნაპირებზე ფორმირდება არაზრდასრული ძვალი, რომელიც დეფექტს ნაწილობრივ ფარავს., რაც

ქვედა ყბის ძვლოვანი ქსოვილის რეპარაციული რეგენერაციის დაბალ ტემპზე მუითითებს. უჯრედების პროლიფერაციის მარკერმა (KI-67) იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდების გამოყენებით ამ ვადებში შემცირებული ექსპრესია გვანახა.

რეპარაციული რეგენერაციის პროცესი პოსტრავმული, ქრონიკული ანთების ფონზე მიმდინარეობს, რომლის ხარისხი და მასშტაბები ოსტეორეპარაციის და მეორადი ოსტეოლიზის ერთდროულად მიმდინარე პროცესებს განსაზღვრავს, რაც თავის მხრივ დეფექტის ზონაში რეგენერაციის სიჩქარესა და ხარისხზე მიუთითებს.

მეორე სერიის კვლევის შედეგები.

დეფექტის ზონაში ძვლის დეცელულარიზირებული მატრიქსის მოთავსებისას, მისი ოსტეოინდუქტური და ოსტეოკონდუქტური თვისებებიდან გამომდინარე შეიმჩნეოდა ძვლის წარმოქმნის რეპარაციული პროცესების აქტივაცია. იგი ინტრამემბრანული ტიპის ოსტეოგენეზით მიმდინარეობდა და დეფექტის მთელ მოცულობას იკავებდა. ძვლოვანი მატრიქსის გარშემო ვიზუალიზირდებოდა აპოზიციური ძვალწარმოქმნის უბნები. ადრეულ ვადებში

ძვლოვანი მატრიქსის ზედაპირზე შეიმჩნეოდა პერივასკულური ოსტეოგენური უჯრედების და ოსტეობლასტების ადგეზია, რომელიც ოსტეოიდის შრეს ქმნიდა, რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებდა ძვლოვანი მატრიქსის ოსტეოინდუქტურ თვისებებს. ეს თვისებები ოსტეოინდუქტორების – ზრდის ფაქტორების და ძვლის მორფოგენური ცილების (იმპლანტის ოსტეოკასტიკური რეზორბციის დროს გამომუშავდება) დამსახურებაა.

ჩატარებული კვლევებით დადგინდა, რომ ოპერაციული ჭრილობის არეში პირის ღრუს ლორწოვანზე აღინიშნებოდა პოსტოპერაციული შეშუპების, ჰიპერემიისა და რბილი ქსოვილების ინფილტრაციის ნიშნები, I სერიის ცხოველების მსგავსად.

წინა სერიის ცხოველებისაგან განსხვავებით, ამ სერიის ცხოველებში რბილი ქსოვილების ინფილტრაციას ადგილი ჰქონდა მხოლოდ პირველი 3-5 დღის განმავლობაში. ანთების ნიშნები ნელ-ნელა მცირდებოდა და სრულიად ქრებოდა ოპერაციიდან მე-7-9-ე დღისათვის.

იმპლანტაციიდან მე-15 დღეს დეფექტის ზოგიერთ პერიფერიულ უბნებზე შეიმჩნეოდა მკვეთრი ბაზოფილია, დეფექტის ზონის ცენტრალურ ნაწილში ჩანდა ლეიკოციტების

გროვები რაც ჯერ კიდევ არსებულ ანთების პროცესზე მიუთითებდა.

იმპლანტაციიდან მე-20-25 დღეს შეიმჩნეოდა დეფექტის მხრიდან ძვლოვანი მატრიქსის მიმართულებით ძვლოვანი ელემენტების ჩაზრდა. ძვლოვანი მატრიქსის ტრაბეკულები გარდაიქნებოდნენ ორგანოტიპიურ ოსტეონურ

სტრუქტურებად, ფორმირდებოდა ე.წ. ქსოვილოვანსპეციფიკური ძვლოვანი რეგენერატი. პერფორაციული ნაპრალი ოსტეოკლასტური რეზორბციის ნიშნების მქონე ახლადწარმოქმნილი ფირფიტოვანი ძვლით იხურებოდა. ეს რეგენერატის რემოდელირების დაჩქარების პროცესს ადასტურებს.

იმპლანტაციიდან 30 –ე დღეს დესტრუქციული პროცესები და შესუსტებული ოსტეობლასტური რეაქციები შენარჩუნებული იყო, რომელიც სისხლძარღვების განვითარების ინტენსივობის შემცირების ფონზე მიმდინარეობდა. ძვლოვანი მატრიქსის უბნებში ჩანდა მრავალბირთვიანი ოსტეოკლასტები. იმპლანტაციიდან მე-60 დღეს ჩანდა ძვლოვანი ტიხრები, რომელიც ძვლოვან დეფექტს ძვლოვან მატრიქსთან აკავშირებდა. მატრიქსის ირგვლივ პერიფერიაზე განლაგებული იყო მცირეი სისხლძარღვები. ჩანდა ახლადწარმოქმილი ძვლოვანი ქსოვილი,

რომელშიც გადახლართული ძვლოვანი ტიხრები ვიზუალიზირდებოდა, ხოლო ამ ტიხრების გაყოლებაზე ჩალაგებული იყო ოსტეოკლასტები, რაც ახლადწარმოქმნილი ქსოვილის გარდაქმნაზე მიუთითებს.

იმპლანტაციიდან 90-ე დღეს ძვლოვანი მატრიქსის მნიშვნელოვანი ნაწილი ჩანაცვლებული იყო ძვლოვანი ქსოვილით. ვიზუალიზდებოდა ძვლოვანი ქსოვილის ფირფიტები, რომელიც შეიცავდა ძვლის ტვინს. ყოველივე ზემოთ აღნიშნული მიუთითებს ახლადწარმოქმნილი ქსოვილის რეკონსტრუქციაზე.

რენტგენოგრამამ აჩვენა, რომ დეფექტის მოდელირებიდან 15 -დან მე-20 დღეს ძვლოვანი ქსოვილის დეფექტს გააჩნდა არასწორი კონტურები და პერიმეტრზე გარშემორტყმული იყო პერიფოკალური ანთების ზონით. იმპლანტაციიდან ერთი თვის შემდეგ აღინიშნებოდა ძვლოვანი ქსოვილის არაჰომოგენური შესქელება. Pპირველ სერიის ცხოველებთან შედარებით ან სერიის ცხოველებს იმპლანტაციის ერთი თვის შემდეგ ძვლოვან დეფექტს შედარებით უფრო მცირე ზომები გააჩდა.

