

Статья

Коллагенизированные свиные гетерологичные костные трансплантаты: гистоморфометрическая оценка степени регенерации кости при использовании остеопластических материалов, обладающих различными физико-химическими свойствами, в области дефекта трубчатой кости кролика

Руи И. Фалачо¹, Пауло Ж. Пальма^{2,3,*}, Джоана А. Маркес², Мария Х. Фигейредо⁴, Франсиско Карамело⁵, Изабель Диас^{6,7,8}, Карлос Вьегас^{6,7,8} и Фернандо Герра^{1,3,9}

1 Институт оральной имплантологии и протезирования, Медицинский факультет, University of Coimbra, 3000-075 Коимбра, Португалия; rifalacho@fmed.uc.pt (R.I.F.); fguerra@ci.uc.pt (F.G.)

2 Институт эндодонтии, Медицинский факультет, University of Coimbra, 3000-075 Коимбра, Португалия; joanaamarques@uc.pt

3 Центр инноваций и исследований в области оральных наук (CIROS), Медицинский факультет, University of Coimbra, 3000-075 Коимбра, Португалия

4 Кафедра стоматологии, Медицинский факультет, University of Coimbra, 3000-075 Коимбра, Португалия; mhfigueiredo@fmed.uc.pt

5 Коимбрский институт клинических и биомедицинских исследований (iCBR), Лаборатория биостатистики и медицинской информатики (LBIM), Медицинский факультет, University of Coimbra, 3000-548 Коимбра, Португалия; fcaramelo@fmed.uc.pt

6 Кафедра ветеринарных наук, Школа сельскохозяйственных и ветеринарных наук, University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), 5000-801 Вила Реал, Португалия; idades@utad.pt (I.D.); cviagas@utad.pt (C.V.)

7 Центр исследований и технологий агроэкологических и биологических наук, CITAB-UTAD, 5000-801 Вила Реал, Португалия

8 ICVS/3B's – PT Государственная лаборатория, Braga/Guimarães, Portugal 3B's исследовательская группа, 3B's – Научно-исследовательский институт биоматериалов, биоразлагаемых материалов и биомиметики, University of Minho, Штаб-квартира Европейского института передового опыта в области инженерии тканей и регенеративной медицины, 4805-017 Гимарайнш, Португалия

9 Лаборатория твердых тканей, Кафедра стоматологии, Медицинский факультет, University of Coimbra, 3000-075 Коимбра, Португалия

* Корреспонденция: ppalma@uc.pt; Tel.: +351-239-249-151

Аннотация: Коллагенизированные остеозамещающие костные материалы свиного происхождения обладают osteoconductive свойствами. При разработке различных составов основной целью является усиление регенерации костной ткани. Целью данного исследования является оценка степени заживления дефектов губчатой кости кролика при трансплантации гетерологичных кортикально-губчатых остеопластических материалов свиного происхождения, обладающих различными физико-химическими свойствами. У каждого из двадцати шести взрослых самцов новозеландских белых кроликов было сформировано по два дефекта бедренной кости критического размера (всего дефектов $n = 52$). После рандомизации в данные дефекты добавляли один из пяти испытуемых материалов (Apatos[®], Gen-Os[®], mp3[®], Putty и Gel 40). Животных умерщвляли через 15 и 30 дней после хирургической операции. Был проведен качественный и количественный (процентное соотношение новообразованной костной ткани,

частиц и соединительной ткани) гистологический анализ. В ходе проведения гистоморфометрического исследования были обнаружены статистически значимые различия между группой mp3 и группами Putty и Gel 40 по всем оцениваемым параметрам, независимо от времени, прошедшего с момента проведения хирургического вмешательства ($p < 0,05$). Кроме того, через 30 дней после трансплантации наблюдались статистически значимые различия по процентному содержанию частиц между группами Apatos и Putty ($p = 0,014$) и Gel 40 ($p = 0,007$). В каждой группе в отношении восстановления объема костной ткани после добавления материала mp3[®] наблюдались значительные изменения ($p = 0,028$) к 30-му дню ($52,49 \pm 11,04\%$) по сравнению с 15-м днем ($40,93 \pm 3,49\%$). Кроме того, данные внутригруппового анализа количества частиц материала (в %), свидетельствуют о значительном уменьшении площади, занимаемой частицами, с 15-го по 30-й день в группах mp3 и Gen-Os ($p = 0,009$). Все три материала (mp3[®], Gen-Os[®] и Apatos[®]) показали обнадеживающие результаты с точки зрения формирования новой костной ткани, таким образом, данные материалы могут использоваться в качестве альтернативных средств для стимулирования процесса регенерации кости.

Ключевые слова: костная пластика; регенерация кости; коллагенизированная кость; гистоморфометрия; костный трансплантат свиного происхождения; экспериментальная модель на кроликах

1. Введение

В настоящее время одной из наиболее актуальных проблем медицинской реабилитации в стоматологии является восполнение объема утраченной или резорбированной костной ткани для восстановления функциональных и эстетических свойств зубочелюстной системы [1,2]. Для устранения костных дефектов применяется несколько хирургических методов и типов остеозамещающих материалов или «заменителей кости». Согласно последним литературным данным, ни один из методов не выделяется с точки зрения клинической эффективности, и метод лечения должен подбираться индивидуально в зависимости от конкретного диагноза [3–5]. Было доказано, что несколько методов костной пластики являются безопасными, подкреплены убедительными данными клинических исследований и могут успешно применяться стоматологами-хирургами [6–12].

Остеозамещающие материалы состоят из биоматериала биологического или синтетического происхождения, предназначенного для имплантации человеку с целью восполнения объема костной ткани, укрепления костной структуры или заполнения и восстановления костных дефектов [12,13]. Доступные в настоящее время материалы для костной пластики происходят в основном из четырех разных источников: от самого человека (аутогенные трансплантаты), от другого донора, принадлежащего к тому же виду (аллогенные трансплантаты), от доноров, принадлежащих к другому виду (ксеногенные трансплантаты), или являются синтетическими материалами (аллопласты). Все типы биоматериалов для костной регенерации имеют недостатки, связанные, среди прочего, с реакцией хозяина на трансплантат (иммунные ответы), доступностью, свойствами, приобретаемыми после осуществления всех производственных процессов, быстрой резорбцией [14,15].

В настоящее время выбор материала для того или иного вмешательства производится с учетом нескольких факторов, таких как: характеристики самого материала, тип костного дефекта, подлежащего лечению, предпочтения хирурга, сопутствующие расходы и предпочтения

пациента. Спектр клинических ситуаций широк, и конкретный остеозамещающий материал не может использоваться в качестве универсального средства — необходимо учитывать характеристики и свойства материала, а также его состав и лекарственную форму, которые могут наилучшим образом подходить для лечения определенного пациента. Несмотря на то, что аутотрансплантация по-прежнему считается «золотым стандартом», когда речь идет о восстановлении костных дефектов [16,17], клинический успех не гарантирован, и осложнения [18] могут возникать в 8–39 % случаев [19]. Основными недостатками данного типа трансплантатов являются: непредсказуемость паттерна его резорбции, необходимость проведения второй операции для изъятия донорского материала и объем донорских тканей, который может оказаться недостаточным для заполнения некоторых дефектов [20–22]. Аллотрансплантаты проявляют остеоиндуктивную и остеокондуктивную активность, но не обладают остеогенными свойствами, поскольку в состав этих костных трансплантатов не входят жизнеспособные клетки [18,23,24]. Ксеногенные костные трансплантаты представляют собой остеозамещающие материалы, полученные от донора другого биологического вида. Они широко используются в качестве альтернативы как аутогенным, так и аллогенным трансплантатам. Эти материалы не считаются ни остеоиндуктивными, ни остеогенными, но обладают остеокондуктивным потенциалом. В некоторых работах обсуждается, может ли эта классическая точка зрения по-прежнему применяться к новым видам ксенотрансплантатов, или они могут обладать остеоиндуктивными свойствами [25,26]. В настоящее время большинство используемых ксенотрансплантатов имеют свиное и бычье происхождение. Это объясняется сходством получаемых тканей с тканями человека по химическому составу и структуре [23]. Ксенотрансплантаты свиного происхождения часто выступают в качестве объекта многочисленных клинических исследований, направленных на оценку их способности выполнять роль остеозамещающего материала, поскольку их получают от животных, генотип которых близок к человеческому. Результаты различных исследований показали, что такие материалы могут выступать в качестве остеокондуктивной матрицы [26,27]. Данные, полученные Nannmark и соавт. [28], подтвердили достаточно высокую биосовместимость и хорошие остеокондуктивные свойства свиной кости.

Применение недеминерализованных образцов костной ткани и гистоморфометрических методов коренным образом изменили представление о структуре и физиологии костной ткани [29,30]. Фактически, гистоморфометрия является одним из важнейших инструментов для оценки состояния костной ткани и имеющихся в ней изменений, а также для оценки механизмов и последствий воздействия испытываемых материалов на костную ткань, предоставляя полезные данные о структуре, формировании, резорбции, минерализации, а также о процессах моделирования и ремоделирования кости [30–32]. Данный метод хорошо подходит для проведения доклинических исследований с использованием животных моделей, которые могут предоставить важную гистологическую информацию при применении соответствующих экспериментальных методик. При изучении новых материалов или лекарственных форм предпочтение отдается исследованиям с использованием животных моделей, к которым, в частности, и относится экспериментальное исследование, описанное в этой статье. Оно было направлено на проведение испытаний новых форм остеозамещающих материалов свиного происхождения [33]. Что касается выбора подходящей животной модели, наиболее часто используемыми видами в медицинских исследованиях являются кролики. Они составляют примерно 35 % от всех экспериментальных животных, привлекаемых для проведения исследований с оценкой изменений костно-мышечной системы [34,35]. Простые правила

содержания кроликов и сходный с человеком метаболизм костной ткани делают их животными первого выбора для проведения оценки свойств материалов для костной пластики [35, 36].

В настоящее время выбор материала для того или иного вмешательства производится с учетом нескольких факторов, таких как: характеристики самого материала, тип костного дефекта, подлежащего лечению, предпочтения хирурга, удобство и простота использования материала, сопутствующие расходы и предпочтения пациента. В настоящем исследовании основное внимание уделяется анализу результатов применения новых составов ксенотрансплантатов свиного происхождения, причем некоторые из них представлены в формах, которые могут облегчить работу с материалом и его применение с возможным повышением эффективности, что будет оценено по итогам проведения гистологических исследований.

Основной целью настоящего исследования являлось проведение оценки заживления тканей в области дефектов губчатой кости критического размера на латеральной поверхности дистального отдела бедренной кости у кроликов после использования пяти различных гетерологичных кортикально-губчатых остеопластических материалов свиного происхождения, обладающих различными физико-химическими свойствами (Apatos[®], Gen-Os[®], mp3[®], Putty и Gel 40).

Нулевая гипотеза этой экспериментальной работы была сформулирована следующим образом: при применении пяти различных остеозамещающих материалов свиного происхождения будут получены сходные гистологические и гистоморфометрические результаты.

2. Материалы и методы

2.1. Этические аспекты использования животных в исследовании

Протокол данного экспериментального исследования был одобрен национальным регуляторным органом, контролирующим проведение исследований с использованием животных, а также Комиссией по этике Университета Трас-ос-Монтес и Альто-Дору (№ CE 29/2015). Условия содержания животных и манипуляции с ними, а также экспериментальные процедуры и представление данных соответствовали португальскому законодательству, регулиющему использование животных в экспериментальных целях (Декрет №113/2013 от 7 августа 2013 г.), и Директивам Европейского Союза о защите животных, используемых в научных целях (Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г.).

