Журнал по исследованию био-медицинских материалов, часть А
Первоначальные версии (статьи, доступные для просмотра в интернете до их опубликования в типографии)
Опубликовано в интернете: 9 июня 2005 г.

Статья-отчет об исследовании

Ультраструктура заживления костных дефектов, заполненных сополимером, представляющим собой полилактидно-полигликолидную кислоту

Анна Виторио Имбронито[1], Антонио Скарано[2], Джованна Орсини[2], Адриано Пиателли[2], Виктор Е. Арана-Чавез[1*]
[1] Лаборатория биологии минерализованных тканей, Отделение клеточной и эволюционной биологии, Институт биомедицинских наук, университет города Сан-Паоло, 055080900, г. Сан-Паоло, SP, Бразилия.
[2] Школа стоматологии, университет города Чиети, г. Чиети, Италия
Электронный адрес: Виктор Е.Арана-Чавез (vearama@usp.br)
* Корреспонденцию следует направлять Виктору Е.Арана-Чавезу, Лаборатория биологии минерализованных тканей, Отделение клеточной и эволюционной биологии, Институт биомедицинских наук, университет города Сан-Паоло, 055080900, г. Сан-Паоло, SP, Бразилия.

Исследование проведено при поддержке:
Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), Brazil

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:
Полилактидная кислота, полигликолидная кислота, лечение костной ткани, ультраструктура

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ
Для лечения костных дефектов используются заменители костной ткани. Целью данного исследования была ультраструктурная оценка характера заживления костных дефектов, наполненных сополимером полилактидно-полигликолидной кислотой (Fisiograft®) в тот момент времени, когда предположительно он подвергся распаду лишь частично. Исследование было предпринято с целью анализа с точки зрения ультраструктуры процесса формирования кости вокруг материала-наполнителя в заполненном им дефекте кости. В больших берцовых костях у пяти кроликов (с весом в среднем 2,5 кг) создавались костные дефекты с диаметром 5 мм, и в некоторые из них, выбранные случайным образом, закладывался этот материал. Через 30 дней после этой хирургической операции животных умертвляли, и 30 костных дефектов фиксировали с помощью 2% глютаралдегида-2.5% формальдегида под действием микроволнового излучения, затем декальцинировали в EDTA, погружали в жидкий полимер Спурра и исследовали с помощью электронного микроскопа Jeol 1010 TEM. Оказалось, что к этому моменту времени все дефекты кости уже заполнены соединительной тканью, в той или иной степени вкрапленной в материал-наполнитель, и вновь образовавшимися костными трабекулами. В тех областях, где в небольших количествах еще присутствовал разлагающийся сополимер, было отмечено наличие недавно сформированной костной матрицы; ее присутствие было отмечено отложениями клеток типа остеобластов, и эти клетки находились в тесном соседстве с сополимером. В местах скопления разлагающегося сополимера между соединительной тканью и сополимером был обнаружен аморфный многослойный материал. Делается вывод, что исследуемый сополимер PLA/PGA при использовании его для наполнения костных дефектов является остеокондуктивным материалом. © 2005 Wiley Periodicals, Inc. J.Biomed Mater Resm 2005.

Получено 6 мая 2004 г.; Отредактировано: 29 декабря 2004 г.; Принято в печать: 12 января 2005 г.
ЦИФРОВОЙ ИДЕНТИФИКАТОР ОБЪЕКТОВ (DOI)