იმპლანტაციიდან 60-დღეს, ძვლოვანი დეფექტის ღრუ ამოვსებული იყო რენტგენოლოგიური თვალსაზრისით ძვალზე ნაკლებად მკვრივი ქსოვილით. იმპლანტაციიდან 90-დღეს ძვლოვანი იმპლანტატის სტრუქტურა რენტგენოლოგიურად არ განხვავდებოდა ნორმალურ ძვლის სტრუქტურისაგან.

უჯრედების პროლიფერაციის მარკერმა (KI-67) Pპირველ სერიის ცხოველებთან შედარებით ამ ვადებში ინტენსიური ექსპრესია გვანახა.

ამგვარად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ამ სერიის ცხოველებში დეცელულარიზირებული ძვლოვანი მატრიქსი ხელს უწყობს ექსპერიმენტში

ხელოვნურად შექმნილი ქვედა ყბის ძვლის დეფექტის სწრაფ შეხორცებას. დეცელულარიზირებული ძვლოვანი მატრიქსის მასტიმულირებელი ეფექტის მისაღწევად მნიშვნელობა ენიჭება სამ მექანიზმს :

1. სისხლძარღვოვანი რეაქციის აქტივაცია, რომელიც ტრავმულ უბანსი ოსტეგენური უჯრედების წინამორბედების ტრანსპორტირებასა და მათ დიფერენცირებას უზრუნველყოფს;

2. ტრავმულ ზონაში ადგილობრივი ოსტეოპროგენიტორული უჯრედების პოტენციალის რეალიზაცია;

3. კოლაგენზე საკუთარი ზრდის ფაქტორების ფიქსაცია;

მესამე სერიის კვლევის შედეგები.

როგორც ჩატარებული კვლევის შედეგებმა გვაჩვენა ტიტანის იმპლანტაციას ტრავმასა და უცხო სხეულზე ორგანიზმის საპასუხო რეაქცია ახლავს თან, რაც ასეპტიკურ ანთებაში გამოიხატება. ანთების დაწყებიდან უკვე 3 საათის შემდეგ ლეიკოციტები კაპილარების კედლის გავლით შემაერთებელ ქსოვილში მიგრირებას იწყებდნენ, გადაინაცვლებდნენ იმპლანტის მიმართულებით, ყოველი მხრიდან გარს შემოეხვეოდნენ და ანთების დაწყებიდან 6-12 საათის შემდეგ მკვეთრად გამოხატულ ლეიკოციტურ ბარიერს ქმნიდნენ. 24-სთ-თვის სისხლძარღვებიდან ნეიტროფილური ლეიკოციტების მიგრაციის პროცესი წყდებოდა, უკვე წარმოქმნილი ლეიკოციტური ბარიერი ზომაში კლებულობდა, რადგან მისი წარმომქნელი უჯრედები იშლებოდა. ანთების კერაში გროვდებოდა ისეთი ნივთიერებები, როგორიცაა რძის მჟავა, რაც აციდოზის განვითარებას იწვევდა; 48 საათის შემდეგ იწყებოდა მაკროფაგების

წარმოქმნის სტიმულაცია სისხლძარღვებიდან მიგრირებული მონოციტების ხარჯზე და ნეიტროფილური ლეიკოციტების ჩანაცვლება. ზემოთ აღწერილი პროცესები დამახასიათებელია მწვავე ანთებისთვის. ამ ვადებში მიმდინარეობდა იმპლანტის ზედაპირზე უჯრედების ადჰეზია. მე-4-5 დღისთვის მაკროფაგები იმპლანტს ირგვლივ არსებული ქსოვილებისგან შემოსაზღვრავდნენ. ვფიქრობდ რომ ეს იყო გრანულაციური ქსოვილის წარმოქმნის წინაპირობა. ერთი თვის შემდეგ იმპლანტის გარშემო ფიბრობლასტები გროვდებოდა და იწყებოდა იმპლანტის გარშემო შემაერთებელქსოვილოვანი კაფსულის წარმოქმნა. იგი მდიდარი იყო კაპილარების ქსელით და გარემომცველი ქსოვილებისგან იმპლანტის იზოლაციას ახდენდა. ამრიგად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ დეფექტის მოდელირებიდან პირველივე დღე-ღამეში ჭრილობაში აღინიშნება ძვლოვანი ქსოვილის ნეკროზული უბნები.

მოდელირებიდან 1 თვის შემდეგ დეფექტის გარშემო იწყებოდა რეგენერაციის პროცესი, რის შედეგადაც ვითარდებოდა ტრაბეკულური ძვალი, რომელიც ჯერ ისეთი სუსტი იყო, რომ არ შესწევდა უნარი გაეძლო ფუნქციონალურ დატვირთვისთვის. შემდეგი ეტაპი – შეხორცება – ანუ, ლამენარული ძვლის წარმოქმნა, რომელიც

იმპლანტსა და ძვალს შორის არსებულ სივრცეს ავსებდა (ოსტეოინტეგრაცია).

ეს არის უკვე ზრდასრული, მაგარი ძვალი, რომელსაც უნარი აქვს ღეჭვითი პროცესის დატვირთვას გაუძლოს. მის ჩამოყალიბებას დაახლოებით 18 კვირა სჭირდება. ამავე ვადებში იმუნოჰისტოქიმიურნა უჯრედების პროლიფერაციის მარკერის (Ki-67)-ის ინტენსიური ექსპრესია გვაჩვენა.

როგორც ჩატარებულმა კვლევებმა გვანახა, თუ ვადებს არ დავიცავთ, იმპლანტის გარშემო არსებული ქსოვილების ნეკროზული უბნების ჩამოყალიბება დაიწყება და ამის შედეგად იმპლანტი ამოძრავდება, რაც ოსტეოინტეგრაციის არასრულყოფილ განვითარებას ნიშნავს. კბილის ექსტრაქციის შემდეგ დარჩენილ კბილბუდეში დენტალური იმპლანტის მყისიერი შეყვანა იწვევს ანთებით რეაქციას, რომელიც გამოიხატება არამკვეთრი რეპარაციული პროცესების აქტივაციით ძვლის ქსოვილში და 3-დან 6 თვემდე გრძელდება. ოსტეოგენეზი უფრო ინტენსიურად იმპლანტაციის მე-8 თვიდან ვითარდება.