2.2. Дизайн исследования — размер выборки

Расчет размера выборки был выполнен с использованием программного обеспечения G*Power, опираясь на результаты предыдущего исследования, полученные в научной работе Palma и соавт. [37], при этом в качестве единицы измерения был выбран размер дефекта костной ткани. В ходе упомянутого исследования было выявлено, что наименьший размер дефекта ($d = 1,24$) соответствует средней разнице, равной $1,20 \pm 3,35$ % новообразованной костной ткани, и регистрируется через 2 недели. Наибольший размер дефекта ($d = 2,45$) соответствует средней разнице, равной $14,40 \pm 3,80$ %, и определяется через 4 недели.

Были рассмотрены три возможных уровня значимости, $\alpha = 0,01$, $\alpha = 0,05$ или $\alpha = 0,10$. Также были рассмотрены три различных уровня мощности: 0,80 ($1-\beta = 0,80$), 0,90 и 0,95. Для расчета размера выборки также использовали двусторонний t-критерий Стьюдента для независимых выборок и соотношение распределения между группами 1:1.

На основании полученных данных в выборку были включены 26 взрослых самцов новозеландских белых кроликов (*Oryctolagus cuniculus*) весом около $5,2 \pm 0,56$ кг. Выборка была разделена на две серии — 15 и 30 дней по 13 животных в каждой. У каждого животного хирургическим путем было создано по два тестовых участка — они располагались на латеральных поверхностях дистальных отделов бедренных костей, таким образом, в исследовании оценивались изменения тканей в области 52 дефектов, которые и составляли выборочную совокупность.

2.3. Содержание, обращение и уход за животными

Отбор, содержание животных и все манипуляции с ними осуществлялись в виварии Университета Трас-ос-Монтес и Алто-Дору. Общее состояние здоровья животных оценивалось квалифицированными техническими специалистами и ветеринарными врачами того же университета. Каждое животное было зарегистрировано в день прибытия с введением микрочипа с уникальным идентификационным номером. Далее проводилась клиническая оценка состояния и веса животных, а затем они помещались в индивидуальные клетки. Перед любым вмешательством выдерживался карантинный период (не менее 1 недели). Животные содержались в стандартных индивидуальных клетках с поддержанием необходимых параметров вентиляции и соблюдением всех условий содержания животных конкретного вида. На протяжении всего экспериментального исследования животные находились под постоянным наблюдением при стандартных значениях температуры, влажности, воздухообмена и освещенности (12 часов света и 12 часов темноты).

Хирургические процедуры выполнялись в ветеринарной больнице Университета Трас-Монтес и Альто-Дору. Перед проведением операции животных перемещали в специальные предоперационные комнаты для поддержания низкого уровня стресса, аналогичного уровню стресса остальных отобранных животных. После хирургического вмешательства животных переводили в специальные клетки до момента восстановления двигательной и нервной активности, а затем перемещали в соответствующие стандартные клетки без ограничений передвижения. Один раз в день животным давали коммерчески сухой корм с контролируемой концентрацией загрязняющих веществ, согласно данным производителя, доступ к питьевой воде не ограничивался (режим *ad libitum*).

2.4. Экспериментальные группы

Испытуемые материалы были распределены случайным образом с использованием компьютерного алгоритма в отношении животного, анатомического расположения дефекта и последовательности введения, таким образом, количество используемых животных было сведено к минимально возможному значению, необходимому для уменьшения эффектов индивидуальных вариаций.

Испытуемые материалы были распределены по следующим группам (таблица 1):

- Группа Apatos — 100 % гранул из кортикального слоя кости свиньи без коллагена (частицы 600–1000 мкм) (Apatos®, OsteoBiol®, TecnoSS®, Турин, Италия)
- Группа Gen-Os — 100 % гранул из смеси губчатого вещества и кортикального слоя кости свиньи (частицы размером 250–1000 мкм) с коллагеном (Gen-Os®, OsteoBiol®, TecnoSS®, Турин, Италия)
- Группа mp3 — 90 % гранул из смеси губчатого вещества и кортикального слоя кости свиньи (предварительно гидратированные частицы размером 600–1000 мкм) с

- коллагеном и 10 % коллагенового геля (mp3[®], OsteoBiol[®], Tecnos[®], Турин, Италия)
- Группа Putty — 80 % гранул из смеси губчатого вещества и кортикального слоя кости свиньи (микронизированные частицы < 300 мкм) с коллагеном и 20 % коллагенового геля (Putty, OsteoBiol[®], Tecnos[®], Турин, Италия)
 - Группа Gel 40 — 60 % гранул из смеси губчатого вещества и кортикального слоя кости свиньи с коллагеном (микронизированные частицы размером < 300 мкм) и 40 % коллагенового геля (коллаген I и III типов) (Gel 40, OsteoBiol[®], Tecnos[®], Турин, Италия)

Таблица 1. Распределение испытуемых материалов.

Материал	Временной промежуток	
	15 дней	30 дней
Apatos [®]	5 дефектов	5 дефектов
Gen-Os [®]	5 дефектов	5 дефектов
mp3 [®]	5 дефектов	5 дефектов
Putty	5 дефектов	5 дефектов
Gel 40	5 дефектов	5 дефектов
Контрольный	1 дефект	1 дефект
Итого	26 дефектов	26 дефектов

2.5. Анестезия

Перед проведением анестезии, первый этап которой включал в себя введение медетомидина (0,15 мг/кг п/к) и буторфанолола (0,1 мг/кг в/м), животных не кормили в течение 12 часов, оставляя при этом свободный доступ к питьевой воде. Через пятнадцать минут после введения указанных препаратов и определения локализации краевой ушной вены выполняли местную трихотомию, а затем животным медленно вводили кетамин (5 мг/кг в/м или в/в). После указанных манипуляций выполняли установку эндотрахеальной трубки (эндотрахеальная интубация) для контролируемого поддержания состояния глубокого медикаментозного сна с помощью непрерывной ингаляции изофлурана (0,25–2 %) в потоке кислорода (0,5–2 л/мин/кг). Мониторинг состояния животного во время хирургической операции осуществлялся с использованием неинвазивного оксиметра (контроль частоты дыхательных движений и степени насыщения кислородом гемоглобина), капнографа и аускультации сердца.

Все хирургические манипуляции проводились в соответствии со стандартными правилами асептики и антисептики, применяемыми в хирургическом отделении Ветеринарной больницы Университета Транс-Монтес и Альто-Дуро.

2.6. Протокол хирургического вмешательства

После проведения трихотомии в области хирургического вмешательства животное помещали на операционный стол с функцией подогрева и поддержания постоянной температуры в боковом положении, проводили иммобилизацию нижней конечности путем подвешивания без чрезмерного давления для облегчения проведения процедур дезинфекции, обеспечения доступа к операционному полю и осуществления действий для поддержания его стерильности. Далее два хирурга подготавливали операционный стол, дезинфицировали операционное поле раствором повидон-йода (Betadine[®], Mylan, Лиссабон, Португалия) и обеспечивали поддержание асептических условий во время проведения операции. Во время

хирургического вмешательства обнажалась только зона для проведения необходимых манипуляций.

Операции выполняли одновременно на обеих задних конечностях. Делался кожный разрез на латеральной поверхности голеностопного сустава, над дистальным отделом бедренной кости. Рассечение производилось в одной плоскости с помощью диссекционных ножниц и инструментов. На уровне удерживателя сухожилий мышц голени делался надрез на широкой фасции бедра (*fasciae latae*) с последующим медиальным вывихом надколенника, при этом латеральная широкая мышца бедра (*m. vastus lateralis*) удерживалась краниально, а двуглавая мышца бедра (*m. biceps femoris*) отводилась каудально для обнажения латерального мыщелка бедренной кости. Для рассечения надкостницы использовали скальпель, а для обнажения поверхности кости — периостальный элеватор.

Затем на каждом участке исследования ($n = 52$), на латеральных поверхностях дистальных отделов бедренных костей обеих конечностей, моделировали дефект костной ткани эпифиза цилиндрической формы и критического размера (5 мм в диаметре на 10 мм в глубину). Формирование дефекта проводили в дистолатеральной области голеностопного сустава без ущерба для медиальной кортикальной пластины и биомеханики сустава. Объем материала, помещенного в каждый костный дефект, составлял приблизительно 0,2 см³ ($V = \pi r^2 h$).

Использовался только один отрицательный контроль на группу, поскольку костные дефекты критического размера уже достаточно хорошо изучены и описаны в научной литературе, соответственно, не требовалось проводить валидацию модели и увеличивать количество животных, используемых в исследовании [38,39].

Испытуемые материалы группы Aratos и группы Gen-Os смачивались физиологическим раствором. Все остальные испытуемые материалы предварительно гидратировали в пробирке; таким образом, проводить дополнительную гидратацию не требовалась. После обильного орошения костного дефекта физиологическим раствором для удаления остатков кости испытуемые материалы аккуратно помещали в область дефекта, плотно заполняя его, но избегая чрезмерной конденсации (рис. 1a–e). Материалы для заполнения дефекта выбирались в соответствии с рандомизацией. Чтобы избежать или минимизировать смещение материала, а также с целью максимально точного моделирования клинических ситуаций, поверх заполненного костного дефекта с перекрытием его краев накладывали предварительно контурированную и увлажненную мембрану из перикарда гетерологичного происхождения, содержащую 100 % коллагена (Evolution, OsteoBiol[®], TecnoSS[®], Турин, Италия) (рис. 1f).

Ушивание мягких тканей для каждого хирургического участка выполнялось послойно с целью максимального закрытия раны и обеспечения оптимальной регенерации, а также для фиксации биологического материала в области дефекта. На надкостницу и мышечные слои накладывались рассасывающиеся швы, а на кожу — нерассасывающиеся швы.

2.7. Послеоперационный уход

Сразу после операции для купирования болевых ощущений животным вводили дозу буторфанола тартрата (0,2 мг/кг, п/к, 2 дня). Также вводилась однократная доза амоксициллина пролонгированного действия (1 мг/кг, п/к).

Животных помещали в индивидуальные клетки для восстановления, расположенные в темном, тихом, удобном, чистом месте с контролируемой температурой. В клетках не содержалось каких-либо предметов или материалов, которые потенциально могли бы причинить вред животным при их попытках начать перемещения. При необходимости для

поддержания температуры тела животных использовали теплоизолирующие материалы. После возвращения сознания и восстановления двигательной активности и прекращения действия анестезирующих препаратов, животных переводили в их стандартные клетки без ограничения перемещений и со свободным доступом к пище и воде. Для оценки любых изменений в потреблении пищи или воды, массы тела, типичных этологических моделей вида и выявления наличия аномальных признаков или нежелательных реакций, а также болевых ощущений ежедневно проводился мониторинг состояния животных.

2.8. Эвтаназия и аутопсия животных

В конце каждого экспериментального периода (через 15 и 30 дней после хирургической операции) животных умерщвляли индивидуально, в изолированном помещении, без предоставления доступа к другим животным, путем введения смертельной дозы кетамина гидрохлорида. Для оценки системного воздействия исследуемых биоматериалов проводилось вскрытие умерщвленных животных. После проведения макроскопического анализа фрагменты основных органов (сердце, печень, легкие, почки, селезенка и региональные лимфатические узлы) были собраны и подготовлены для дополнительных исследований. Трупы и отходы эвтаназии впоследствии сжигались с соблюдением требований действующего законодательства.

