І.В. Челпанова

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького Львів, Україна

Надійшла: 21.04.2022 Прийнята: 27.05.2022

DOI: https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.2.60-68

УДК: 616.714-089.843-073.7-018.1

ПЕРЕБУДОВИ КІСТКИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ОКТАКАЛЬЦІЙФОСФАТУ: ГІСТО-ЛОГІЧНІ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ АСПЕКТИ

Chelpanova I.V. ២ 🖂 Mandibular bone restructuring after of octacalcium phosphate transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. This article presents the research results of the histological, immunohistochemical, and ultrastructural characteristics of bone-ceramic regenerate after octacalcium phosphate transplantation into an experimental defect in the rabbit mandible, since complete and high-quality regeneration of maxillofacial bones, its mechanisms and dynamics remain not fully understood, need clarification and detailing. Aim. To study in an experiment the dynamics of histological, immunohistochemical, and ultrastructural changes in the lower jaw bone after its traumatic injury with subsequent replacement of the defect with octacalcium phosphate. Methods. Experiments were conducted on 45 male rabbits aged 6-7 months, weighing 2.5-3.0 kg. 20 animals constituted the control group, and 20 the experimental group. Another 5 intact animals were used to study the normal structure of the bone tissue of the studied area of the mandible. The control group included animals with a bone tissue defect that healed under a blood clot. The experimental group consisted of rabbits where the bone defect was filled with modified natural octacalcium phosphate (OCP-N). Post-traumatic bone tissue status within the defect area was monitored for 84 days using the following methods: bone defect modeling, light-optical assessment of the histostructure of decalcified bone sections, immunohistochemical determination of the expression of markers CD34, Calcitonin, Ki-67, transmission electron microscopy. Results and conclusion. The osteoconductive effect of exogenously modified natural octacalcium phosphate is realised through accelerated neoangiogenesis with migration of osteoprogenitor cells from the periphery towards the deep zone of the bone-ceramic regenerate and, also, through the formation of numerous osteogenic islands throughout its volume within the first three weeks post-implantation. Four weeks post-implantation of OCP-N, anastomosis of the islands of desmal osteogenesis with each other and with the regenerated trabeculae of the native bone results in the formation of a continuous cancellous structure of the regenerate. This structure consists of woven bone trabeculae and fragments of exogenous octacalcium phosphate. Simultaneously, periosteal regeneration occurs on the implant surface, with activation of osteoclasts in the peripheral trabeculae of the bone-ceramic regenerate. The remodeling processes extend from the periphery to the deep zone of the regenerate, which leads to the replacement of the woven bone trabecular tissue with primitive bone plates with accelerated cytodifferentiation of numerous osteocytes. 5 weeks after implantation, osteocytes with ultrastructural signs of maturity appear near the restored mineralized osteons of the native bone and on the surface of the implanted octacalcium phosphate granules in the inner areas of the regenerate. Eight weeks post-implantation of OCP-N, compaction of the newly formed trabeculae near the regenerated periosteum leads to normalization and stabilization of the osteon histoarchitecture in the peripheral zones of the regenerate, which becomes fully integrated with the native bone. In the deeper zone, the slower processes of membranous osteogenesis are replaced by active remodeling with the formation of immature osteocytes and primitive bone lamellae. Twelve weeks post-implantation of OCP-N, the majority of the bone-ceramic regenerate contains a fully restored osteocyte lacunocanalicular system. In the deeper zone of the regenerate, some foci of coarse fibrous bone tissue remain. These contain a moderate number of activated osteoclasts, secretory active mechanocytes without immunohistochemical signs of proliferation, and small areas of fibrosis without remnants of the implanted material.

Key words: lower jaw/mandible, dentoalveolar system, bone tissue, regeneration, octacalcium phosphate, histostructure, immunohistochemistry, ultrastructure.