მეოთხე სერიის კვლევისშედეგები.

ექსპერიმენტების მეოთხე სერიაში მოდელირებიდან 24 საათის შემდეგ ქვედა ყბის

ძვლის დეფექტის გარშემო არსებულ რბილ ქსოვილებში აღინიშნებოდა შეშუპება, ჰიპერემია და ქსოვილების ინფილტრაცია. მესამე დღეს მკვეთრად გამოვლინდა მწვავე ანთებითი რეაქცია. ეს რეაქცია განვითარდა როგორც პასუხი ქირურგიული ჩარევით გამოწვეულ ქსოვილის დაზიანებაზე, და ასევე დეცელულარიზირებული ძვლის მინერალის იმპლანტაციით. კოლაგენურ ბოჭკოებში ადგილი ჰქონდა ფიბრილური სტრუქტურის და ზოგადი არქიტექტონიკის ცვლილებებს. დეფექტის მოდელირებიდან მე-4 დღეს დეფექტის გარშემო ღრძილის რბილ ქსოვილებში აღმოჩენილია დადებითი დინამიკის მქონე გარკვეული მორფოფუნქციური ცვლილებები. მცირდებოდა მრავალშრიანი ბრტყელი ეპითელის უჯრედების და უჯრედშორისი სივრცის შეშუპება. იმპლანტაციიდან მე-6-7 დღეს ღრძილის შემაერთებელ ქსოვილში ანთებითი ინფილტრაციის ხარისხი მცირდებოდა და იგი თანდათან მაკროფაგულ- ფიბრობლასტური ფაზით იცვლებოდა. დვრილოვან შრეში წარმოქმნებოდა ახალი, თითისტარისებური ენდოთელიოციტების შემცველი სისხლძარღვები. უფრო გვიან ვადებში ღრძილის მრავალშრიანი ბრტყელი ეპითელიუმის არქიტექტონიკა და

სტრუქტურა მთლიანად აღდგენილი იყო, შემაერთებელი ქსოვილში არ აღინიშნებოდა გამოხატული ანთებითი ინფილტრაცია. უჯრედული შემადგენლობას კი ძირითადად ფიბრობლასტები შეადგენდნენ.

მე-5-7 დღეს ძვლოვანი დეფექტის და მასში მოთავსებული "ტიტან_ძვლოვანი" კონგლომერატის კვლევებმა აჩვენეს, რომ ხდებოდა ისეთი კაფსულის ფორმირება, რომელიც გრანულაციური ქსოვილის ჩამოყალიბების სტადიას გადიოდა. კონგლომერატის გარშემო ფიბრობლასტების პროლიფერაცია აქტიურად მიმდინარეობდა. საწყისი მაკროფაგული რეაქცია კი არ სუსტდებოდა, არამედ ძლიერდებოდა, რადგან მაკროფაგები და გიგანტური უჯრედები ცდილობდნენ დეცელულარიზირებული ძვლოვანი მატრიქსის (რომელსაც დეფექტის ზონაში ძვლოვანი ქსოვილის მიზანმიმართული რეგენერაციის მიმდინარეობის გამტარის ფუნქცია აკისრია) ფაგოციტირებას და რეზორბციას.

მიუხედავად იმისა, რომ ბიომასალა ბიოშეთავსებადად ითვლებოდა, ფორმა როგორშიც მას ვიყენებდით ("ტიტან-ძვლოვანი მატრიქსი") ქსოვილების რეაქციაზე ზეგავლენას ახდენდა. აღმოჩდა, რომ ადგილობრივი რეაქცია ბიომასალაზე დამოკიდებულია მასალის

ზედაპურულ თვისებებზე, მის ფორმაზე, იმპლანტის და ბიომასალის ზედაპირის ფართობის შეფარდებაზე. ექსპერიმენტის დაწყებიდან მე- 15 დღეს ძვლოვანი მატრიქსით და ტიტანის იმპლანტით იმპლანტირებული ქვედა ყბის ფრაგმენტის შესწავლისას დადგინდა, რომ იმპლანტი დაფარული იყო შემაერთებელი ქსოვილის ბოჭკოებით. ცხადია, უკვე ოპერაციიდან მე-2 კვირას ძვლოვანი მატრიქსის ფოროვნების მაღალი დონე და უხეში ზედაპირი, ასევე ტიტანის იმპლანტის არსებობა ხელს უწყობდა ფიბრობლასტების აქტიურ მიგრაციას და შემაერთებელი ქსოვილის ფორმირებას. გარდა ამისა, ძვლოვანი მატრიქსის ფოროვნება ეფექტური ვასკულარიზაციისთვისაც კარგ პირობებს ქმნიდა. ამ ვადების დამახასიათებელი თავისებურება ის იყო, რომ ტიტანური

იმპლანტის ზედაპირი ძვლოვან მატრიქსში გამოყოფილი იყო და მასთან ერთიან კონგლომერანტს არ ქმნიდა. მნიშვნელოვანია, იმის აღნიშვნა რომ ტიტანის იმპლანტი მის გარშემო არსებული ქსოვილებში ანთების რეაქციას არ იწვევდა. იმპლანტაციის 30 დრის შემდეგ ტიტანის იმპლანტი და ძვლოვანი მატრიქსი უკვე ერთიან სისტემას ქმნიდნენ. მე-60 დღის მაკროპრეპარატების დათვალიერებამ

აჩვენა, რომ ტიტანის იმპლანტი ძვლის მატრიქსთან მჭიდროდ იყო შედუღებებული. გრანულებს შორის სივრცეები კი სავსე იყო ნახევრად გამჭირვალე ძვლოვანი ნივთიერებით . ზონდირებისას დადგინდა მისი მკვრივი სტრუქტურა. ტიტან-ძვლოვანი კონგლომერატი მე-60 დღეზე დეფექტის კედლებს მჭიდროდ ეკვროდა და მათ შორის ვიზუალური საზღვარი არ შეინიშნებოდა.