10.1002/jbm.a.30350 Информация о DOI

ТЕКСТ СТАТЬИ

ВВЕДЕНИЕ

В современной восстановительной стоматологии часто целью является нахождение способов поддерживать или способствовать росту костной ткани в альвеолярных лунках до установки зубных имплантатов. В рамках различных технических методов восстановления костной ткани используется несколько синтетических материалов в качестве наполнителей для дефектов различных костей. Идеальный наполнитель для кости должен быть остеоиндуктивным и не-аллергенным материалом, но остеоиндуктивные свойства большинства имеющихся биоматериалов вызывают сомнения [1]. По этой причине тестированию подвергался ряд остеокондуктивных материалов в исследованиях как на животных, так и на человеке. В большинстве исследований, проведенных на животных, для оценки тестируемого материала использовалось заживление больших берцовых костей у кроликов, а исследования, проведенные на людях, обычно фокусировались на изучении состояния наполненных тестируемым остеокондуктивным материалом альвеолярных лунок, оставшихся после удаления зубов. В качестве синтетических наполнителей для костей широко использовались биокерамические материалы, включая фосфаты кальция, такие как трикальцийфосфат, гидроксиапатит и углекислый кальций, Оказалось, что у трикальцийфосфата низкий остеокондуктивный потенциал и высокая рассасываемость [2]. Также на дефектах на больших берцовых костях у кроликов часто тестировались гипс (сульфат кальция) и цемент, и эти исследования показали, что образование кости с интенсивным образованием остеобластов происходит в течение 30 дней после наполнения дефекта кости этим материалом [3]. В человеческих лунках, оставшихся после удаления зубов, новая трабекулярная кость формировалась за 3 месяца после наполнения их тем или иным материалом, и при этом полугидрат гипса почти полностью рассасывался [4]. Хотя рассасывающийся углекислый кальций легко адаптируется и быстро заменяется новой костной тканью, его эффективность ограничена лечением узких очагов повреждения [5-7]. С другой стороны, результаты исследований, в которых сообщается об имплантации пористого гидроксиапатита, противоречат друг другу. В некоторых из них при применении пористого гидроксиапатита на периодонтальных дефектах в течение нескольких месяцев улучшалась глубина зондирования, уровень прикрепления и регенерация костной ткани [8-10]. Тем не менее, гистологический анализ показал образование длинного участка соединительного эпителия, что, таким образом, указывает на то, что настоящая периодонтальная регенерация не происходит. Более того, было показано, что пористый гидроксиапатит не рассасывается, а лишь обволакивается волокнистой соединительной тканью [11].

В этом контексте интерес представляют синтетические полимеры рассасывающихся полилактидной (PLA) и полигликолидной (PGA) кислот, применяемые как по отдельности, так и в сочетании в различных пропорциях, в виде мини-винтов, мембран, мини-пластинок и заменителей костей [12]. Полимер PGA разлагается быстрее (приблизительно за 2 месяца), а PLA остается в лунке в течение более продолжительного периода времени (до 12 месяцев) – такие результаты были получены в исследованиях на кроликах (см. Гати и др. [13]). Таким образом, распад сополимера зависит от от количественного соотношения PGA и PLA. В ряде исследований было показано благоприятное влияние этих сополимеров как на животных, так и на людях [13-18], но мало известно о событиях, которые имеют место на уровне ультраструктуры во время формирования новой костной ткани. Имеющийся в свободной продаже материал-наполнитель, являющийся сополимером PGA и PLA, - это материал Fisiograft® (г. Болонья, Италия), который сочетает в себе оба компонента в равных долях. Этот материал отличается низкой плотностью, и его полная абсорбция происходит в течение 4-8 месяцев. Недавно этот материал был успешно использован как наполнитель для сохранения альвеолярного отростка вслед за удалением зуба [17]. Кроме того, когда плотные и пористые корневые реплики сополимера PLA / PGA закладывались в человеческие альвеолярные лунки непосредственно после удаления зубов, наблюдатели отмечали, что обе формы были биосовместимы и подвержены биораспаду, несмотря на то, что, что плотная форма вызывала легкую вызванную действием молочной кислоты декальцификацию кости на ранних стадиях после наполнения лунки [18].

Одно из первых исследований, выполненных на модели большой берцовой кости у кролика, показало, что сополимер PLA / PGA (Fisiograft®) частично разлагается спустя 30 дней после имплантации его в костные дефекты диаметром 5 мм, в то время как вновь сформированная костная ткань полностью заполняла эти дефекты за 60 дней после наполнения дефекта этим материалом [13]. Мы поставили перед собой задачу протестировать гипотезу о том, что этот сополимер при наполнении им костных дефектов разлагается в течение 30 дней лишь частично. Целью настоящего исследования был анализ мелких деталей взаимоотношений между образованием костной ткани и этим материалом-наполнителем в указанный момент времени. Для исследования использовалась трансмиссионная электронная микроскопия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты на животных и наполнение костных дефектов сополимером PLA/PGA (Fisiograft®)