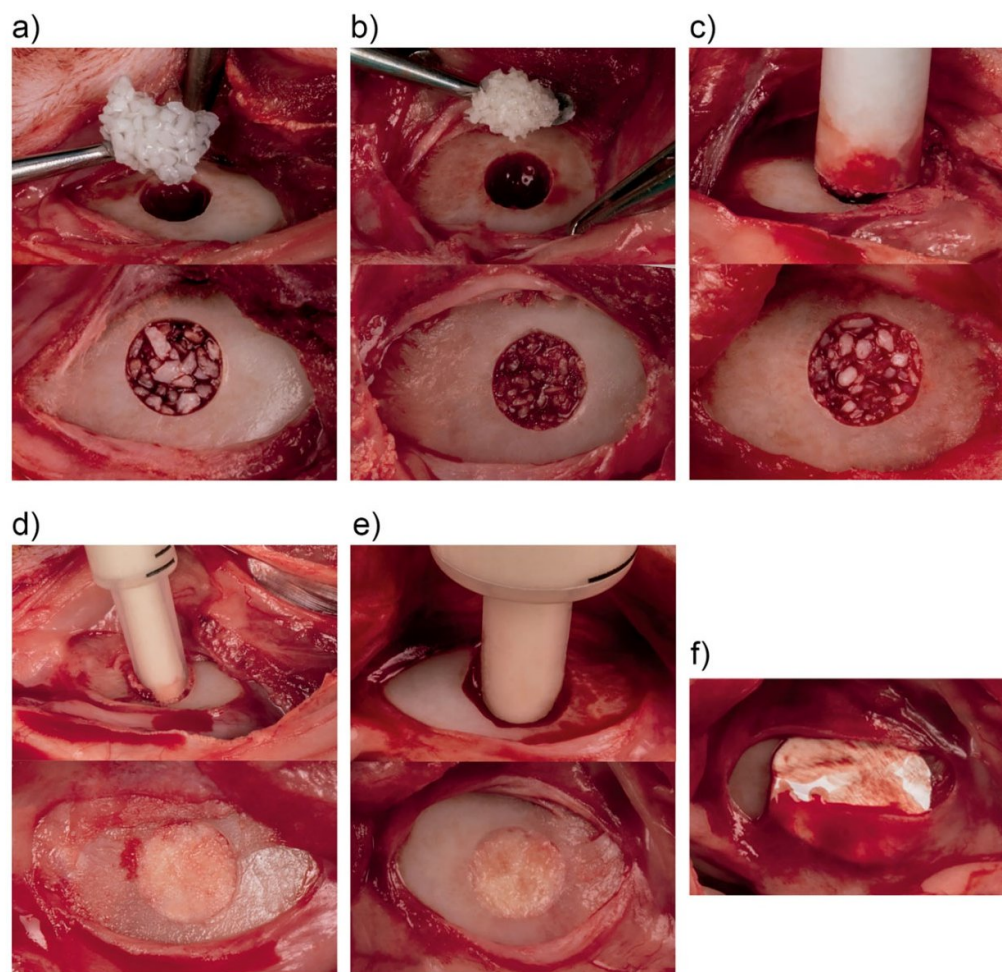


Рисунок 1. Интраоперационная фотография размещения материала: (a) Apatos[®]; (b) Gen-Os[®]; (c) mp3[®]; (d) Putty; (e) Gel 40; (f) мембрана Evolution.

2.9. Сбор исследуемого материала

После тщательного рассечения мягких тканей образцы для исследований извлекались единым блоком. Изготовление гистологических препаратов из отобранных образцов производилось с использованием методики, не предусматривающей проведение предварительной декальцинации. Таким образом обеспечивалось высокое качество гистологических изображений, без морфологических искажений соответствующих структур или появления значимых артефактов. Приготовление срезов осуществлялось с помощью высокоточной системы Exakt® (Exakt Technologies, Оклахома-Сити, штат Оклахома, США). Для окрашивания препаратов использовали толуидиновый синий.

2.10. Подготовка образцов и анализ данных

В ходе исследования проводили качественный и количественный анализ гистологических препаратов, изготовленных из отобранных образцов. Срезы тканей, полученные в результате гистологической обработки, изучали при помощи стереомикроскопа (Nikon® SMZ 1500, Токио, Япония) и оптического микроскопа (Nikon® Eclipse E600, Токио, Япония), позволяющих осуществлять фотографическую регистрацию увеличенных изображений. Качественный анализ проводился главным образом для изучения и регистрации гистоморфологических характеристик ткани, исследования линии контакта костной ткани и биоматериала, а также выявления признаков воспалительного процесса. Количественный гистологический анализ (гистоморфометрия) проводился с помощью программного обеспечения для анализа изображений Bioquant® Nova (Bioquant—Image Analysis Corporation, Нэшвилл, штат Теннесси, США), которое позволяет определять площадь различных тканей на основании изменения цвета окрашенных структур. Все процедуры калибровки проводились одним оператором в соответствии с методикой, описанной в научной литературе [40].

2.11. Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием коммерчески доступного программного обеспечения IBM® SPSS® v24 и MS® Excel®. Уровень значимости был установлен как $\alpha = 0,05$. Первоначально описание результатов было выполнено с указанием среднего значения, стандартного отклонения, максимальных и минимальных значений измеряемых параметров (объем новообразованной костной ткани, соединительной ткани и количество частиц материала) для каждого биоматериала и временного периода. Кроме того, при анализе результатов с применением методов описательной статистики выполнялось построение диаграмм дисперсии для каждого оцениваемого параметра. Для выявления значительных различий между медианами исследуемых выборок использовали непараметрические критерии Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни. Впоследствии после расчета критерия Краскела–Уоллиса была проведена ретроспективная оценка по методу Данна–Сидака с поправкой на множественные сравнения. Следует отметить, что, хотя измерения проводились в два разных периода времени, использовались разные лабораторные животные, поэтому в рамках анализа применяли критерии для независимых выборок.

Данный отчет составлен в соответствии с Руководством по проведению исследований на животных: отчеты об экспериментах *in vivo* (Руководство ARRIVE) [39].

3. Результаты

3.1. Клинические проявления

Послеоперационный период протекал без осложнений, системных или местных нежелательных явлений, связанных с проведением оперативного вмешательства, выявлено не было. Быстрое восстановление животных с правильным формированием нормальных поведенческих реакций подтвердило уменьшение влияния экспериментального протокола на здоровье и благополучие животных. В ходе макроскопического исследования извлеченных *en bloc* фрагментов бедренных костей не было выявлено каких-либо морфологических изменений или наличия воспалительных процессов, выходящих за рамки ожидаемых и возникающих в результате проведения хирургического вмешательства. При проведении гистопатологического анализа собранных органов не было выявлено каких-либо патологических изменений.

3.2. Качественный гистологический анализ

3.2.1. Группа Apatos

Результаты, полученные при анализе поперечных срезов костных дефектов, свидетельствует о том, что структурные изменения протекали последовательно, по направлению от периферии к центру дефекта, при этом трабекулы формирующейся костной ткани прорастали в толщу материала, интегрируя его частицы со стенками костного дефекта, а также вызывая образование связей между частицами. Через 30 дней можно было обнаружить большие участки незрелой костной ткани, а также пластинчатые трабекулы и увидеть признаки интенсивного процесса костеобразования, что указывает на продолжающийся процесс ремоделирования кости (рисунок 2).

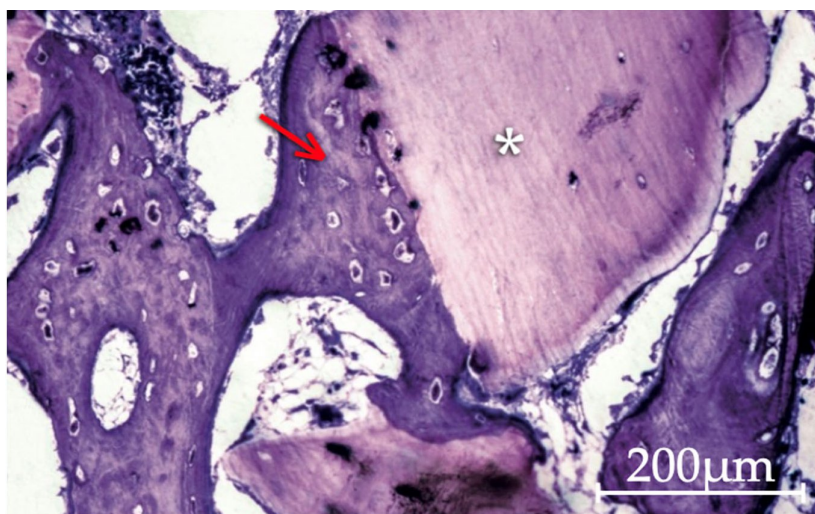


Рисунок 2. Частицы материала Apatos® (отмечены звездочкой) с незрелой костной тканью (показано стрелкой), образовавшейся в зоне контакта с поверхностью биоматериала через 15 дней. Фрагменты дезорганизованной соединительной ткани, занимающие большую часть пространства, образующегося между частицами материала, все еще видны (200-кратное увеличение).

3.2.2. Группа Gen-Os

Во всех анализируемых срезах тканей в области костных дефектов наблюдалась заметная и интенсивная остеокластическая активность. Также часто выявлялось присутствие значительного количества остеобластов и неминерализованного матрикса (остеоида), что объясняется остеогенными свойствами материала.

Между препаратами, приготовленными из образцов, отобранных на 15 и 30-й день,

наблюдается явная разница с точки зрения степени ремоделирования костной ткани — на более поздних срезах имеются выраженные участки незрелой костной ткани и присутствие пластинчатых трабекул, которые прорастают в пространства между частицами и замещают сами частицы (рисунок 3).

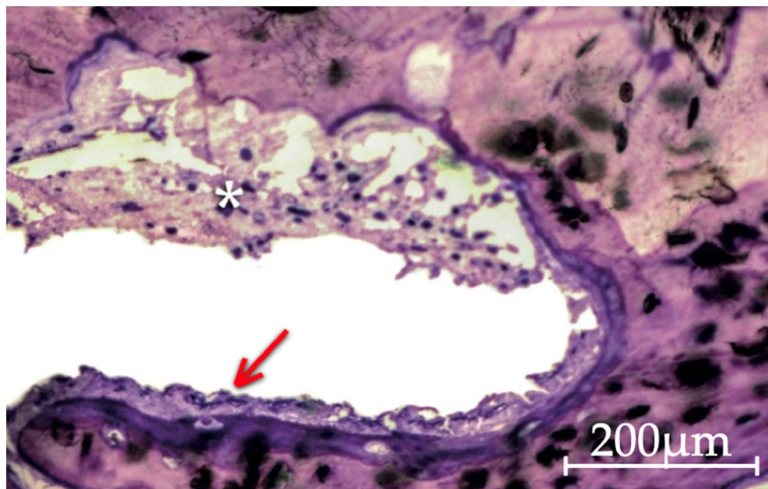


Рисунок 3. Гистологическое изображение тканей, полученное при исследовании образцов группы Gen-Os, отобранных на 30-й день после хирургического вмешательства. Показан процесс резорбции частиц остеозамещающего материала с остеокластами в гаушиповых (резорбционных) лакунах (отмечено звездочкой), вместе с процессами формирования незрелой костной ткани на границе контакта с частицами материала — в данной зоне присутствуют остеобласты и неминерализованный матрикс (остеоид) (показано стрелкой) (200-кратное увеличение).

3.2.3. Группа mр3

На всех поперечных срезах тканей образцов, отобранных из зон костных дефектов, отмечалось интенсивное образование костной ткани с обширными участками, заполненными сетями костных трабекул. Через 15 дней в центральной области дефекта уже наблюдалось образование костной ткани. В обеих временных точках наблюдается наличие костных мостиков, когда новообразованная костная ткань интегрирует и объединяет частицы материала как на периферии, так и в центральной части дефекта. Через 30 дней незрелая костная ткань заменяется на пластинчатую (ее количество преобладает). Интенсивная остеогенная активность регистрируется в обеих временных точках: на срезах присутствует множество активных остеобластов и остеокластов. Об этой активности можно судить по наличию остеобластов (крупные мононуклеарные клетки с овоидным профилем и обильной базофильной цитоплазмой, что свидетельствует о высокой скорости синтеза белка и протеогликанов), часто расположенных в виде отдельных клеточных линий вдоль границы незрелой костной ткани. Данная локализация и свойства клеток позволяют предположить, что остеобласты синтезируют органические компоненты костного матрикса (остеоида) до его минерализации. Также виден клеточно-опосредованный процесс резорбции частиц (рис. 4 и 5).