მე-2-3 დღეს ძვლის მატრიქსის ზედაპირზე შეიმჩნეოდა პერივასკულარული ოსტეოგენური უჯრედების და ოსტეობლასტების არსებობა, რომლებიც ოსტეოდის შრეს ქმნიდნენ, რაც ძვლოვანი მატრიქსის ოსტეოინდუქტურ თვისებებზე მიუთითებდა. მე-8-10 დღეს ძვლოვანი მატრიქსის გარშემო ასევე ვიზუალიზირდებოდა უბნები, სადაც ხდებოდა აქტიური აპოზიციური ძვლის წარმოქნის და ნეოანგიოგენეზის პროცესები. მე-18-20 დღეს იმპლანტაციის ადგილას აღინიშნებოდა შემაერთებელი ქსოვილის ძლიერი პლორიფერაცია რაც ახალგაზრდა ფიბრობლასტების ძვლოვანი მატრიქსის სტრუქტურაში აქტიურად ჩაზრდაში გამოიხატებოდა. დეფექტის ზონა მთლიანად ამოვსებული იყო რეციპიენტის საკუთარი

ახალგაზრდა შემაერთებელი ქსოვილით, რომელთა შორისაც გვხვდებოდა ახლადწარმოქმნილი უხეშბოჭკოვანი სტრუქტურის მქონე ძვლოვანი ქსოვილის კერები.

28-30-ე დღეს დეფექტის უბანში შემაერთებელ ქსოვილთან ერთად გვხვდებოდა ერთეული აქტიური ფიბრობლასტები., რაც ახალგაზრდა ძვლოვანი ქსოვილის ფორმირებაზე მიუთითებდა. ეს უჯრედები დეფექტის ზონის გარშემო არსებული რეციპიენტისზრდასრული ძვლოვანი ქსოვილის გაყოლებაზე ლაგდებოდა და მომრგვალო, დიდი ზომის, ღია ციტოპლაზმის და შედარებით მუქი ბირთვის მქონე უჯრედებს წარმოადგენდა. 40- დღეს ახალგაზრდა შემაერთებელი ქსოვილის პროლიფერაციას თან ახლდა სისხლძარღვების ქსელის ფორმირება. ძვლოვანი მატრიქსის პერიფერიაზე წარმოიშვებოდა აქტიური ოსტეობლასტების რიგები, რაც ახალგაზრდა, რეტიკულოფიბროზული ძვლოვანი ქსოვილის ფორმირებას უკავშირდებოდა. რეგენერატის ზონაში აღმოჩენილი იყო აქტიური მაკროფაგების და მათგან წარმოქმნილი ოსტეოკლასტების დიდი რაოდენობა, რომლებიც არაზრდასრული რეტიკულოფიბროზული ძვლოვანი ქსოვილის

თხელი ტიხრების ინტენსიურ რეზორბციას ახორციელებდნენ.

ზოგიერთ უბნებზე ძვლოვანი მატრიქსის ქსოვილი შემაერთებელი ქსოვილით ჩაენაცვლებოდა, რომელსაც გარს ფირფიტოვანი ძვლოვანი ქსოვილი ეკვროდა. ამ ახლადწარმოქმნილი ძვლის ნაპრალებში ჩანდა ოსტეოკლასტები და აქტიური ოსტეობლასტების რიგები, რომლებიც ოსტეონების წარმოქმნის გზით ძვლების გარდაქმნასა და მის ორგანიზაციაში მონაწილეობდნენ.

მე-80-დღეს ძვლოვანი მატრიქსი ზრდასრული, ფირფიტოვანი ძვლოვანი ქსოვილით იყო წარმოდგენილი, რომელიც ოსტეოზური სტრუქტურის, ღრუბლოვანი ფორმაციის და სტრუქტურის ტიხროვანი ორგანიზაციის მქონე კორტიკალური ფირფიტისაგან შედგებოდა.

ძვლისსაზრდელას აშრევების დროს კარგად ვიზუალიზირდებოდა შემაერთებელ ქსოვილოვანი ბოჭკოები, მცირე და საშუალო სისხლძარღვები რომლებიც როგორც ძვლისსაზრდელას მხრიდან, ისე ძვლის დეფექტის კედლების მხრიდანაც ძვლოვანი მატრიქსის ფორებში იყო ჩაზრდილი. ამავე ვადებში იმუნოჰისტოქიმიურმა კვლევამ

უჯრედების პროლიფერაციის მარკერის (Ki-67-ის) ინტენსიური ექსპრესია გვაჩვენა

დასკვნები.

1. ჩვენს მიერ შემუშავებული ნატურალური ძვლოვანი მატრიქსი წარმოაადგენს ადამიანის ძვლის ღრუბლოვანი ნივთიერების ანალოგიურ არაორგანულ, მაკრო და მიკრო ძვლოვან სტრუქტურას;

2. ფორების დიდი მოცულობის და ბუნებრივი მინერალური შემადგენლობა ახალი ძვლოვანი ქსოვილის განვითარებას და მის იმპლანტთან შეზრდას უკეთებს სტიმულაციას;

3. მინერალს გააჩნია დსტეოკონდუქტიური სტრუქტურა და შესაზლებელი გრანულის, ფხვნილის ან ბლოკების ფორმა მივცეთ;

4. რადგან ნატურალური ძვლოვანი მატრიქსი ბუნებრივი წარმოშობისაა, იგი ქიმიურად და სტრუქტურულად ადამიანის მინერალურ ძვალთან შეთავსებადად შეიძლება ჩაითვალოს;

5. ჩვენს მიერ შემუშავებული დეცელულარიზებული, ლეოფილიზირებული ნატურალური ძვლის მატრიქსის ძვლოვანი

ქსოვილის მოცულობის გაზრდის მიზნით გამოყენების ეფექტურობა შესწავლილია ცხოველებზე დაკვირვების საფუძველზე და რენტგენოლოგიური, მორფოლოგიური, ჰისტოქიმიური კვლევის მეთოდების გამოყენებით.