В этом исследовании были использованы пять кроликов мужского пола белого цвета новозеландской породы весом в среднем 2,5 кг. Условия содержания животных и хирургические процедуры были разрешены «Комитетом по этике» университета Чиети (г. Чиети, Италия). Во время хирургических процедур животные находились под анестезией, выполненной с помощью микстуры Ketamine® (Pfizer, г.Рим, Италия) (50 мг/кг гидрохлорида кетамина) и препарата Rompun*reg (Bayer, г. Милан, Италия) (5 мг/кг ксилазина). Кожу ноги кролика выбривали и обрабатывали антисептическим раствором – 10%-ным повидон-йодом. Для обнажения большой берцовой кости выполняли разрезы на мышцах. На каждой большой берцовой кости с помощью трепана высверливали по три неглубоких отверстия диаметром 5 мм, имитировавших костные дефекты. Эти костные дефекты у кроликов заполняли сополимером PLA/PGA (Fisiograft®, Guimas S.p.a., г. Болонья, Италия), но в разном исполнении. У каждого кролика два случайно выбранных костных дефекта заполнялись этим сополимером в виде гранул, два – в виде тампона с пропиткой, а остальные два в виде геля. Рану закрывали, восстанавливая соприкосновение краев надкостницы, мышц и кожи, путем наложения швов нитями 4-0 Vicryl, и в течение последующих 30 дней заживление ран происходило естественным путем, без процедур. Поскольку предыдущее исследование показало, что созданные в большой берцовой кости кролика 5-миллиметровые дефекты частично заполнились вновь образовавшейся костью в течение 30 дней [13], то необходимости в создании контрольной группы не было.

Обработка тканей для трансмиссионной электронной микроскопии

Спустя 30 дней после наполнения костных дефектов сополимером, животных убивали путем передозировки анестезии. Берцовые кости быстро извлекали и погружали в 2%-ный глутаральдегид + 2,5%-ный формальдегид, смягченный до pH 7,4 путем добавления 0,1M какодилата натрия. Образцы опускали в лабораторный стакан с 40 мл фиксатора комнатной температуры, а затем этот стакан помещали в стеклянный ящичек размерами 20x20 см, наполненный льдом, и этот ящичек в свою очередь ставили в лабораторную микроволновую печь Pelco 3440 (Ted Pella; г. Реддинг, штат Калифорния, США). Термозонд печи опускали в фиксатор, и образцы подвергались облучению токами микроволновых частот при интенсивности 100% в серии разогревов, состоящей из трех периодов по 5 минут с температурой максимум 37°C [19]. После такой фиксации в микроволновой печи образцы переносили в свежий фиксатор и оставляли на ночь при температуре 4°C. Затем их в течение одного часа промывали в 0,1 M буферного какодилата натрия, pH 7,4. Декальцификация берцовых костей выполнялась в течение приблизительно 3 месяцев в водном растворе 4,13% EDTA [20]. После декальцификации берцовые кости распиливали на сегменты с помощью бритвенного лезвия и интенсивно промывали в 0,1M буферного какодилата натрия, pH 7,4. Все образцы обезвоживались в градуированных концентрациях этанола и выкладывались в полимер Спурра (EMS, Форт Вашингтон, штат Пенсильвания, США). На образцы – срезы толщиной 1 μм - наносили толуидин синий. Образцы исследовали в световой микроскоп и области, где имелись границы между вновь образовавшейся костью и сополимером (Рис. 1), были выбраны для подготовки ультратонких срезов. Было изготовлено восемь срезов толщиной восемь нанометров – они вырезались алмазным лезвием на ультрамикротоме Reichert Ultracut E (Leica, г. Буффало, штат Нью-Йорк, США) и выкладывались на медные решетки с 200 ячейками. Затем эти срезы изучались под трансмиссионным электронным микроскопом Jeol 1010 (Jeol, г. Токио, Япония) (подача тока 80 КВ). Анализ выполнялся путем визуального изучения тонкой структуры на границах между материалом-наполнителем и формирующейся костью. Таким образом, никакая количественная оценка в данном исследовании не выполнялась.

Рис. 1. Снимок, полученный под световым микроскопом, из области, ультраструктура которой была изучена в предыдущем исследовании. Часть из двух трабекул вновь образовавшейся кости (B) окружает область, в которой есть сополимер (F). Следует отметить, что костеподобные клетки (Bc) вкраплены в сополимер. Первоначальное увеличение: 1200x.
[Нормальный вид 33K] [Вид при увеличении 118 K]

Результаты

Трабекулы вновь сформированной кости наблюдались у стенок костных дефектов, в которых имелись различные количества сополимера PLA/PGA.