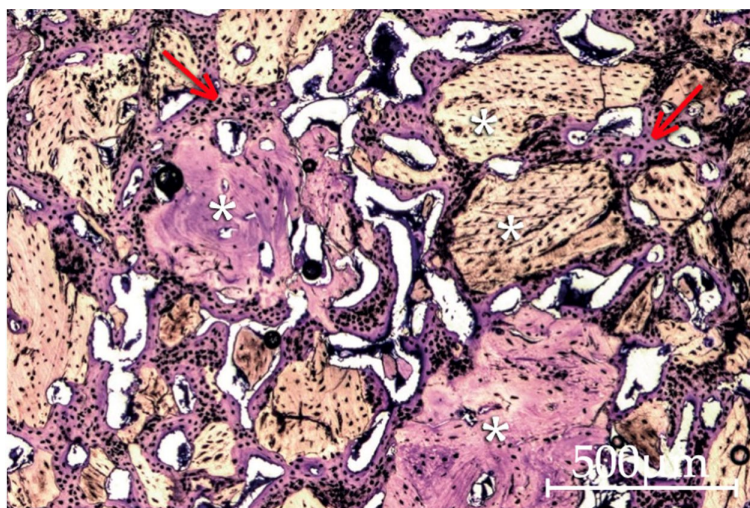


Рисунок 4. Изображение тканей образцов, отобранных в группе mp3 через 30 дней после хирургической операции. Образование обширной сети костных трабекул (показано стрелкой) с интеграцией и объединением частиц остеозамещающего материала (отмечено звездочкой). Также можно заметить определенную неоднородность формы, размеров и окраски частиц материала mp3 (40-кратное увеличение).

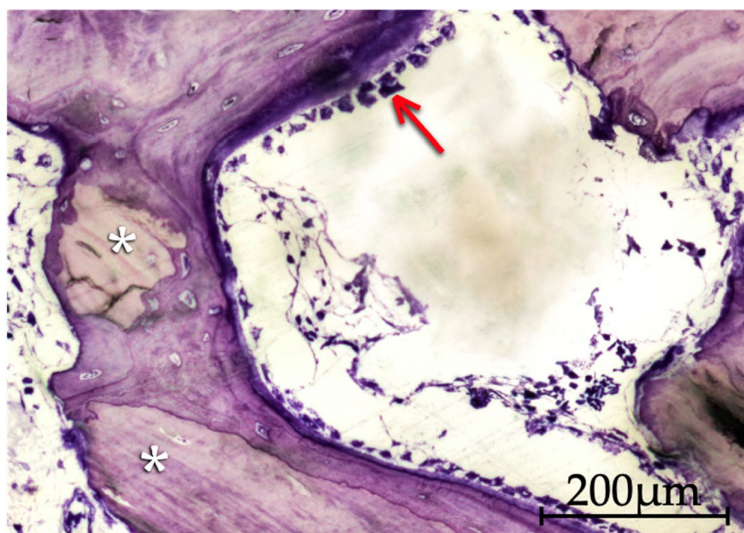


Рисунок 5. Гистологическое изображение тканей образца с частицами материала mp3 на 15-й день после хирургического вмешательства. Частицы окружены новообразованной костной тканью. Наличие значительного количества остеобластов указывает на то, что процесс синтеза все еще продолжается. На изображении видны костные трабекулы, содержащие несколько остеointегрированных частиц (отмечено звездочкой), и периферическая зона с выраженной остеобластической активностью (показано стрелкой) (200-кратное увеличение).

3.2.4. Группы Putty и Gel 40

Результаты, полученные в обеих группах в двух временных точках, практически не отличаются с точки зрения качества костной ткани. Кроме того, для двух указанных материалов характерна дисперсия и миграция частиц. На периферии дефекта на 15 и 30-й день после хирургической операции практически не наблюдается костеобразования.

3.3. Количественный гистоморфометрический анализ

Гистоморфометрический анализ проводился путем исследования тканей на поперечных срезах кости, включающих всю область дефекта, как показано на рисунке 6.

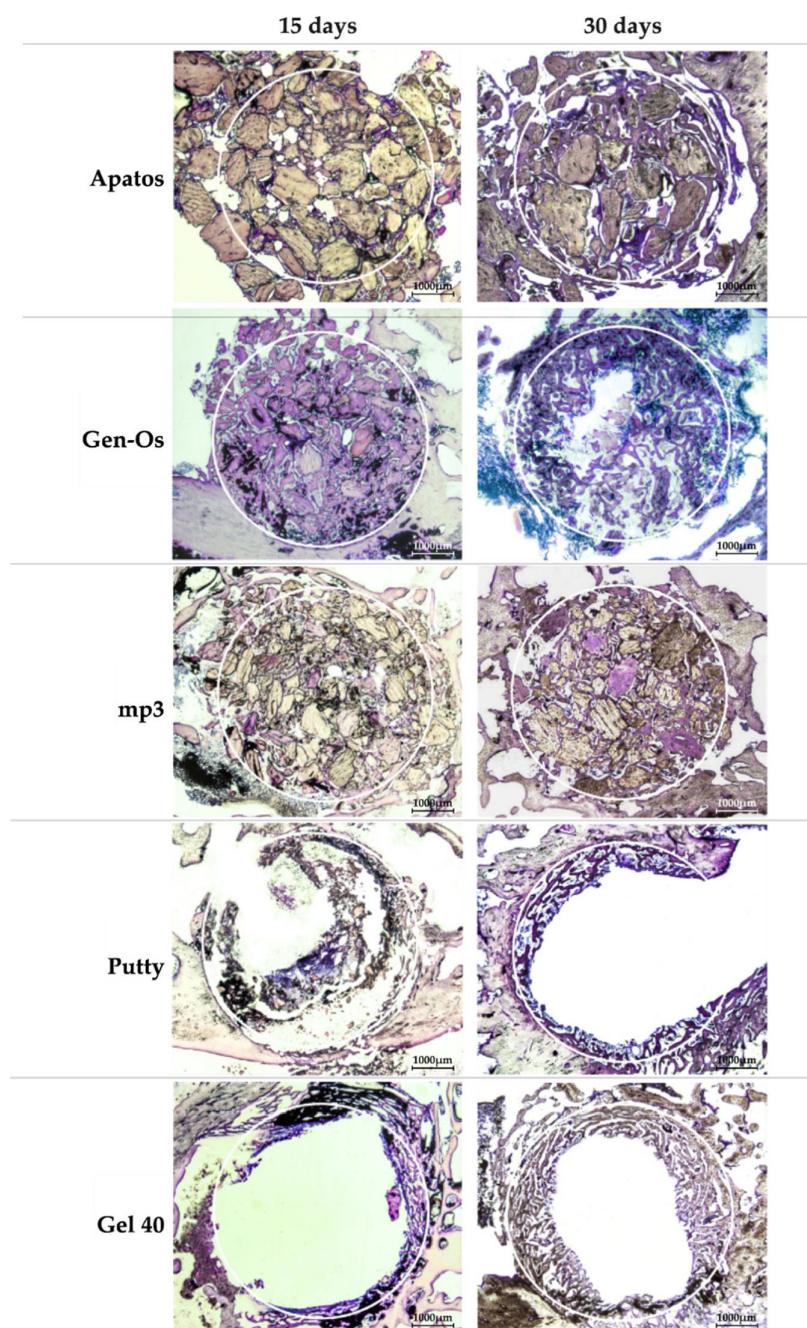


Рисунок 6. Изображения поперечных срезов кости в области расположения дефектов на 15 и 30-й день после внесения испытуемых материалов (15-кратное увеличение).

3.3.1. Анализ данных в пределах каждой группы

При сравнении темпов образования костной ткани во всех группах с 15-го по 30-й день (рисунок 7) было обнаружено, что только в группе внесения материала mp3 отмечаются статистически значимые изменения ($p = 0,028$), при этом доля новообразованной костной ткани к 30-му дню ($52,49 \pm 11,04 \%$) была заметно выше, чем через 15 дней после хирургического вмешательства ($40,93 \pm 3,49 \%$).

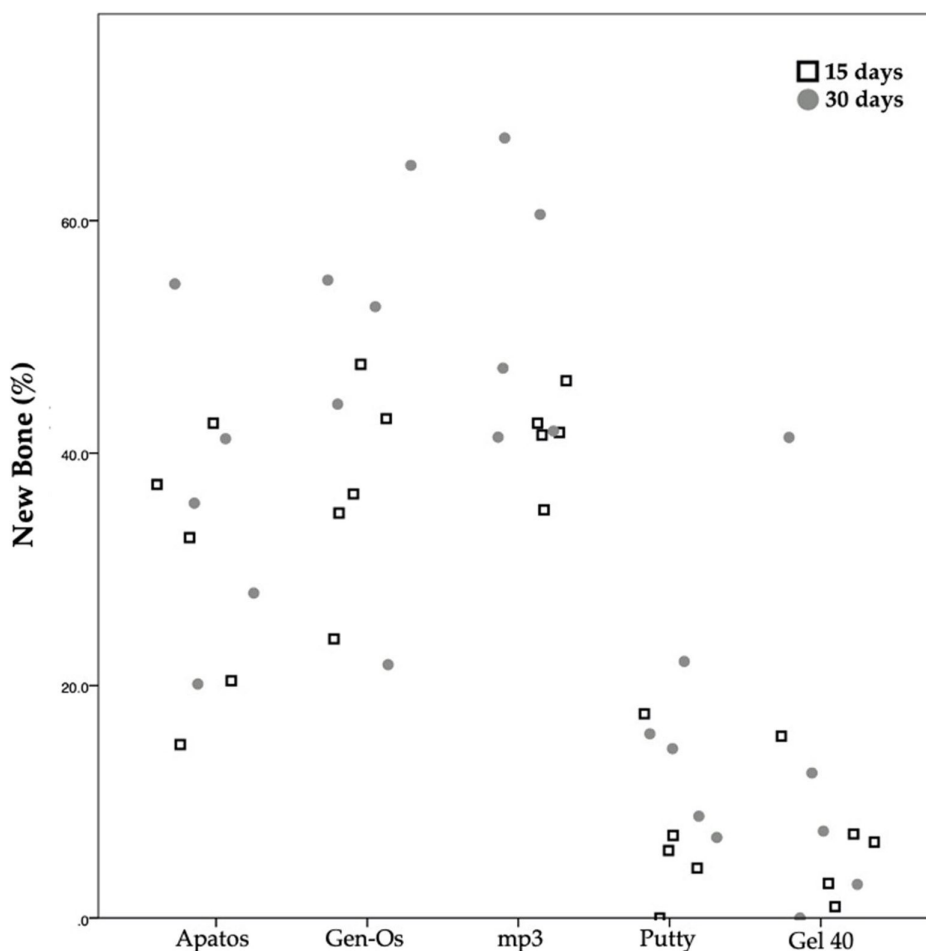


Рисунок 7. Диаграмма рассеяния, отражающая информацию о количестве (%) новообразованной костной ткани в области дефекта после применения различных остеозамещающих материалов (данные приведены для двух временных точек).

Что касается процентного содержания частиц материала в области дефекта через 15 и 30 дней (рисунок 8), статистически значимые изменения отмечаются только в группах mp3 ($p = 0,009$) и Gen-Os ($p = 0,009$): наблюдается уменьшение процента занимаемой площади с 15-го по 30-й день.