6. ჩვენს მიერ შექმნილი ძვლოვანი ქსოვილის ნატურალური მატრიქსი სხვადასვა ძვლოვანი დეფექტების შევსებისას შეიძლება აუტოგენური ძვლის ალტერნატივა გახდეს.

პრაქტიკული რეკომენდაციები

ძვლოვანი მინერალი (BIO-OSS) და ბიოტოლერანტული ძვლის მატრიქსი შესაძლებელია გამოყენებული იქნას ძვლოვანი დეფექტების შესავსებად და ძვლის აუგმენტაციისათვის შემდეგ შემთხვევებში: ალვეოლარული მორჩის აუგმენტაცია/რეკონსტრუქცია; კბილბუდის შევსება კბილის ექსტრაქციის შემდგომ. ასევე შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას იმპლანტოლოგიაში: იმპლანტის ჩადგმისას მონაკვეთის მომზადებისათვის, ძვლის ნაპრალების შესავსებად და სინუს ლიფტინგის დროს; პაროდონტოლოგიაში: ძვლოვანი დეფექტების შევსებისათვის; ყბა–სახის

ქირურგიაში: ძვლოვანი დეფექტების რეკონსტრუქციისათვის და ორთოპედიაში დიდი ზომის ძვლოვანი დეფექტების აღსადგენად.

Relevance of work

Over the course of last 15 years, dental implants have taken the leading role in dental practice. Literature proves that implantation is widely used in orthopedic dentistry to fill up the defects in toothrow. This has partially solved problem of rehabilitation in oral diseases that cause patients to loose teeth or nearby tissues.

Despite newest achievements in dental implantology, complications, like inflammation processes in tissues under the prosthetics, are still pressing problem.

Tooth alignment defects, predominantly full absence of teeth, complicate full fixation and functioning of prosthetics. Atrophy of the basal bridge is a big drawback for rational orthopedic treatment. On the 6-th month after tooth extraction average height loss on basal bridge for mandible is 2,3 mm and for maxillae is 4,4 mm. specific characteristics for the given area of bone tissue don't give opportunity to

preserve initial dimensions after teeth extraction. Therefore given loss can only be compensated by surgically implanting bio- products, that can either mechanically carry out role of a bone, or have inducting effect on bone regeneration process. There is a whole range of surgical operations using implants dedicated to the sole purpose to prepare defective area for orthopedic treatment. Main group of this operations are reconstructive-boneplastic operations that are oriented on increasing bone mass in the area of implantation. In todays times Jawbone mineral composition, its regeneration and remodeling abilities are widely studied. Based on this studies there are lots of bio-composite materials available. This osteoplastic materials besides filling up bone deficits, induct osteogenesis, impact progenitor cells and carry out complicated task of delivering curative materials. For this reasons wide range of materials can be used, like collagen, hydroxyapatite and various combinations of this two, also conserved alo-, xeno- and autobone. One of the most used version of autobone implant is taken from Crista Iliaca, that contains sustainable osteoblasts and stem cells that are potent to induct osteogenesis. As surgical experience shows, available materials for implantation don't fulfill all the surgical needs and requirements, that in our opinion comes to the fact

that this materials have only osteoconductive abilities. Biggest backlash for autologous materials is a necessity to inflict additional trauma and the degree of that depends on the initial defect that has to filled. Also there is a prolonged pain syndrome in the implanted area. Everything mentioned above has defined the cause of our research.

Goals and objectives of the research

Main goal is to create a biotolerant bone matrix that can be successfully used to increase volume of the bone tissue for implantation purposes.

1. Engineer and refine technological steps to create decellularized neutral bone matrix form cattle bone tissue;
2. Optimize bone tissue decellularisation method;
3. Simulate bone tissue defect in experimental animals that is very near to clinical terms;
4. Examine effectiveness of our new natural bone matrix for underjaw bone defect restoration;
5. Onestep implantation of natural, mineral matrix (Bio-Oss) and titanium implant to restore underjaw defect;
6. Onestep implantation of new natural decellularized bone and titanium implant to restore underjaw defect;

7. Make a comparative analysis of effectiveness in bone tissue augmentation between decellularized bone matrix developed by us and natural bone mineral “Bio-Oss” (Switzerland).

Scientific novelty

- For the first time bio-tolerant natural bone implant, that has apatite alike nanocrystal structure, was synthesized from cattle bone.
- For the first time in experiments on animals was studied effectiveness of our natural bone matrix implant. Effectiveness was expressed in growth of bone tissue volume in implantation area.
- Analysis of close and distant results showed that our new bone matrix can be an effective alternative for autologous bone in filling various bone defects.
- For the first time was onephase implantation of dental implant and bone- plastic composite carried out.

Practical value

Carried out research showed that, new generation of macro and microporous composite material that has analogical structure to the human spongiform bone, can be used in medical care. Forasmuch natural bone

matrix has natural origin and is decellularized it can be considered as compatible with human bone tissue.

Main topics to uphold

1. Natural decellularized bone matrix developed by us enables angio- and ostegenesis stimulation in wound and contributes in creation of completed regenerate, due to its oseoconductive and oseoinductive abilities;
2. Natural decellularized bone matrix is a bone structure with similar micro and macro structures to human spongiform bone tissue;
3. Big content of pores and natural mineral composition of decellularized bone matrix contributes to better adhesion of cells, vascularization and fast growth of new bone tissue;
4. Complex tissue reaction on our bone matrix occurs without toxic effect and immune response;
5. Natural decellularized bone matrix if used in dental implantation ensures complete reparational regeneration and significantly decreases bone regeneration periods;
6. Onephase implantation of titanium implant and composite bone graft ensures stability of dental implants;

7. Decellularized bone matrix can become alternative to autologous bone.

Method and materials

Experiments were done using Lewis LEW/Crl line 60 rats. The age of the rats was 6 month and weight 150-200gr. Animals were divided into 2 equal groups (30 animal in each group). Each surgical procedure was done under general anesthesia (intraperitoneal injection of sodium etaminal 0.5mg/kg) also in full compliance with the aseptic and antiseptic rules and guidelines with regard to treating and using the experimental animals. The animals were divided into 5 equivalent groups. Each animal was given a bone-

defect on underjaw in prior. For receiving the bone matrix we used femur bones.