Они радиально расходятся от центра дефекта. Вновь образовавшаяся кость была первичного или незрелого типа; в ней видны остеоциты, вкрапленные в случайном порядке, и их сплетенные скрученные коллагеновые нити, ориентированные во многих направлениях и отличающиеся в этой матрице широкими расстояниями между волокнами (рис. 1).

Между тремя использованными формами сополимера (гранулы, тампон, гель) никаких различий на уровне ультраструктуры обнаружено не было. Поэтому следующие результаты представляют наблюдения, полученные на всех образцах спустя 30 дней после наполнения костных дефектов сополимером PLA/PGA. Изучение на уровне ультраструктуры выявило волокнистый вид сополимера PLA/PGA в центральной области дефектов. Более сильное увеличение позволяет увидеть небольшие области, содержащие аморфный материал, окруженный тонкими нитями сополимера, которые располагаются в совершенно случайном порядке. [Рис. 2 (a, b)].

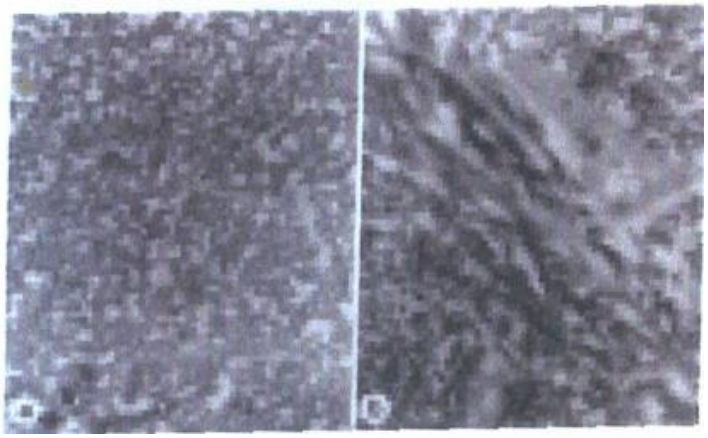

Рис. 2. В электронный микроскоп видна ультраструктура сополимера PLA/PGA, использованная в предыдущем исследовании, в центральной области костного дефекта. Сополимер структурирован тонкими волокнами, которые как на поперечных (a), так и на продольных (b) срезах выглядят аналогично. Обратите внимание на некоторые регионы, в которых аморфный материал (a) присутствует между тонкими нитями сополимера. Первоначальное увеличение: (a) 62900x; (b) 60850x
[Нормальный вид 96К] [Вид при увеличении 380К]

В то время как в некоторых регионах между формирующейся костной тканью и сополимером-наполнителем видна соединительная ткань, в большинстве областей костные трабекулы были расположены непосредственно встык с сополимером. Поверхность сополимера представляла некоторые углубления, в которых были видны порции соединительной ткани. Она содержала богатую коллагеном внеклеточную матрицу, многочисленные фибропласты и кровяные сосуды. В соединительной ткани никакие клетки воспалительного инфильтрата (макрофаги, нейтрофильные лейкоциты и др.) обнаружены не были. В областях, прилежащих к сополимеру, ни макрофаги, ни другие клетки, содержащие сополимер, также не обнаружены. В нескольких областях между сополимером и клетками соединительной ткани находился аморфный материал. Этот материал был на вид однослойным или многослойным и был покрыт несколькими коллагеновыми волокнами и клетками, содержавшими многочисленные анаболические органеллы. [Рис. 3 (a, b)]