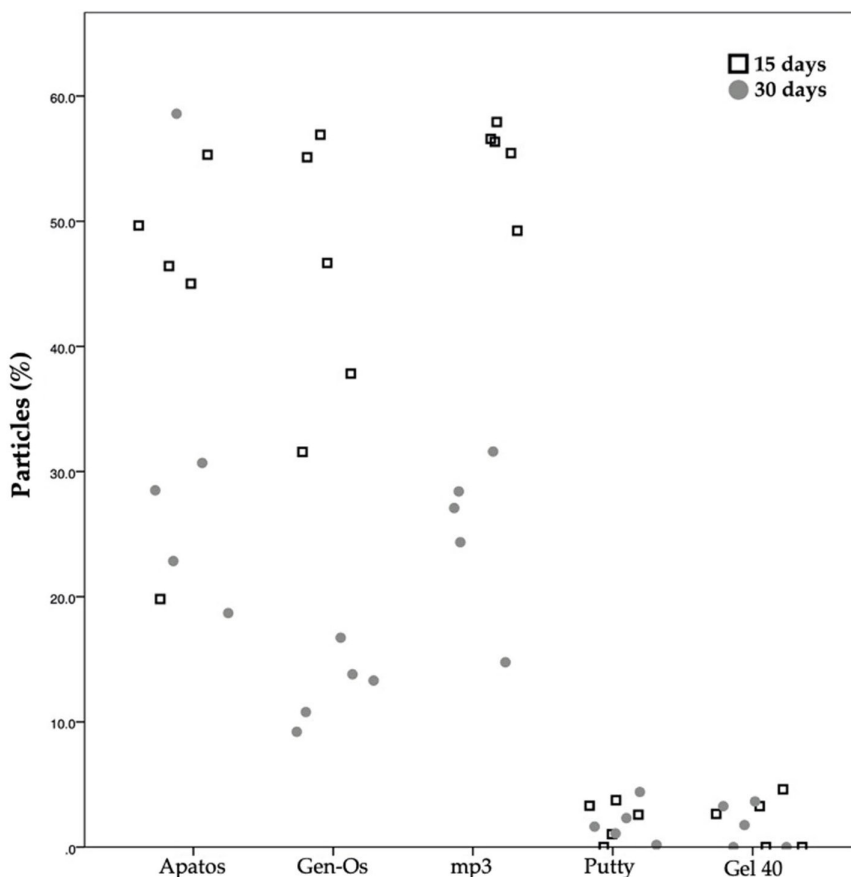


Рисунок 8. Диаграмма рассеяния, отражающая информацию о количестве (%) частиц различных материалов в области дефекта в двух временных точках.

3.3.2. Анализ данных разных групп

При сравнении данных, полученных в разных группах на 15-й день после хирургической операции, было обнаружено, что группа mp3 имела статистически значимые различия с группами Putty и Gel 40, независимо от анализируемого параметра ($p < 0,05$).

При сравнении количества (%) костной ткани, образованной к 30-му дню после хирургической операции (таблица 2), обнаруживаются статистически значимые различия между группой mp3 и группами Putty ($p = 0,035$) и Gel 40 ($p = 0,015$). Что касается процентного содержания частиц (таблица 3), то статистически значимые различия наблюдались между группой mp3 и группами Putty ($p = 0,022$) и Gel 40 ($p = 0,011$), а также между группой Apatos и группами Putty ($p = 0,014$) и Gel 40 ($p = 0,007$).

Принимая во внимание все вышеизложенное, нулевая гипотеза, утверждающая, что пять различных остеозамещающих материалов свиного происхождения будут демонстрировать аналогичные гистологические и гистоморфометрические результаты, отклоняется.

Таблица 2. Сравнение групп по параметру процентного содержания новообразованной костной ткани в обеих временных точках.

15 Дней				
Материал	Apatos	Gen-Os	mp3	Gel 40
Putty	0.505	0.106	0.016 *	1.000
Apatos		1.000	1.000	0.457
Gen-Os			1.000	0.093
mp3				0.014 *
30 Дней				
Материал	Apatos	Gen-Os	mp3	Gel 40
Putty	1.000	0.099	0.035*	1.000
Apatos		1.000	1.000	0.587
Gen-Os			1.000	0.046 *
mp3				0.015 *

*Статистически значимая разница ($p < 0,05$); апостериорный критерий Данна-Сидака с поправкой на множественные сравнения.

Таблица 3. Сравнение процентного содержания частиц в образцах, отобранных в разных группах в обе временные точки.

15 Дней				
Материал	Apatos	Gen-Os	mp3	Gel 40
Putty	0.240	0.135	0.003 *	1.000
Apatos		1.000	1.000	0.371
Gen-Os			1.000	0.215
mp3				0.006 *
30 Дней				
Материал	Apatos	Gen-Os	mp3	Gel 40
Putty	0.014 *	1.000	0.022 *	1.000
Apatos		0.932	1.000	0.007 *
Gen-Os			1.000	0.851
mp3				0.011 *

*Статистически значимая разница ($p < 0,05$); апостериорный критерий Данна-Сидака с поправкой на множественные сравнения.

4. Обсуждение

Данное экспериментальное исследование было разработано с целью определения и оценки потенциала регенерации костной ткани при применении различных остеозамещающих материалов в локализованном костном дефекте. Оценивались составы с изолированными частицами, нуждающимися в гидратации, и новые составы, содержащие различные носители и концентрации частиц.

Несмотря на то, что клеточный ответ на внесение различных биоматериалов был изучен в исследованиях *in vitro*, полученные результаты не могут точно отражать ситуацию *in vivo*. С другой стороны, использование человеческих моделей для оценки регенерации костей имеет некоторые серьезные недостатки, такие как: непрактичность проведения адекватной гистологической оценки, даже в тех случаях, когда может быть выполнена биопсия; проблемы проектирования исследования с удовлетворительной внутренней валидностью [1,33]. Таким образом, проведение доклинических исследований с использованием животных моделей, которые могут предоставить существенную гистологическую информацию с помощью соответствующих экспериментальных методик, становится важным этапом изучения свойств материалов [33]. В целях соблюдения принципов замены, уточнения или сокращения (3R) при

использовании животных в научных исследованиях, а также чтобы использовать минимально необходимый объем выборки, в настоящем экспериментальном исследовании были проведены предварительные расчеты размера выборки на основе имеющихся литературных данных [37]. Были выбраны взрослые самцы новозеландских белых кроликов, поскольку при использовании молодых животных могло наблюдаться искажение результатов из-за высокого потенциала спонтанного восстановления созданных костных дефектов, а при использовании самок на результаты исследования могли повлиять гормональные изменения [41].

Что касается выбранного места вмешательства, несмотря на то, что использование модели заживления костей свода черепа считается «золотым стандартом» при проведении оценки свойств остеозамещающих материалов, предназначенных для применения в стоматологии, полученные результаты исследования свидетельствуют о наличии тенденции к аномальной миграции частиц при внедрении материалов различных типов в область дефектов костей черепа. По этой причине для данного исследования была выбрана модель критического дефекта в области мыщелка бедренной кости кролика, определяемого как костный дефект наименьшего размера, который не способен к спонтанному заживлению и в котором предполагается замещение новой костной тканью не более 10 % объема всего дефекта в течение жизни животного [38,42–44]. Выбор описанной экспериментальной модели также позволил формировать по два дефекта костной ткани у каждого животного, что позволило снизить индивидуальную изменчивость, экономические затраты и свести количество используемых животных к минимуму [45].

При рассмотрении вопроса происхождения тестируемых материалов опирались на работу Corbella и соавт. [46], которые опубликовали систематический обзор литературных данных и мета-анализ с оценкой гистоморфометрических результатов заживления постэкстракционных лунок с использованием различных биоматериалов. Среди прочего, было выявлено, что по сравнению с участками, заживление которых происходило без добавления остеозамещающих материалов, при использовании биоматериалов свиного происхождения происходило образование значительно большего объема костной ткани за определенный период времени, чем при добавлении материалов бычьего происхождения.

В работах Nannmark и соавт. [28] и Mizuno и соавт. [28,47] было показано, что добавление коллагена в остеозамещающий материал (некоторые биоматериалы в данном исследовании были с содержанием коллагена) приводит к улучшению клинических результатов костной пластики, а также к изменению механизма резорбции частиц. Для более полного изучения влияния присутствия коллагена на механизм взаимодействия костной ткани и остеозамещающего материала требуется провести дополнительные исследования. Согласно данным Varone и соавт. [48] коллаген способствует резорбции биоматериала и является важным элементом в проявлении остеокондуктивной активности материала. Abdelgawad и соавт. [49] пролили свет на возможную роль коллагена, показав, что в процессе ремоделирования кости большинство вновь рекрутированных клеток линии остеобластов располагаются непосредственно рядом с остеокластами, имеющими эндоцитарные коллагеновые рецепторы, которые задействуются в процессе интернализации коллагена и миграции клеток. Отсутствие этих коллагеновых рецепторов приводит к резкому снижению темпов образования костной ткани. Наблюдения Abdelgawad и соавт. [49] показывают, что деминерализованный остеокластами костный коллаген, может играть важную роль в осуществлении гаптотактического движения клеток, то есть в привлечении остеопрогениторов к поверхностям, которые затем ремоделируются остеокластами, имеющими коллагеновые рецепторы. Данная модель может объяснить некоторые результаты,

полученные в настоящем исследовании. Varone и соавт. [48] пришли к выводу, что коллагенированная свиная кость обладает выраженными остеокондуктивными свойствами и хорошо резорбируется. Кроме того, ее добавление в область дефекта способствует увеличению доли новообразованной костной ткани и снижению количества остеозамещающего материала. Данные результаты были подтверждены результатами настоящего исследования. С точки зрения макроструктуры и организации, наиболее подходящей для любого костнопластического материала является поверхность с пористой структурой [48]. Четыре из пяти остеозамещающих материалов, используемых в данной экспериментальной работе, содержат кортикально-губчатые гранулы. Тем не менее, состав этих материалов может быть различным – некоторые состоят только из частиц, другие представляют собой смесь гранул с гелем (в различных пропорциях). У исследуемых материалов размер частиц также варьируется. Независимо от состава биоматериала, для успеха направленной костной регенерации важны не только характеристики самих частиц, но и правильное их распределение в объеме ткани, плотность заполнения костного дефекта и локализация частиц в области дефекта. Эти особенности напрямую связаны с размером и формой частиц, а также с навыками и опытом хирурга, работающего с остезамещающими материалами и заполняющего полость костного дефекта с их помощью. Кроме того, большое значение также имеют свойства самого материала и то, содержит ли он связующую фазу или нет. При чрезмерном уплотнении гранулированных материалов в полости дефекта они могут формировать блоки, вглубь которых клетки из окружающих тканей не будут способны проникнуть. С учетом данного факта была разработана идея внедрения связующей фазы в состав остеозамещающих материалов, которая способствовала бы сохранению адекватного расстояния между частицами, а также повышала бы удобство использования биоматериалов. Примерами использования данного дополнительного компонента являются гидрогелевые материалы, которые содержат меньше минеральных частиц в единице объема, распределенных в гидрогелевой матрице. Подобные материалы использованы в настоящем исследовании. Теоретически добавление связующей фазы способно облегчить или даже стимулировать инвазию клеточных и сосудистых компонентов в промежутки между частицами [50].

При сравнении результатов, полученных в группе Apatos, с результатами применения других исследуемых материалов, было обнаружено, что образцы с его добавлением содержат наименьшее количество остеокластических клеток. При этом имеющиеся остеокласты находятся рядом с новообразованной костной тканью и очень редко обнаруживаются в свободном пространстве вокруг частиц остеозамещающего материала. Подобные наблюдения описали и другие авторы, в том числе Iezzi и соавт. [51]. Данная картина на самом деле довольно часто встречается при использовании биоматериалов указанного типа, что свидетельствует о низкой скорости резорбции материала. Varone и соавт. [52] в ходе нескольких клинических испытаний проводили сравнение результатов применения материалов на основе кортикальной кости свиньи и материалов, представляющих собой смесь гранул из губчатой и кортикальной костной ткани свиней с коллагеном (аналогичный состав имеет материал $\text{tr}3^{\circ}$) у пациентов, которым было необходимо сохранить объем костной ткани альвеолярного отростка в области одного зуба. На момент оценки в группе с применением коллагенсодержащего материала отмечалось значительно менее заметное уменьшение объема альвеолярной кости и костной ткани в области базальной части альвеолярного отростка по сравнению с группой, в которой применялся материал без добавления коллагена. Тот же автор в 2017 году опубликовал две статьи с результатами рандомизированных контролируемых исследований, которые подтверждали ранее сделанные выводы о важности применения остеозамещающих материалов данного типа

[53,54]. К такому же выводу пришли Marconcini и соавт. [55] в ходе проведения рандомизированного 4-летнего клинического исследования с изучением участков челюстей с сохраненным объемом альвеолярной кости и с атрофией костной ткани альвеолярного отростка челюсти. В настоящем исследовании данные гистоморфометрии показывают, что результаты применения материала Apatos[®] являются сопоставимыми с результатами применения таких биоматериалов, как mp3[®] и Gen-Os[®], но при этом с точки зрения потенциала регенерации кости и соотношения количества частиц с объемом новообразованной костной ткани отличаются от результатов применения Putty и Gel 40. Приведенные выводы также согласуются с данными Scarano и соавт. [56] и Orsini и соавт. [57].