Creation of decellularized bone matrix

For the creation of decellularized bone matrix fresh samples of bovine, femur bones were used. Femur bones were collected 1 hour subsequent to slaughter. The bone was separated from the soft tissue and cut with osteotome into small fragments of 10 × 5 × 1 cm. The bone fragments were rinsed with 0.9% saline solution and then frozen at –80°C for 12h. After 12 hrs. the bone fragments were rinsed again with 0.9% saline

solution and then washed for first 24 hrs. with 0.01% SDS (Sodium dodecyl sulfate, (SDS; Sigma-Aldrich; EMD Millipore)); for the next 24 hrs. - with 0.1% SDS and then for next 24 hrs. with – 2% SDS solution. Following the SDS treatment the bone fragments were washed with 0.9% saline solution and then placed for 24 hrs. in solution containing 25% Acetone and 75% Ethanol. Next stage was washing the bone fragments with distilled water for 1 hour and their subsequent placement for 2 hrs. in 3 % hydrogen peroxide solution. After the bone fragments were cut in small fragments of 1x1x1 cm. At the final stage the bone implants were treated in vacuum lyophilic dryer (QUARCO, Germany); The decellularized and lyophilized implants were stored in sterile glass containers

Modelling of the bone-tissue defect of the underjaw

In control group under general anesthesia the animal was placed on an operational table. Extraoral incision was performed, parallel to lower margin of mandible in size of 1.5- 2 cm. Buccal surface of mandible was uncovered. Round cavity, of 2mm in diameter, not penetrating oral cavity, was created with dental bur in the bone near the angle of mandible.

After remodeling of mandible bone, the wound was sutured in a blunt manner.

In experimental group model of bone defect was created with the same protocol as in control group and filled with decellularized bone matrix. After the defect was fully restored with matrix, it was covered with Masseter muscle, wound was closed with vicrile suture.

During the second series of the experiments the animal was placed on an operation tables under general anesthesia, in compliance with the rules of aseptic and septic. After uncovering the surface, similarly to the first series, an incision was performed, parallel to lower margin of mandible in size of 1.5-2 cm. Round cavity, of 2mm in diameter, not penetrating oral cavity, was created with dental bur in the bone near the angle of mandible. After remodeling of the mandible bone, the wound was sutured in a blunt manner. The cavity matrix was filled with decellularized bone matrix. After the defect was fully restored with matrix, it was covered with Masseter muscle, wound was closed with vicrile suture and treated with alcohol.

During the third series, the animal, under general anesthesia, in compliance with the rules of aseptic and septic, was placed on an operation table face-up. A

2cm incision from the margin of the oral cavity to the soft tissue of the buccal cavity was inserted. With help of rugine, the Masseter muscle was detached and the surface of the mandible bone was exposed. The first molar was extracted on the right side of the jaw joint and then the inter- teeth septum was removed with dental bur. The bone defect on the mandible was widened and filled with titanium implant. The wound was covered in blunt manner.

During the fourth series, the animal, under general anesthesia, in compliance with the rules of aseptic and septic, was placed on an operation table face-up. Similarly to the third series, a 2cm incision from the margin of the oral cavity to the soft tissue of the buccal cavity was inserted. With help of rugine, the Masseter muscle was detached and the surface of the mandible bone was exposed. The first molar was extracted on the right side of the jaw joint and then the inter-teeth septum was removed with dental bur. The bone defect on the mandible was widened and the created defect was filled with the decellularized bone matrix created by us. The size of the matrix slightly exceeded the diameter of the cavity.

Hereby it is noteworthy, that the titanium implant was placed in the decellularized bone matrix in prior and only after this, the mandible defect was filled.

Each animal was under clinical surveillance for maximum 240 days and periodically underwent Cone Beam Computed Tomography and radiographic examinations.

After surgical intervention, animals were in standard conditions of vivarium and were sacrificed on the 1st, 3rd, 14th, 25th, 40th, 60th, 90th, 150th, 180th and 240th day after surgery. During the autopsy the mandible was resected, and the mandible bone fragments were fixated with the 4% solution of Paraformaldehyde (pH 7,4) for not less, than 24 hours. After the fixation the skin, subcutis and Masseter muscles were removed. After 24-hour long decalcification, the fragments were dehydrated in the increasing concentration of Ethanol, decolorized in Xylene and fixated in Paraffin. 5-7 mkm slices were colored with Hematoxyl-Eosin and Masson's Trichtrome. From the immunohistochemical methods the cell-proliferation Ki-67 was used. The statistical analysis of the results was done with the use of Student's test.

The result of the first series of experiments

In the first series of experiments, after the modeling, in the soft tissues surrounding the mandible bone defect, was detected swelling, hyperemia and

infiltration, noticeable after 24 hours. On the third day acute inflammation of the tissue was clearly manifested. Collagen fibers showed destruction of fibrillary structure and overall architectonic changes. The nearby blood vessels were plethoric, had a layer of erythrocytes and showed signs of reduction of the capillary network. On the 4th day after modeling a defect, surrounding tissues showed signs of positive dynamic, through morpho-functional changes. Swelling of stratified epithelium and intercellular space was reducing. On the 10th day all bone defects, in every animal of this series, had oval shape. Bone tissue containing necrotic fragments could be observed in defect cavity. On the 15th day after the operation, remnants of inflammatory reaction, containing diffusively deployed white blood cells, could still be observed. Starting stage of the renewal process, that was observed on the edges of preserved healthy tissue, was expressed through osteogenesis. At this stage, the rest of the defect was filled with connective tissue. The microvascular blood vessels surrounding the defected area provide a good path for perivascular cells to penetrate, which have an ability to differentiate into osteoblastic cells.

After one month, the bone septums in the defected area were covered with clearly manifested basophilic

osteoblasts, that were located on the remaining bone structures. Between newly emerged bone septums remained a loose connective tissue, that was rich with cellular elements and micro blood vessels. Hyperemic blood vessels could be seen throughout the whole defected area. Ongoing changes and processes at this moment of experiments can be characterized as an active regeneration phase.

60 days after forming a defect the picture has been changing substantially. Newly formed bone was filling the whole defected area. Space between the bone trabecules was significantly smaller in comparison to the 30th day of experiments, but the trabecules were sparsely located in the center than on the periphery. Along the re-formed bone bars were multinuclear osteoblast located in the cavities, that was a clear indicator of the bone formation and bone tissue transformation.