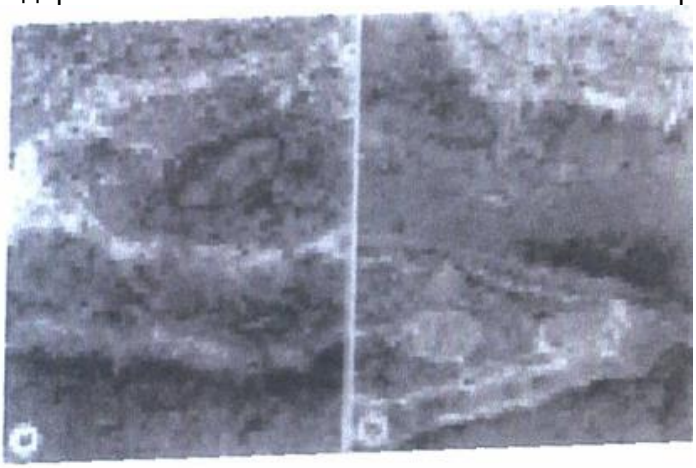

Рис. 3. В электронный микроскоп видно два региона, в которых аморфный материал (a) выглядит как покрытый сополимером PLA/PGA (F). (a) Видно, что соединительная клетка (cn) граничит с аморфным материалом. Тем не менее, надо отметить, что между клеткой и аморфным материалом имеются некоторые коллагеновые волокна (см. стрелки). (b) Видны некоторые соединительные клетки (cn) на входе в поверхность сополимера (F), от которой они отделены тонким слоем аморфного материала. В верхней части снимка можно увидеть, что аморфный материал выглядит как многослойный (см. треугольные стрелки). В той же верхней части снимка видна и часть соединительных клеток (cn), которые находятся рядом с несколькими коллагеновыми волокнами (см. стрелки). Первоначальное увеличение: (a) 16500x, (b) 5750x
[Нормальный вид 95К] [Вид при увеличении 382К]

Там, где аморфный материал отсутствовал, костеподобные клетки восстанавливались непосредственно на сополимере. Они тесно соседствовали с волокнами PLA/PGA и отличались тонкими и длинными выступами, которые вклинивались в сополимер-наполнитель [Рис. 4(a)]. Коллагеновые волокна всегда наблюдались между цитоплазматической мембраной выступов клеток и сополимером [Рис. 4 (b,c)]. Клетки, расположенные на периферийной поверхности сополимера, имели вид, похожий на вид остеобластов с хорошо развитым аппаратом синтеза белков, включая многочисленные системы гранулярной эндоплазматической сети и комплексы Голджи.

Явный слой коллагеновых волокон наблюдался также между мембранами клеток, похожих на остеобласты, и сополимером. [Рис. 4 (d)]. В этих областях пучки коллагеновых волокон перемежались тонкими волокнами сополимера PLA/PGA. Кроме того, небольшие порции сополимера-наполнителя имели аморфный вид, который напоминал тот аморфный материал, который наблюдался в некоторых регионах на периферии (дальше от центра дефекта). [Рис. 4 (e)].