В группе Gen-Os через 15 и 30 дней после хирургического вмешательства во всех поперечных срезах тканей, находящихся в зоне дефекта, наблюдалась заметная и интенсивная остеокластическая активность, а также значительное количество остеобластных клеток и остеидного матрикса, что объясняется остеогенными свойствами материала и протеканием процессов деминерализации, резорбции и дезинтеграции частиц остеозамещающего материала. Следовательно, можно говорить о том, что в результате рассасывания костного матрикса частиц могут высвобождаться различные факторы роста, ответственные за регуляцию процессов пролиферации и дифференцировки преостеобластов, которые мигрируют в эту область из периваскулярных зон или сосудистого русла и создают условия для ее эффективной колонизации клетками линии остеобластов. После завершения процесса деградации остеокластов некоторые остеоиндуктивные молекулы (TGF, IGF-1, PDGF) способствуют синтезу и минерализации остеидного матрикса [58–60]. В 2017 году Iida и соавт. [61] опубликовали результаты гистоморфометрического экспериментального исследования на кроликах с применением техники синус-лифтинга и использованием биоматериала Gen-Os[®], а также описали интенсивные резорбтивные процессы, что подтверждалось присутствием большого количества многоядерных клеток, окружающих частицы биоматериала, которые постепенно резорбировались. Данная картина наблюдалась в течение 2 и 4 недель после хирургического вмешательства. В 2018 году Iida и соавт. [62] вновь опубликовали статью, посвященную этой теме, и сообщили об интенсивной остеокластической активности при использовании данного биоматериала, при этом наблюдалось высвобождение минеральных веществ при резорбции его частиц, которое могло приводить к увеличению плотности окружающих тканей. В исследовании, посвященном изучению особенностей ангиогенеза, Rombouts и соавт. [63] отметили более высокий ангиогенный потенциал Gen-Os[®] по сравнению с Bio-Oss и предположили, что Gen-Os[®] может способствовать протеканию процесса регенерации кости, стимулируя раннюю реваскуляризацию области дефекта, заполненной биоматериалом. Данные гистоморфометрического анализа в настоящем исследовании подтверждают описанные наблюдения: результаты применения материала Gen-Os[®] являются сопоставимыми с результатами применения таких биоматериалов, как Apatos[®] и mp3[®]. Через 30 дней после проведения хирургического вмешательства отмечается снижение процентного содержания частиц материала, что может объясняться протеканием процесса резорбции, однако данное изменение имеет низкий уровень статистической значимости. Scarano и соавт. [64] изучали процесс регенерации кости в зоне дефекта, расположенного на гребне подвздошной кости овцы. Через 4 месяца после добавления материала Gen-Os[®] область расположения дефекта была полностью заполнена новообразованной трабекулярной костной тканью со сформированными костными мостиками. Данные гистоморфометрического анализа показали, что среднее процентное содержание новообразованной костной ткани составляет $31,1 \pm 1,9$ %, а остатков

частиц биоматериала — $23,4 \pm 2,8 \%$. Описанные результаты согласуются с гистоморфометрическими данными, полученными в настоящем исследовании.

При выполнении хирургического вмешательства в рамках настоящего экспериментального исследования упаковка биоматериала *tr3*[®], состоящего из смеси коллаген-содержащих частиц из губчатой и кортикальной костной ткани свиней (90 %) с коллагеновым гелем (10 %), в виде шприца позволила упростить процесс внесения материала в область дефекта. Данная лекарственная форма, по-видимому, является улучшенной версией классических гранулированных остеопластических материалов и обеспечивает безопасное и удобное внесение материала в полость дефекта без потерь. Тот факт, что указанный материал представляет собой предварительно гидратированную форму, также является его важным преимуществом. При гистологической оценке результатов применения материала *tr3*[®] и их сравнении с результатами, наблюдаемыми в других экспериментальных группах в каждой временной точке, можно сделать вывод, что биоматериал *tr3*[®] является более эффективным, чем любой другой испытуемый материал. Через 15 дней после хирургической операции на срезах тканей даже в центре дефекта присутствовали костные мостики и участки незрелой костной ткани, а через 30 дней была видна непрерывная сеть костных трабекул между противоположными краями дефекта, а также по всему его периметру. Множественные скопления остеобластов и фрагментов остеоидов на периферии частиц и трабекул, регистрируемые в двух временных контрольных точках, свидетельствуют о все еще продолжающемся процессе остеогенеза. Неоднородность форм, размеров и окраски некоторых частиц говорит о протекании процессов резорбции и деминерализации, которые были инициированы остеокластами, находящимися рядом с частицами биоматериала. Полученные результаты согласуются с литературными данными [26,48,65,66]. Результаты гистоморфометрического анализа, как правило, подтверждают наблюдения, описанные в предыдущих абзацах. Следует отметить резкое изменение процентного содержания частиц между двумя временными точками — снижение с $54,66 \pm 3,51 \%$ до $25,96 \pm 5,38 \%$. Данное статистически значимое изменение ($p = 0,009$) может объясняться интенсивной остеокластической активностью, которая приводит к фрагментации и резорбции частиц. Что касается формирования костной ткани, в группе *tr3* в обеих временных контрольных точках регистрировалось самое высокое ее процентное содержание по сравнению со всеми исследуемыми материалами: $40,93 \pm 3,49 \%$ через 15 дней и $52,49 \pm 11,04 \%$ через 30 дней. Вагоне и соавт. [48] подсчитали, что процент новообразованной костной ткани после проведения операции синус-лифтинга с использованием указанного биоматериала составляет $30,7 \pm 15,5 \%$ или $28,1 \pm 19,4 \%$ в зависимости от используемой хирургической методики. Этот же автор в ходе аналогичного клинического исследования выявил, что доля новообразованной костной ткани в области дефекта составляет $43,95 \pm 18,6 \%$, а частиц биоматериала — $14,2 \pm 13,6 \%$ [65]. Guirado и соавт. [26] изучали реакцию костной ткани на внесение ксенотрансплантатов свиного происхождения с содержанием коллагена в искусственно созданные дефекты большеберцовой кости кролика. Через 30 дней после хирургической операции доля вновь сформированной костной ткани составляла $19,7 \pm 1,5 \%$. Эти результаты не соответствуют данным, полученным в настоящем экспериментальном исследовании. В работе Giuliani и соавт. [66] приведены гистологические результаты, сходные с теми, которые были получены в настоящем экспериментальном исследовании при проведении гистоморфометрии. Было выявлено увеличение содержания костной ткани и уменьшение объема биоматериала в разные моменты времени. Nannmark и соавт. [28] в исследовании с созданием костных дефектов на верхней

челюсти кролика также выявили интенсивную остеокластическую активность в области расположения частиц материала mp3 , с морфометрическими измерениями, свидетельствующими об увеличении площади кости параллельно с уменьшением площади, занимаемой частицами материала, с течением времени. Также как и мы, авторы объяснили полученные результаты наличием остеокластов, которые резорбировали частицы материала. Silvestri и соавт. [67] провели сравнение материала mp3° с биоматериалом Bio-Oss, который имеет иное происхождение. По мнению авторов, данные материалы демонстрируют аналогичные показатели эффективности.

Несмотря на то, что гистологические изображения тканей образцов, отобранных в группах Putty и Gel 40, приведенные на рисунке 5, были выбраны среди лучших результатов, наблюдаемых после применения данных материалов, можно предположить, что их частицы, по-видимому, имеют выраженный разброс по размерам и склонны к миграции. При гистологическом исследовании, проведенном на 15 и 30-й день после хирургического вмешательства, за пределами периферических зон дефекта практически не замечено признаков образования костной ткани, что соответствует картине естественной регенерации, ожидаемой в области дефекта критического размера. Через 30 дней после хирургической операции с внесением в область дефекта материала Putty среднее значение прироста доли новообразованной костной ткани составило $12,58 \pm 5,74$ %, а площади зоны расположения частиц — $1,02 \pm 1,05$ %. В тот же период времени в образцах с материалом Gel 40 значение увеличения содержания новообразованной костной ткани составило $11,65 \pm 15,61$ %, а площади зоны расположения частиц — $0,66 \pm 0,64$ %. При выполнении хирургической операции по описанной в данной работе методике упаковка материалов Putty и Gel 40 в виде шприцев, а также их вязкая, пластилиноподобная текстура, значительно облегчили работу с материалами. Единственным заметным потенциальным недостатком материалов Putty или Gel 40 является полное прекращение кровотечения при их внесении в полость дефекта. Это может облегчить обзор операционного поля в ходе хирургического вмешательства, но также может препятствовать смачиванию биоматериала кровью, что является важным условием для стимулирования процесса регенерации костной ткани. Calvo-Guirado и соавт. [68] использовали биоматериал Putty для заполнения дефектов костей голени кролика некритических размеров (диаметр 4 мм). Результаты операции оценивали через 1, 5, 8 и 15 месяцев по данным рентгенографического гистологического и гистоморфометрического исследования. В отличие от результатов, полученных в настоящем исследовании, через 1 месяц процентное содержание новообразованной костной ткани составило $20,7 \pm 1,5$ %, а частиц материала — $28,8 \pm 3,1$ %. Через 5, 8 и 15 месяцев процентное содержание новообразованной костной ткани немного увеличилось, среднее значение составило $27,32 \pm 1,4$ %. Nannmark и соавт. [28] провели исследование с созданием костных дефектов размером $5 \times 8 \times 3$ мм на обеих сторонах верхней челюсти у самок новозеландских белых кроликов. Все дефекты заполнялись биоматериалом Putty. Через 8 недель после хирургического вмешательства была проведена гистологическая и морфометрическая оценка результатов. Доля новообразованной костной ткани составила $42,3 \pm 12,3$ %, что является единственным числовым значением, приведенным в статье для материала Putty. Для оценки краткосрочных результатов использования материала Gen-Os[®] и Gel 40 для стимуляции регенерации костей Develioğlu и соавт. [69] заполняли указанными материалами дефекты черепных костей крыс. Методология этого исследования подразумевала проведение субъективной гистологической оценки, дополненной гистоморфометрическим анализом, поэтому было получено мало первичных необработанных данных. Среднее значение

содержания костной ткани в области дефектов составило $38,57 \pm 6,9\%$ при применении материала Gel 40 и $27,5 \pm 18,37\%$ при применении материала Gen-Os[®]. Данные результаты не имели статистической значимости, и авторы статьи пришли к выводу, что оба биоматериала, используемые в исследовании, являются остеокондуктивными. Те же авторы опубликовали еще одну статью, в которой также описывались изменения в области дефектов черепных костей крыс, но период оценки был длиннее, чем в вышеупомянутом эксперименте. В группе Gen-Os был зарегистрирован более значимый прирост объема костной ткани в зоне дефектов, чем в группе Gel 40 [70,71].

Мы предполагаем, что расхождения между результатами нашего исследования и некоторыми литературными данными могут быть обусловлены особенностями дефектов критического размера или объясняться различиями дизайнов исследований и методов оценки, даже несмотря на то, что в данной экспериментальной работе была предпринята попытка имитировать клинические условия путем использования мембраны из гетерологичного перикарда для покрытия дефекта и предотвращения смещения материала, что, по-видимому, оказалось эффективным для групп Apatos, Gen-Os и mp3.