To the day 90, the defect was almost fully filled with newly formed bone tissue, that showed all signs of physiological transformation, but contents of this regenerate had different degrees of differentiation. Elements of fibrous tissue were found between the newly formed bone trabecules. The border between the newly formed bone tissue of the defect and the leftover bone was clearly manifested.

X-ray showed that on the 60th day, the defect of the bone tissue had uneven contours and on the perimeter it was surrounded with perifocal inflammation zone – cribriform, nonhomogenic thickening of the bone tissue, but the bone defect was smaller in size in comparison to the beginning of the experiment and its cavity was filled with a tissue having less density than a normal bone tissue. All abovementioned proves poor mineralization and immaturity of the regenerate at this point of experiment.

Therefore, we can establish, that the reparational regeneration of the postoperative defect of the mandibular bone in animals of these series, includes the stage of desmogenous osteogenesis appositional to the margins of the cavity. After 60 days immature bone is formed on the margin of the defect, which partially covers the defect. Which on its part indicates the slow rate of reparative regeneration of the mandible bone tissue. Immuno- histo-chemical evaluation using the cell proliferation marker (Ki-67) showed decreased expression within these terms.

The reparative regeneration process occurs alongside the post-traumatic, chronic inflammation, the quality and scale of which defines the processes of osteo-reparation and secondary osteolysis occurring

simultaneously. This on its part indicates on the speed and quality of regeneration in the defect zone.

Results of the second series of experiments

After placing a decellularized matrix in the defected area, due to its osteoinductive and osteoconductive capacity, activation of the bone reparation processes were noticeable. Process was working through intermembrane type of osteogenesis and occurred throughout the whole defected area. Appostional osteogenic processes could be observed around the bone matrix. On the early stages adhesion of perivascular osteogenic cells and osteoblasts was noticeable and created an osteoide layer, that once more proved osteoinductive capacity of bone matrix. This capacity of osteoinductors come from grows factor and bone morphogenic proteins.

Researches showed signs of postoperative swelling, hyperemia and infiltration in nearby soft tissues of the operation area, similar to the animals of the first series of experiments.

Unlike the first series, soft tissue infiltration went only for 3-5 days on. Signs of inflammation reduced and totally disappeared to the 7th -9th day after operation.

On the 15th day after implantation, on the periphery of the defected area was a clearly manifested basophilia, on the central zone piles of leukocytes were seen, that indicated an ongoing inflammation process.

On the 20-25th day after implantation, ingrowth of osseous elements could be observed from defected area to matrix. The trabecules of the bone matrix were transformed into the osteogenic structures and so-called “tissue specific” bone regenerate was formed. Perforational rift started to close with newly formed lamellar bone tissue. This proves acceleration of regenerates remodeling process.

On the 30th day after implantation destructive processes and weakened osteoblastic reactions were preserved and went on with low rate vascular development. In the bone matrix area, multiple osteoblasts were present. On the 60th day bone trabecules connecting the defect and the bone matrix were present. Around the matrix on the periphery small blood vessels were located. Newly formed bone tissue interlaced with bone septums and osteoclasts was visualized. This indicated transformation of neoformed tissue.

90th day after implantation: significant part of bone matrix is replaced with bone tissue. Bone tissue plates, containing the bone marrow, could be visualized. All

above mentioned proves reconstruction of neoformed tissue.

X- ray showed that on 15th-20th day bone tissue defect had uneven contours and was surrounded by perifocal inflammation zone. After one month, non-homogenic thickening of bone tissue was noticeable. The defect in the animals of the second series was significantly smaller after one month in comparison to the first series. On the 60th day after implantation the defect cavity was filled with radiographically less dense tissue than a bone. On the 90th day the structure of the implant was radiographically indistinguishable from the normal bone structure.

Cells proliferation marker (Ki-67) in the same time period showed us higher expression in comparison to the first series.

From all said above we can conclude that bone matrix helps a fast regeneration of the artificial defect created on the lower jaw of the animals in an experimental environment. Stimulating effect of the decellularized bone matrix depends on three mechanism:

1) Activation of vascular reaction, which ensures migration and differentiation of preostegonic cells into the traumatic area;

2) Realization of potential of osteoprogenic cells in the traumatic area; ensures local realization of potential of osteoprogenitor cells

3) Fixation of its own growth factors onto the collagen fibers.

The results of the third series of experiments

As the results of the carried out experiments showed, the body has response reaction on trauma and foreign body during titanium implantation, which is depicted in aseptic inflammation. Already 3 hours the start of the inflammation, the leukocytes start to migrate to the connective tissue through the walls of capillaries. The moved towards the implant, surrounded it from each side and after 6-12 hours of inflammation created clearly manifested leukocyte barrier. By 24 hours, the process of migration of neutrophilic leukocytes from blood vessels had stopped, the size of created leukocyte barrier was reducing, because the cells, which created it, were decomposing. In the inflammation area substances, such as lactic acid were accumulated, which caused development of acidosis; After 48 hours, on account of the monocytes migrated from blood-vessels, the production of macrophages was stimulated and the neutrophilic leukocytes were replaced. The aforesaid

processes are characteristic for acute inflammation. During this period the adhesion of cells was observed on the surface of the implant. By Day 4-5, the macrophages divided the implant from the surrounding tissue. We think, that this was pre-requisite for creating the granulation tissue. After one month the fibroblasts were accumulated around the implant and the process of creating the capsule of connective tissue around the implant was starting. It was rich with the capillary network and isolated the implant from surrounding tissues. Therefore, we can assume, that within the first 24 hours of the modelling the defect, that necrotic areas of the bone tissue were observed in the cavity.

After 1 month of modelling, that regeneration process around the defect was started, through which trabecular bone was developed, which was so weak, that it didn't have the possibility to have any functional burden. The next stage – adhesion – i.e. creation of laminar bone, which filled the space between the implant and the bone (osteointegration).

This already is fully developed, firm bone, which was the ability to endure the burden of mastication process. Approximately 18 weeks is needed for its' formation. In the same period immune-histo-chemical

research showed intense expression of the cell proliferation marker (Ki-67).