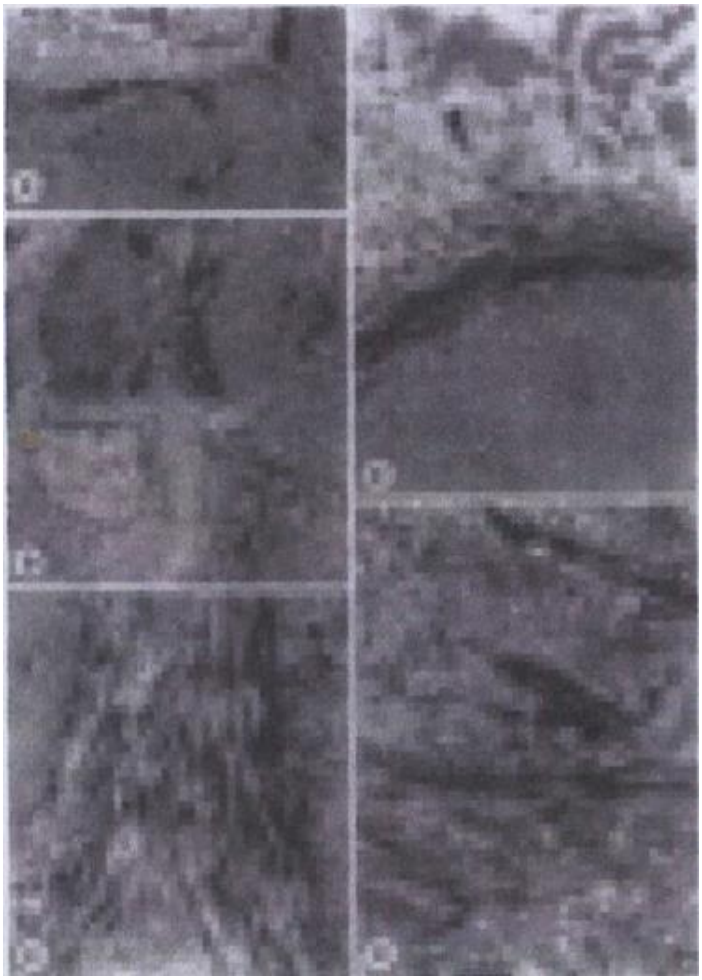

Рис. 4. Под электронным микроскопом видны некоторые аспекты образования кости в тесной связи с сополимером PLA/PGA. (a) Порция остеобластоподобных клеток (Ob) смыкается с сополимером (F). Можно наблюдать тонкий выступ (p), поднимающийся из клетки и вклинивающийся в сополимер. (b) Видно, что клетка, похожая на остеоцит (Oc), окружена сополимером (F). Тем не менее, в этом случае тонкий слой коллагеновых волокон (см. стрелки) отделяет клеточные выступы (p) от сополимера. Основание клеточного выступа, имеющегося на снимке *b*, лучше видно на снимке *c*. (c) Похожие на канальцы проходы, ограниченные с боковых сторон сополимером (F) выглядят так, как будто наполнены коллагеновыми волокнами (см. стрелки). (d) Ясно виден слой коллагеновых волокон (см. стрелки), вклинивающийся между телом клетки, похожей на остеобласт (Ob), и сополимером PLA/PGA (F). Регион внутри массы сополимера при большом увеличении можно рассмотреть на снимке *e*. (e) Наблюдаются пучки коллагеновых волокон (см. стрелки), которыми перемежаются тонкие волокна сополимера (F). Кроме того, в небольшом регионе видны некоторые волокна сополимера, прилегающие к аморфному материалу (a). Первоначальное увеличение: (a) 9900x: (b) 12000x: (c) 40600x: (d) 30000x: (e) 27500x [Нормальный вид 133K] [Вид при увеличении 606K]

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование, выполненное на уровне ультраструктуры, свидетельствует о том, что при использовании сополимер PLA/PGA как материала-наполнителя для костных дефектов, он обладает сотеокондуктивными свойствами.

Хотя уже ранее было показано, что при использовании сополимеров PLA/PGA в качестве материала-наполнителя для костных дефектов происходит образование новой кости [14-16], но данные результаты дополнительно показали, что вновь дифференцировавшиеся остеобласты вырабатывают органическую матрицу в тесном контакте с сополимером. Кроме того, внутренняя структура костных дефектов не содержала регионов, занятых соединительной тканью. Это показывает, что образование кости происходило как процесс, сопровождающий распад полимеров PLA и PGA, что, таким образом, подтверждает остеокондуктивное влияние этого сополимера при использовании его в качестве наполнителя. Гистологические исследования, благодаря которым оценивалось образование кости на уровне увеличения, предоставляемом световым микроскопом, не позволяют добиться ясного понимания взаимоотношений между материалом-наполнителем и формирующейся костью и поэтому в этих исследованиях обычно проводится количественная оценка кости в искусственно созданных костных дефектах через какой-то период времени спустя после наполнения дефекта. Использованный в данной работе подход позволил нам изучить взаимоотношения между клетками, их продуктами и сополимером при более высоком увеличении и по этой причине ни в каких количественных оценках не было необходимости. Биораспад сополимеров изучался с целью установить более оптимальное соотношение полимеров, входящих в этот сополимер в качестве компонентов или для тестирования иных пропорций [15,16]. Хотя это не было целью нашего исследования, но было также установлено, что на уровне ультраструктуры не выявляются никакие различия по эффективности между различными формами, в которых может применяться сополимер PLA/PGA – гранулы, тампон или гель.

Распад сополимера PLA/PGA происходит в результате гидролиза [21, 22]. Таким образом, наполнение костных дефектов сополимером PLA/PGA, который подлежит распаду в течение определенного периода времени, может вмешиваться в нормальный процесс заживления кости, что может привести к неправильному зарастанию. Ожидается, что полное образование кости в искусственно созданных костных дефектах должно происходить без какого-либо материала-наполнителя, поскольку костный дефект был меньше, чем критический размер, установленный для экспериментальных дефектов в больших берцовых костях кролика [23].

Поскольку образование кости происходит в тесном контакте с распадающимся сополимером, нам представляется, что следует ожидать, что этот дефект со временем полностью заполнился бы костью, если образцы были бы изучены через более длительный период времени, когда произошел бы полный распад сополимера PLA/PGA.