5. Выводы

Исследуемые остеозамещающие материалы свиного происхождения обладают хорошей биосовместимостью и, по-видимому, успешно подвергаются процессам резорбции, деминерализации и дезинтеграции частиц, которые способствуют замещению биоматериала новообразованной костной тканью. Все три материала (mp3[®], Gen-Os[®] и Apatos[®]) показали обнадеживающие результаты с точки зрения формирования новой костной ткани, таким образом, данные материалы могут использоваться в качестве альтернативных средств для стимулирования процесса регенерации кости. Putty и Gel 40 демонстрируют неблагоприятные гистологические результаты по сравнению с остальными биоматериалами, со статистически значимыми различиями данных гистоморфометрического исследования с данными, полученными при использовании материала mp3[®], независимо от рассматриваемого параметра и временного промежутка.

Участие авторов: концепция: F.G., R.I.F. и C.V.; экспериментальное исследование: R.I.F., C.V., P.J.P., I.D. и J.A.M.; курирование данных: R.I.F. и M.H.F.; анализ и интерпретация данных: R.I.F., F.C. и P.J.P.; статистика: F.C.; анализ: F.C. и R.I.F.; методология: R.I.F., F.G., C.V., F.C. и P.J.P.; контроль: F.G. и C.V.; подготовка черновика: R.I.F.; редактирование: F.G., P.J.P., R.I.F., M.H.F. и J.A.M.; обеспечение финансированием: F.G., C.V., и I.D.

Финансирование: Это исследование финансировалось Национальными фондами FCT – Португальскими фондами Науки и Технологий в рамках проекта UIDB/04033/2020.

Заявление институционального наблюдательного совета: Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Директив европейского законодательства о защите животных, используемых в научных целях (Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г.), а также португальского законодательства по использованию животных в экспериментальных целях (Декрет № 113/2013, от 7 августа) и одобрено Комитетом по этике Университета Trás-os-Montes e Alto Douro (номер протокола CE 29 от 2015 г.).

Заявление об информированном согласии: не применимо.

Заявление о доступности данных: данные, представленные в этом исследовании, доступны по запросу от соответствующего автора.

Благодарности: Авторы выражают благодарность Луису Антунесу (Luís Antunes), Кафедра ветеринарных наук, Школа сельскохозяйственных и ветеринарных наук, Университет Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Вила Реал, Португалия за неоценимую помощь в наблюдении за животными и их размещении, а также финансирование; Клаудию Бритес (Cláudia Brites) из Лаборатории гистологии твердых тканей Медицинского факультета Университета Коимбры (University of Coimbra) за помощь в экспериментальных процедурах и подготовке гистологических образцов. Авторы также благодарят компанию Tecnos[®] Dental (Via Livorno 60, 10144 Турин, Италия) за предоставление материалов для данного исследования.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсоры не участвовали в разработке исследования; в сборе, анализе или интерпретации данных; в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

Доступность образцов: образцы соединений авторы не предоставляют.

Список литературы

1. Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P.V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* **2011**, *9*, 66, doi:10.1186/1741-7015-9-66.
2. Elgali, I.; Omar, O.; Dahlin, C.; Thomsen, P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur. J. Oral Sci.* **2017**, *125*, 315–337, doi:10.1111/eos.12364.
3. Sbordone, C.; Toti, P.; Martuscelli, R.; Guidetti, F.; Sbordone, L.; Ramaglia, L. A 5-Year Implant Follow-Up in Maxillary and Mandibular Horizontal Osseous Onlay Grafts and Native Bone. *J. Oral Implant.* **2015**, *41*, 570–578, doi:10.1563/aaid-joi-d-13-00278.
4. Domingues, E.P.; Ribeiro, R.F.; Horta, M.C.R.; Zenóbio, E.G.; Cósso, M.G.; Manzi, F.R. Vertical augmentation of the posterior atrophic mandible by interpositional grafts in a split-mouth design: A human tomography evaluation pilot study. *Clin. Oral Implant. Res.* **2016**, *28*, doi:10.1111/clr.12985.
5. Marconcini, S.; Covani, U.; Giammarinaro, E.; Ortega, E.V.; De Santis, D.; Alfonsi, F.; Barone, A. Clinical Success of Dental Implants Placed in Posterior Mandible Augmented With Interpositional Block Graft: 3-Year Results From a Prospective Cohort Clinical Study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2019**, *77*, 289–298, doi:10.1016/j.joms.2018.09.031.
6. Karalashvili, L.; Kakabadze, A.; Uhryn, M.; Vyshnevskaya, H.; Ediberidze, K.; Kakabadze, Z. BONE GRAFTS FOR RECONSTRUCTION OF BONE DEFECTS (REVIEW). *Georg. Med News* **2018**, 44–49.
7. Ku, J.-K.; Hong, I.; Lee, B.-K.; Yun, P.-Y.; Lee, J.K. Dental alloplastic bone substitutes currently available in Korea. *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **2019**, *45*, 51–67, doi:10.5125/jkaoms.2019.45.2.51.
8. Raghuram, A.; Singh, A.; Chang, D.K.; Nunez, M.; Reece, E.M. Bone Grafts, Bone Substitutes, and Orthobiologics: Applications in Plastic Surgery. *Semin. Plast. Surg.* **2019**, *33*, 190–199, doi:10.1055/s-0039-1693020.
9. Al-Moraissi, E.; Alkhatari, A.; Abotaleb, B.; Altairi, N.; Del Fabbro, M. Do osteoconductive bone substitutes result in similar bone regeneration for maxillary sinus augmentation when compared to osteogenic and osteoinductive bone grafts? A systematic review and frequentist network meta-analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2020**, *49*, 107–120, doi:10.1016/j.ijom.2019.05.004.

10. Costantino, P.D.; Hiltzik, D.; Govindaraj, S.; Moche, J. Bone Healing and Bone Substitutes. *Facial Plast. Surg.* **2002**, *18*, 013–026, doi:10.1055/s-2002-19823.
11. Cutter, C.S.; Mehrara, B.J. Bone Grafts and Substitutes. *J. Autom. Inf. Sci.* **2006**, *16*, 249–260, doi:10.1615/jlongtermeffmedimplants.v16.i3.50.
12. De Grado, G.F.; Keller, L.; Idoux-Gillet, Y.; Wagner, Q.; Musset, A.-M.; Benkirane-Jessel, N.; Bornert, F.; Offner, D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J. Tissue Eng.* **2018**, *9*, doi:10.1177/2041731418776819.
13. Schwartz, C.; Lecestre, P.; Fraysinet, P.; Liss, P. Bone substitutes. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* **1999**, *9*, 161–165, doi:10.1007/bf00542583.
14. Agner, C.; McConathy, D.; Dujovny, M. Evaluation of autogenic, xenogeneic and alloplastic materials used for cranioplasty. *Crit. Rev. Neurosurg.* **1997**, *7*, 365–372, doi:10.1007/s003290050048.
15. Troeltzsch, M.; Troeltzsch, M.; Kauffmann, P.; Gruber, R.; Brockmeyer, P.; Moser, N.; Rau, A.; Schliephake, H. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2016**, *44*, 1618–1629, doi:10.1016/j.jcms.2016.07.028.
16. Sakkas, A.; Wilde, F.; Heufelder, M.; Winter, K.; Schramm, A. Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int. J. Implant. Dent.* **2017**, *3*, 1–17, doi:10.1186/s40729-017-0084-4.
17. De Sousa, C.A.; Lemos, C.A.A.; Santiago-Júnior, J.F.; Faverani, L.P.; Pellizzer, E.P. Bone augmentation using autogenous bone versus biomaterial in the posterior region of atrophic mandibles: A systematic review and meta-analysis. *J. Dent.* **2018**, *76*, 1–8, doi:10.1016/j.jdent.2018.06.014.
18. Kolk, A.; Handschel, J.; Drescher, W.; Rothamel, D.; Kloss, F.; Blessmann, M.; Heiland, M.; Wolff, K.-D.; Smeets, R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials — From space holders to innovative biomaterials. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2012**, *40*, 706–718, doi:10.1016/j.jcms.2012.01.002.
19. Van Der Stok, J.; Van Lieshout, E.; El-Massoudi, Y.; Van Kralingen, G.; Patka, P. Bone substitutes in the Netherlands—A systematic literature review. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 739–750, doi:10.1016/j.actbio.2010.07.035.
20. Idrontino, G.; Valente, N.A. Intraoral and extraoral autologous bone block graft techniques: A review of the recent literature. *Int. J. Contemp. Dent. Med. Rev.* **2016**, doi:10.15713/ins.ijcdmr.99.
21. Kao, S.T.; Scott, D.D. A Review of Bone Substitutes. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.* **2007**, *19*, 513–521, doi:10.1016/j.joms.2007.06.002.
22. Dimitriou, R.; Mataliotakis, G.I.; Angoules, A.G.; Kanakaris, N.K.; Giannoudis, P.V. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. *Injury* **2011**, *42*, S3–S15, doi:10.1016/j.injury.2011.06.015.
23. Figueiredo, M.; Henriques, J.; Martins, G.; Guerra, F.; Judas, F.; Figueiredo, H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes-Comparison with human bone. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2009**, *92*, 409–419, doi:10.1002/jbm.b.31529.

24. Pereira, E.; Messias, A.; Dias, R.; Judas, F.; Salvoni, A.; Guerra, F. Horizontal Resorption of Fresh-Frozen Corticocancellous Bone Blocks in the Reconstruction of the Atrophic Maxilla at 5 Months. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2014**, *17*, e444–58, doi:10.1111/cid.12268.
25. Salamanca, E.; Hsu, C.-C.; Huang, H.-M.; Teng, N.-C.; Lin, C.-T.; Pan, Y.-H.; Chang, W.-J. Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–8, doi:10.1038/s41598-018-19629-y.
26. Guirado, J.L.C.; Fernández, M.P.R.; Negri, B.; Ruiz, R.A.D.; De-Val, J.E.M.S.; Gómez-Moreno, G. Retracted : Experimental Model of Bone Response to Collagenized Xenografts of Porcine Origin (OsteoBiol® mp3): A Radiological and Histomorphometric Study. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2013**, *15*, 143–151, doi:10.1111/j.1708-8208.2011.00337.x.
27. Ramírez-Fernández, M.P.; Calvo-Guirado, J.L.; Delgado-Ruíz, R.A.; Negri, B.; Barona-Dorado, C.; Del Val, J.E.M.-S. Ultrastructural study by backscattered electron imaging and elemental microanalysis of bone-to-biomaterial interface and mineral degradation of porcine xenografts used in maxillary sinus floor elevation. *Clin. Oral Implant. Res.* **2012**, *24*, 523–530, doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02414.x.
28. Nannmark, U.; Sennerby, L. The Bone Tissue Responses to Prehydrated and Collagenated Cortico-Cancellous Porcine Bone Grafts: A Study in Rabbit Maxillary Defects. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2008**, *10*, 264–270, doi:10.1111/j.1708-8208.2007.00080.x.
29. Recker, R.; Kimmel, D.; Dempster, D.; Weinstein, R.; Wronski, T.; Burr, D. Issues in modern bone histomorphometry. *Bone* **2011**, *49*, 955–964, doi:10.1016/j.bone.2011.07.017.
30. Varela, A.; Jollette, J. Bone Toolbox: Biomarkers, Imaging Tools, Biomechanics, and Histomorphometry. *Toxicol. Pathol.* **2018**, *46*, 511–529, doi:10.1177/0192623318779565.
31. Erben, R.G.; Jollette, J.; Chouinard, L.; Boyce, R.; Smith, S.Y.; Varela, A.; Samadfam, R. *Application of Histopathology and Bone Histomorphometry for Understanding Test Article-Related Bone Changes and Assessing Potential Bone Liabilities*; Springer International Publishing: Berlin, Germany, 2017; pp. 253–278.
32. Palma, P.J.; Matos, S.; Ramos, J.; Guerra, F.; Figueiredo, M.H.; Kauser, J. New formulations for space provision and bone regeneration. *Biodental Eng. I* **2010**, 71–76.
33. Yamamoto, N., Takahashi, H., Shimakura, T. Bone histomorphometry; A role of evaluation for bone quality and mechanical strength. *Clin. Calcium* **2016**, *26*, 9–15.
34. McGovern, J.A.; Griffin, M.; Hutmacher, D.W. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis. Model. Mech.* **2018**, *11*, dmm033084, doi:10.1242/dmm.033084.
35. Neyt, J.G.; Buckwalter, J.A.; Carroll, N.C. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop. J.* **1998**, *18*, 118–123.
36. Li, Y.; Chen, S.-K.; Li, L.; Qin, L.; Wang, X.-L.; Lai, Y.-X. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J. Orthop. Transl.* **2015**, *3*, 95–104, doi:10.1016/j.jot.2015.05.002.
37. Thomas, B.S.; Bhat, K.M.; Mapara, M. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent. Res. J.* **2012**, *9*, 111–8, doi:10.4103/1735-3327.92960.
38. Palma, P.J. Estudo de novas formulações para regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica. Master’s Thesis, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, September 2009.
39. Lindley, E.M.; Guerra, F.A.; Krauser, J.T.; Matos, S.M.; Burger, E.L.; Patel, V.V. Small peptide

(P-15) bone substitute efficacy in a rabbit cancellous bone model. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **2010**, *94*, 463–468, doi:10.1002/jbm.b.31676.