As the implemented researched showed us, if we don't comply with the envisaged terms, the necrotic areas of the tissue around the implant will be developed and therefore the implant will start to move, which means the incomplete development of osteointegration. The instant insertion of the dental implant in the anat tooth socket after the extraction of the tooth, causes inflammation, which is depicted in activation of the non- clear reparation processes in the bone tissue and continues from 3 to 6 months. Osteogenesis is developed more intensively after 8 months from implantation.

The results of the fourth series of experiments

In the fourth series of the experiments, after 24 hours from the modelling, in the soft tissue surrounding the mandible bone defect, swelling, hyperemia and infiltration was noticeable. On the third day acute inflammation of the tissue was clearly manifested. This reaction was developed as a response to the damage of the tissue as a result of the surgery and also, implantation of the decellularized bone mineral. In the collagen fibers the changes of the fibril structure and overall architectonic changes occurred.

On the 4th day after modelling a defect, surrounding tissues showed signs of positive dynamic, through morpho-functional changes. Swelling of stratified epithelium and intercellular space was reducing. On the 6-7th day after implantation, the level of infiltration of the inflammation in the connective tissue of the gum was reduced and it was slowly turning into microphage- fibroblastic phase. In the papillary stratum new, fusiform blood-vessels containing endotheliocytes were produced. During the later period the multi-layered flat liver epithelium architectonic and structure was completely restored, no inflammatory infiltration was observed in the connective tissue. The main composition of the cells were fibroblasts.

On the 5-7th day, the examination of the bone defect and the titan-bone conglomaret inserted in it showed, that the capsule was formed, which was on the stage of forming the granulation tissue. Around the conglomerate the proliferation of fibroblasts was actively continued. The starting macrophage reaction was not decreasing, but increasing, because the macrophages and gigantic cells tried to phagocyte and resorb the decellularized bone matrix (which has the transmitting function of the bone tissue during the aimed regeneration in the defect area).

Despite the fact, that the bio-materials were considered as biocompliant, the form in which we used it ("titan-bone matrix) affected the reaction of the tissues. It was established, that the local reaction to the biomaterials is depended on the overall characteristics of the materials, such as its' form, index of the implant to the surface area of the biomaterial. On the 15th day from he start of the experiment, after the examination of the low jaw fragment implanted with bone matrix and titanium implant, it was established, that the implant was covered with connective tissue. It is clear, that 2 weeks after the operation, the high level of fenestration of the bone matrix and coarser surface, also the existence of the titanium implant, enabled the active migration of fibroblasts and formation of the connective tissue. Besides this, the fenestration of the bone matrix created good conditions for effective vascularisation. The characteristic of these terms was that the surface of the titanium implant was divided within the bone matrix and didn't create a unified conglomerate with it. It is noteworthy, that the titanium implant didn't cause inflammatory reaction in the tissue surrounding it. After 30 days of implantation, the titanium implant and the bone matrix created a united system. On the 60th day, the examination of macro-specimen showed, that the

titanium implant was tightly welded to the bone matrix. The spaces between the granules was filled with semi-transparent bone substances. After the probing its' solid structure was observed. On 60th day the titan-bone conglomerate was tightly attached to the walls of the defect and there was no visual border observed between the two.

On the 2-3rd day the perivascular osteogenic cells and osteoblasts were observed on the surface of the bone matrix, which created the osteoid layer, which indicated the osteoinductive nature of the bone matrix. On 8-10th day the areas around the bone matrix were visualised, where the processes of formation of active apposition bone and neo- angiogenesis processes were observed. On 18-20th day, on the place of implantation the strong proliferation of the connective tissue was observed, which was depicted in active in-growth of young fibroblasts into the structure of the bone matrix. Defective zone was fully filled with young connective tissue of the recipient, in which reticulofibrosal bone tissue areas could be seen.

On the 28th-30th day small amount of active fibroblasts could be observed in the new connective tissue that filled up defective area. This indicated that formation of new (young) bone tissue started.

This new cells formed themselves along existent bone tissue of the recipient around defective area and represented slightly round cell with light cytoplasm and dark nucleus. On the 40th day alongside connective tissue proliferation vascular net started forming itself. On the periphery of the bone matrix row of active osteoblasts have originated, this was connected to the formation of new immature reticulofibrosal bone tissue. Within regeneration area active macrophages and big amount of osteoclasts were found, that were intensely resorbing thin septums of immature reticulofibrosal bone tissue.

In some areas bone matrix was substituted by connective tissue that was surrounded by lamellar bone tissue. osteoblast and osteoclast rows, that through creation of osteons were reforming and organising bone tissue, were found in the new formed bone crevasses.

On the 80th day bone matrix was represented by mature lamellar bone tissue. Which had osteoic structure with spongiform tissue and cortical plate.

After the detachment of periosteum connective tissue fibers, small and medium blood vessels were clearly visualized. Which were grown into the pores of bone matrix not only form periosteum, but as well from the edges of the defect. In the same period

immune- histo-chemical research showed intense expression of the cell proliferation marker (Ki-67).

Conclusions

1. The natural mineral bone matrix developed by us, represents the non- organic, macro and micro bone structure analogue to the human trabecular bone tissue.
2. The large scale of the pores and the natural mineral composition stimulates the development of new bone tissue and its' fusion with the implant;
3. The mineral has osteoconductive structure and it is possible to produce it as granules, powder or blocks.
4. Due to the natural origin of the natural bone matrix, the latter can be considered as chemically and structurally compliant with the human mineral bone;
5. The effectiveness of decellularized, lyophilic natural bone matrix with the view to increase the volume of the bone tissue, is studied through observing the animals and with use of radiological, morphological, histochemical research methodology.
6. The natural bone matrix created by us can be used as an alternative to autogenetic bone during covering various bone defects.

Practical Recommendations

The bone mineral (BIO-OSS) and biotolerant bone matrix can be used for covering the bone defects and bone augmentation in following cases: Augmentation/Reconstruction of basal ridge; suturing the tooth socket after the extraction of the tooth. It can also be used in implantology, while preparing the area for insertion of an implant, suturing the bone cavities and during sinus lifting; in parodontics; suturing the bone defects; in oral surgery; for reconstruction of bone defects and in orthopaedics, for restoring the large-size bone defect.