Предположительно, аморфный материал, присутствующий внутри сополимера и иногда на его периферии, может являться продуктом частичного распада, и он не обусловлен условиями производства. К такой мысли мы склоняемся, поскольку в большинстве областей материал-наполнитель имеет волокнистый вид. Судя по всему, эти небольшие количества распадающегося материала позволяют ближайшим остеобластоподобным клеткам вырабатывать богатую коллагеном органическую матрицу. Предположительно, эти вырабатываемые клетками коллагеновые волокна сливаются с распадающимся сополимером воедино. Кроме того, мы наблюдали, что остеобластоподобные клетки вырабатывают органическую матрицу без классического тесного контакта, который обычно наблюдается у остеобластов во время образования кости [24]. На самом деле, некоторые остеобластоподобные клетки не формировали непрерывный клеточный слой, и, таким образом, они больше напоминали остеоциты, чем остеобласты. Если установление контакта между остеобластами является условием функции компоновки, которая обязательна при образовании первичной кости, то не похоже, чтобы это происходило в присутствии распадающегося используемого здесь сополимера PLA/PGA. Уже было показано, что стыки между остеобластами играют роль в поддержании полярности клетки [25]. Обычные остеобласты вырабатывают органическую матрицу только по направлению к уникальной стороне клетки. Таким образом, поскольку остеобластоподобные клетки, наблюдаемые в этом исследовании, не устанавливали межклеточных контактов с прилежащими к ним клетками, то возможно, что разлагающийся сополимер мог оказывать какое-то влияние на поляризацию жизнедеятельности клеток. Вопросу, детерминируется ли поляризация остеобластоподобных клеток связыванием сополимера с некоторыми составляющими клеточных мембран, такими как рецепторы, следует посвятить дальнейшие исследования. В последнее время было показано, что взаимодействие между рецепторами (интегринами) остеобластов и сополимерами PLA/PGA ответственно за адгезию клеток в культурах. [26]

С другой стороны, в присутствии более значительных количеств многослойного аморфного материала соседние клетки оказываются похожими на фибробласты; этот факт показывает, что в этих областях не происходит немедленного образования кости. Поэтому возможно, что дифференциация клеток с преобразованием их в остеобластоподобные клетки может зависеть от присутствия небольших количеств разлагающегося материала. Было выдвинуто предположение, что темп распада данного полимера должен быть или таким же или более медленным, чем скорость образования кости [17]. Хотя небольшие области, занятые многослойным аморфным материалом, нельзя назвать обширными, они могут представлять регионы, в которых гидролиза сополимера идет с более высокой скоростью, чем в других областях. Возможно, что эти небольшие области могут отсрочивать заживление костных дефектов в целом. Тем не менее, другая возможность состоит в том, что, может быть, многослойный аморфный материал приводит к образованию цементирующих линий, которые были обнаружены *in vitro* путем использования сополимеров PLA/PGA в другой пропорции (а именно 75:25) [27] (напоминаем, что в данном исследовании использовалась пропорция 50:50). В самом деле, как это показано и отражено в дискуссии выше, большинство исследованных областей, участвующих в образовании кости, отличались наличием типичной коллагеновой костной матрицы, находящейся в тесном контакте с сополимером без каких-либо промежуточных структур.

В целом, несмотря на то, что процесс был изучен только применительно к одному определенному моменту времени, тем не менее, выполненный здесь ультраструктуральный анализ подкрепил высказанные ранее предположения об остеокондуктивных свойствах сополимера PLA/PGA, которые уже использовались в последние годы и показали успешные клинические результаты. Это исследование выявило потенциал использования этого сополимера для регенерации дефектов альвеолярного отростка, а также для целей периодонтальной терапии, поскольку сополимер PLA/PGA подвержен биораспаду и не требует дополнительных хирургических вмешательств.

Признательность
Авторы благодарят Сабрину С.Тесси за оказание технической помощи, Гаспара Ф.деЛима за выполнение ультратонких срезов и Эдсона Оливейра за печать снимков, сделанных с помощью электронной микроскопии.