40. Kilkenny, C.; Browne, W.; Cuthill, I.C.; Emerson, M.; Altman, D.G.; Group NCRRGW. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 1577–1579, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x.

41. Dominguez, V.M.; Agnew, A.M. The use of ROI overlays and a semi-automated method for measuring cortical area in ImageJ for histological analysis. *Am. J. Phys. Anthr.* **2019**, *168*, 378–382, doi:10.1002/ajpa.23747.

42. Chang, S.J.; Kuo, S.M.; Lin, Y.T.; Yang, S.-W. The Biological Effects of Sex Hormones on Rabbit Articular Chondrocytes from Different Genders. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–9, doi:10.1155/2014/932737.

43. Oonishi, H.; Kushitani, S.; Yasukawa, E.; Kawakami, H.; Nakata, A.; Koh, S.; Hench, L.; Wilson, J.; Tsuji, E.; Sugihara, T. Bone Growth into Spaces Between 45S5 Bioglass Granules. *Bioceramics* **1994**, 139–144.

44. Chan, C.; Thompson, I.; Robinson, P.; Wilson, J.; Hench, L. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2002**, *31*, 73–77, doi:10.1054/ijom.2001.0143.

45. Matos, S.; Guerra, F.; Krauser, J.T.; Figueiredo, H.; Marcelino, J.P.; Sanz, M. Evaluation of an anorganic bovine-derived mineral with P-15 hydrogel bone graft: preliminary study in a rabbit cranial bone model. *Clin. Oral Implant. Res.* **2011**, *23*, 698–705, doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02179.x.

46. Caiazza, S.; Colangelo, P.; Bedini, R.; Formisano, G.; De Angelis, G.; Barrucci, S. Evaluation of Guided Bone Regeneration in Rabbit Femur Using Collagen Membranes. *Implant. Dent.* **2000**, *9*, 219–225, doi:10.1097/00008505-200009030-00007.

47. Corbella, S.; Taschieri, S.; Francetti, L.; Weinstein, R.; Del Fabbro, M. Histomorphometric Results After Postextraction Socket Healing with Different Biomaterials: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2017**, *32*, 1001–1017, doi:10.11607/jomi.5263.

48. Mizuno, M.; Kuboki, Y. Osteoblast-Related Gene Expression of Bone Marrow Cells during the Osteoblastic Differentiation Induced by Type I Collagen. *J. Biochem.* **2001**, *129*, 133–138, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002824.

49. Barone, A.; Ricci, M.; Covani, U.; Nannmark, U.; Azarmehr, I.; Calvo-Guirado, J.L. Maxillary Sinus Augmentation Using Prehydrated Corticocancellous Porcine Bone: Hystomorphometric Evaluation after 6 Months. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2010**, *14*, 373–379, doi:10.1111/j.1708-8208.2010.00274.x.

50. AbdelGawad, M.E.; S e, K.; Andersen, T.L.; Merrill, D.M.; Christiansen, P.; Kjærsgaard-Andersen, P.; Delaisse, J.-M. Does collagen trigger the recruitment of osteoblasts into vacated bone resorption lacunae during bone remodeling? *Bone* **2014**, *67*, 181–188, doi:10.1016/j.bone.2014.07.012.

51. Petrochenko, P.; Narayan, R.J. Novel approaches to bone grafting: porosity, bone morphogenetic proteins, stem cells, and the periosteum. *J. Autom. Inf. Sci.* **2010**, *20*, 303–15, doi:10.1615/jlongtermeffmedimplants.v20.i4.50.

52. Iezzi, G.; Piattelli, A.; Giuliani, A.; Mangano, C.; Barone, A.; Manzon, L.; Degidi, M.; Scarano,

A.; Filippone, A.; Perrotti, V. Molecular, Cellular and Pharmaceutical Aspects of Bone Grafting Materials and Membranes During Maxillary Sinus-lift Procedures. Part 2: Detailed Characteristics of the Materials. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2017**, *18*, 33–44, doi:10.2174/1389201017666161202104002.

53. Barone, A.; Toti, P.; Quaranta, A.; Alfonsi, F.; Cucchi, A.; Calvo-Guirado, J.L.; Negri, B.; Di Felice, R.; Covani, U. Volumetric analysis of remodelling pattern after ridge preservation comparing use of two types of xenografts. A multicentre randomized clinical trial. *Clin. Oral Implant. Res.* **2015**, *27*, e105–e115, doi:10.1111/clr.12572.

54. Barone, A.; Toti, P.; Quaranta, A.; Alfonsi, F.; Cucchi, A.; Negri, B.; Di Felice, R.; Marchionni, S.; Calvo-Guirado, J.L.; Covani, U.; et al. Clinical and Histological changes after ridge preservation with two xenografts: preliminary results from a multicentre randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* **2017**, *44*, 204–214, doi:10.1111/jcpe.12655.

55. Barone, A.; Toti, P.; Menchini-Fabris, G.-B.; Derchi, G.; Marconcini, S.; Covani, U. Extra oral digital scanning and imaging superimposition for volume analysis of bone remodeling after tooth extraction with and without 2 types of particulate porcine mineral insertion: A randomized controlled trial. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2017**, *19*, 750–759, doi:10.1111/cid.12495.

56. Marconcini, S.; Giammarinaro, E.; Derchi, G.; Alfonsi, F.; Covani, U.; Barone, A. Clinical outcomes of implants placed in ridge- preserved versus nonpreserved sites: A 4-year randomized clinical trial. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2018**, *20*, 906–914, doi:10.1111/cid.12682.

57. Scarano, A.; Piattelli, A.; Perrotti, V.; Manzon, L.; Iezzi, G. Maxillary Sinus Augmentation in Humans Using Cortical Porcine Bone: A Histological and Histomorphometrical Evaluation After 4 and 6 Months. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2011**, *13*, 13–18, doi:10.1111/j.1708-8208.2009.00176.x.

58. Orsini, G.; Scarano, A.; Piattelli, M.; Piccirilli, M.; Caputi, S.; Piattelli, A. Histologic and Ultrastructural Analysis of Regenerated Bone in Maxillary Sinus Augmentation Using a Porcine Bone-Derived Biomaterial. *J. Periodontol.* **2006**, *77*, 1984–1990, doi:10.1902/jop.2006.060181.

59. Katagiri, T.; Takahashi, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* **2002**, *8*, 147–159, doi:10.1034/j.1601-0825.2002.01829.x.

60. Fischer, C.; Doll, J.; Tanner, M.; Bruckner, T.; Zimmermann, G.; Helbig, L.; Biglari, B.; Schmidmaier, G.; Moghaddam, A.; Information, P.E.K.F.C. Quantification of TGF- β 1, PDGF and IGF-1 cytokine expression after fracture treatment vs. non-union therapy via masquetelet. *Injury* **2016**, *47*, 342–349, doi:10.1016/j.injury.2015.11.007.

61. Gardner, C.R. Comparison of morphological effects of PGE2 and TGF β on osteoclastogenesis induced by RANKL in mouse bone marrow cell cultures. *Cell Tissue Res.* **2007**, *330*, 111–121, doi:10.1007/s00441-007-0450-2.

62. Iida, T.; Neto, E.C.M.; Botticelli, D.; Alccayhuaman, K.A.A.; Lang, N.P.; Xavier, S.P. Influence of a collagen membrane positioned subjacent the sinus mucosa following the elevation of the maxillary sinus. A histomorphometric study in rabbits. *Clin. Oral Implant. Res.* **2017**, *28*, 1567–1576, doi:10.1111/clr.13027.

63. Iida, T.; Silva, E.R.; Lang, N.P.; Alccayhuaman, K.A.A.; Botticelli, D.; Xavier, S.P. Histological and micro-computed tomography evaluations of newly formed bone after maxillary sinus augmentation using a xenograft with similar density and mineral content of bone: An experimental study in rabbits. *Clin. Exp. Dent. Res.* **2018**, *4*, 284–290, doi:10.1002/cre2.146.

64. Rombouts, C.; Jeanneau, C.; Camilleri, J.; Laurent, P.; About, I. Characterization and angiogenic potential of xenogeneic bone grafting materials: Role of periodontal ligament cells. *Dent. Mater. J.* **2016**, *35*, 900–907, doi:10.4012/dmj.2016-005.
65. Scarano, A.; Lorusso, F.; Ravera, L.; Mortellaro, C.; Piattelli, A. Bone Regeneration in Iliac Crestal Defects: An Experimental Study on Sheep. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 1–6, doi:10.1155/2016/4086870.
66. Barone, A.; Ricci, M.; Grassi, R.F.; Nannmark, U.; Quaranta, A.; Covani, U.; Grassi, F.R. A 6-month histological analysis on maxillary sinus augmentation with and without use of collagen membranes over the osteotomy window: randomized clinical trial. *Clin. Oral Implant. Res.* **2011**, *24*, 1–6, doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02340.x.
67. Giuliani, A.; Iezzi, G.; Mazzoni, S.; Piattelli, A.; Perrotti, V.; Barone, A. Regenerative properties of collagenated porcine bone grafts in human maxilla: demonstrative study of the kinetics by synchrotron radiation microtomography and light microscopy. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *22*, 505–513, doi:10.1007/s00784-017-2139-6.
68. Silvestri, M.; Martegani, P.; D’Avenia, F.; Farneti, M.; Capri, D.; Paolantoni, G.; Landi, L. Simultaneous sinus augmentation with implant placement: histomorphometric comparison of two different grafting materials. A multicenter double-blind prospective randomized controlled clinical trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2013**, *28*, 543–549, doi:10.11607/jomi.2647.
69. Calvo-Guirado, J.L.; Gómez-Moreno, G.; Guardia, J.; Ortiz-Ruiz, A.; Piattelli, A.; Barone, A.; Martínez-González, J.M.; Meseguer-Olmo, L.; López-Marí, L.; Dorado, C.B. Biological Response to Porcine Xenograft Implants. *Implant. Dent.* **2012**, *21*, 112–117, doi:10.1097/id.0b013e3182425991.
70. Develioglu, H.; Ozcan, G.; Gultekin, S.E.; Senguven, B.; Yildirim, A. The short-term effects of various xenografts on bone healing in rats cranial defects. *Biomed. Res.* **2018**, *29*, doi:10.4066/biomedicalresearch.29-17-3741.
71. Develioglu, H.; Saraydin, S.U.; Akkus, Z.; Sahin, Z.D.; Bakar, O. Long-term assessment of bone formation in response to Gen Os and Gel 40 xenografts in an experimental rat model. *Biomed Res* **2015**, *26*, 666–6671.