ЛИТЕРАТУРА

1 Jiang D, Dziak R, Lynch SE, Stephan EB. Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone

mineral matrix with growth factors. *J Periodontol* 1999; **70**: 834-839. Links

2 Orsini G, Ricci J, Scarano A, Pecora G, Petrone G, Iezzi, G, Piattelli A. Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit. *J Biomed Mater Res* 2004; **15**: 68B: 199-208. Links

3 Guarnieri R, Pecora G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Orsini G, Piattelli A. Medical grade calcium sulfate hemihydrate in healing of human extraction sockets: clinical and histological observations at 3 months. *J Periodontol* 2004; **75**: 902-908. Links

4 Strub JR, Gaberthüel TW, Firestone AR. Comparison of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. *J Periodontol* 1979; **50**: 624-629. Links

5 Kim CK, Choi EJ, Cho KS, Chai JK, Wikesjö UM. Periodontal repair in intrabony defects treated with a calcium carbonate implant and guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1996; **67**: 1301-1306. Links

6 Souyris F, Pellequer C, Payrot C, Servera C. Coral, a new biomedical material. *J Maxillofac Surg* 1985; **13**: 64-69. Links

7 Ouhayoun JP. Histological evaluation of natural coral skeleton as a grafting material in miniature swine mandible. *J Mater Sci Med* 1992; **3**: 222-228. Links

8 Kenney EB, Lekovic V, Han T, Carranza FA Jr., Dimitrijevic B. The use of porous hydroxyapatite implant in periodontal defects. I. Clinical results after six months. *J Periodontol* 1985; **56**: 82-88. Links

9 Kenney EB, Lekovic V, Sa Ferreira JC, Han T, Dimitrijevic B, Carranza FA Jr. Bone formation within porous hydroxyapatite implants in human periodontal defects. *J Periodontol* 1986; **57**: 76-83. Links

10 Carranza FA Jr., Kenney EB, Lekovic V, Talamante E, Valencia J, Dimitrijevic B. Histologic study of healing of human periodontal defects after placement of porous hydroxyapatite implants. *J Periodontol* 1987; **58**: 682-688. Links

11 Barnett JD, Mellonig JT, Gray JL, Towle HJ. Comparison of freeze-dried bone allograft and porous hydroxyapatite in human periodontal defects. *J Periodontol* 1989; **60**: 231-237. Links

12 Leenslag JW, Pennings AJ, Bos RRM, Rozema FR, Boering G. Resorbable materials of poly(L-Lactide).VI. Plates and screws for internal fracture fixation. *Biomaterials* 1987; **8**: 70-73. Links

13 Gatti A, Monari E, Tanza D, Betti V. Evaluation of the biocompatibility of grafts for bone defects. *Minerva Stomatol* 1999; **48**: 47-52. Links

14 Piattelli A, Scarano A, Russo P, Maratasso S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. *Biomaterials* 1996; **17**: 791-796. Links

15 Holy CE, Dang SM, Davies JE, Shoichet MS. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials* 1999; **20**: 1177-1185. Links

16 Holy CE, Fialkov JA, Davies JE, Shoichet MS. Use of a biomimetic strategy to engineer bone. *J Biomed Mater Res* 2003; **65**: 447-453. Links

17 Serino G, Biancu S, Iezzi G, Piattelli A. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clin Oral Impl Res* 2003; **14**: 651-658. Links

18 Nair Pn PR, Schug J. Observations on healing of human tooth extraction sockets implanted with bioabsorbable polylactic-polyglycolic acids (PLGA) copolymer root replicas: a clinical, radiographic, and histologic follow-up report of 8 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; **97**: 559-569. Links

19 Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci* 2000; **108**: 74-77. Links

20 Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1967; **15**: 542-549. Links

21 Chu CC. Hydrolytic degradation of polyglycolic acid: tensile strength and crystallinity study. *J Appl Polym Sci* 1981; **26**: 1727-34. Links

22 Vert M, Li S, Garreau H. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based

on lactic and glycolic acids. *Clin Mater* 1992; **10**: 3-8. Links

23 Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair material. *J Craniofac Surg* 1990; **1**: 60-68. Links

24 Soares AMV, Arana-Chavez VE, Reid, AR, Katchburian E. Lanthanum tracer and freeze-fracture studies suggest that compartmentalisation of early bone matrix may be related to initial mineralisation. *J Anat* 1992; **181**: 345-356. Links

25 Arana-Chavez VE, Soares AMV, Katchburian E. Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron microscopy. *Arch Histol Cytol* 1995; **58**: 285-292. Links

26 Di Toro R, Betti V, Spampinato S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly (DL-lactide-co-glycolide) copolymers. *Eur J Pharm Sci* 2004; **21**: 161-169. Links

27 Karp JM, Shoichet MS, Davies JE. Bone formation on two-dimensional poly(**DL**-lactide-*co*-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 2003; **64A**: 388-396. Links