Citation:

Chelpanova IV. [Mandibular bone restructuring after of octacalcium phosphate transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects]. Morphologia. 2022;16(2):60-8. Ukrainian. **DOI: https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.2.60-68**

Chelpanova I.V. 0000-0001-5215-814X
ilona.med75@gmail.com
Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Сучасні стратегії остеорегенерації стають пріоритетним напрямком стоматології та пластичної реконструктивної медицини, оскільки мільйони людей страждають від втрати кісткової маси. На сьогодні відомо, що щорічно в світі проводиться понад два мільйони оперативних втручань з метою трансплантації кісток. Згідно статистики, ці процедури посідають друге місце після гемотрансфузій [1]. Остеопластика – широко поширений метод лікування кісткових дефектів. Вибір матеріалу для даної процедури залежить від низки факторів, зокрема: доступність, біологічні властивості, біомеханічні властивості, розмір дефекту та потенційні ускладнення. Типовими прикладами застосування остеоплстики є заповнення кісткових дефектів спричинених травмами [2], синус-ліфтинг та встановлення зубних імплантатів або заміщення кісткових дефектів після остеотомії [3, 4].

Одним із найпопулярніших матеріалів для заповнення кісткових дефектів є октакальційфосфат. Він швидко резорбується в організмі, а його структура легко замінюється природною кістковою тканиною [5]. Вдосконалений кристалічний октакальційфосфат сприяє чинникам, що стимулюють остеорегенерацію [6]. Він давно став одним з найчастіше використовуваних ксеногенних матеріалів, особливо в стоматології [7]. Значну увагу дослідників привернули клітинні та тканинні перебудови, що відбуваються під час загоєння експериментальних кісткових дефектів, в тому числі після використання остеотропних матеріалів [8]. На особливу увагу заслуговують дослідження, що стосуються ультраструктурних перебудов різноманітних клітин механоцитарних популяцій та стану міжклітинного матриксу в ході остеорегенерації при моделюванні кісткових дефектів. [9]. Також, велике значення в останнє десятиліття набули дослідження шодо визначення імуногістохімічних характеристик клітинного, волокнистого та мікроциркуляторного компонентів під час регенераторних перетворень кісткової тканини та при її взаємодії з остеотропними матеріалами [10].

Мета дослідження – визначити динаміку гістологічних, імуноморфологічних та ультраструктурних змін у кістці нижньої щелепи кролика після її травматичного ушкодження із наступним заміщенням дефекту остеопластичним матеріалом з октакальційфосфатом.

Матеріали та методи

Дослідження було проведено на 45 статевозрілих кроликах-самцях віком 6-7 місяців, вагою 2,5-3 кг. Тварини були розділені на контрольну та експериментальну групу (по 20 тварин кожна). Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. Тваринам контрольної та експериментальної груп під загальним наркозом, шляхом внутрішньоочеревиного введення Тіопенату («Брофарма», Україна), з розрахунку 25 мг/кг маси тіла тварини на рівні міжзубної ділянки коміркової частини нижньої щелепи за допомогою стоматологічного бора створювали кістковий дефект розміром 4х3 мм.

До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини, який загоювався під кров'яним згустком. Експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали остеотропним матеріалом Compact BoneB («Dentegris», Німеччина), який містить натуральний октакальційфосфат (ОКФ-Н). Дослідження стану кісткової тканини в ділянці нанесеного дефекту здійснювали через 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 та 84 доби після нанесення травми. В усі вказані терміни проводили світлооптичну оцінку гістоструктури декальцинованої кістки, імуногістохімічне визначення експресії маркерів CD34, Calcitonin, Ki-67, а також ультраструктурний аналіз з використанням трансмісійної електронної мікроскопії.

Для гістологічного дослідження фрагменти кістки нижньої щелепи в зоні експериментального дефекту фіксували у 10%-ному розчині формаліну, демінералізували у 10%-ному водному розчині азотної кислоти, проводили у спиртах висхідної концентрації з подальшою заливкою у парафін. Отримані з блоків зрізи товщиною 5-7 мкм депарафінували та забарвлювали гематоксиліном і еозином [11, 12].

Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно протоколів компанії TermoScientific (США). Після депарафінізації, регідратації, температурного демаскування антигенів та пригнічення активності ендогенної пероксидази проводили інкубацію зрізів з первинними моноклональними кролячими антитілами CD34 (OBEnd/10; 1:250), Calcitonin (SP17; Ready to use), Ki-67 (SP6; 1:250) у вологих камерах при температурі 23-25°С протягом 30 хвилин. Використовували візуалізації UltraVision систему Ouanto (LabVision). Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (DAB) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення. Далі додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини з наступною дегідратацією та закріпленням бальзамом за стандартною процедурою [13, 14].

Для ультраструктурного дослідження демінералізовані зразки нижньої щелепи фіксували при температурі +2°С протягом 3-4 годин у 2,5%-ному розчині глутарового альдегіду в 0,2М фосфатному буфері (pH=7,4) з наступною постфіксацією протягом 1 години в 1%-ному забуференому (pH=7,4) розчині чотириокису осмію («SPI», США), дегідратацією в спиртах і пропіленоксиді та виготовленням епоксидних блоків з використанням епон-аральдитової композиції. Ультратонкі зрізи розміщали на мідних сітках і здійснювали подвійне контрастування за методом Рейнольдса [15]. Дослідження проводили на трансмісійному електронному мікроскопі ПЕМ-100-01 («SELMI», Україна) при прискорювальній напрузі 75 кВ і первинних збільшеннях від 1500 до 25000 за стандартною схемою [16].

Всі процедури, що стосувалися питань утримання, догляду, маркування тварин та всі інші маніпуляції проводилися із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Закону України № 3447 – IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» згідно з директивою Ради ЄС 2010/63/ЕU про дотримання постанов, законів, адміністративних положень Держав ЄС з питань захисту тварин, які використовуються з науковою метою [17, 18].

Результати та їх обговорення

Гістологічне вивчення препаратів демінералізованої нижньої щелепи через одну добу після нанесення експериментального дефекту та імплантації матеріалу ОКФ-Н показало наявність численних дрібних крововиливів та тромбоутворення в просвітах зруйнованих мікросудин. Виразний периваскулярний та інтерстиційний набряк був характерний для загальної гістоструктури періосту і м'яких тканин поблизу дефекту. Лейкоцитарна інфільтрація мала обмежений ступінь. У материнській кістковій тканині по краях шахти візуалізувались дрібні скупчення фібринових мас і гемосидеринові накопичення, прояви стазу та деформації формених елементів крові в просвітах вцілілих мікросудин. Остеони материнської кістки містили численні резорбційні лакуни, а також гомогенізовані пластинки. На електронограмах спостерігались поодинокі активовані остеокласти, що свідчило про незначну резорбцію ушкоджених кісткових пластинок та підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням парафінових зрізів Calcitonin-SP17клональними антитілами. На тлі гомогенізації кісткового матриксу спостерігались прояви інтрацелюлярного набряку остеоцитів, інтерстиційного набряку та деструкції фібрил. У складі періосту поблизу дефекту не виявлялось будьяких ознак неоваскулогенезу, фіброзування або проліферації фібробластів. Визначення маркера Кі-67 виявило незначну проліферативну активність клітин різних диферонів у даній локалізації, за виключенням ендотеліоцитів. На поверхні ушкоджених кісткових трабекул на межі з імплантованим матеріалом поблизу ендосту спостерігались примітивні гемокапіляри та ендотеліальні тяжі у формі паростків в супроводі фібробластів, що свідчило про утворення грануляційної тканини по краях експериментального дефекту та підтверджувалось інтенсивним імуногістохімічним забарвленням в реакції з маркером Кі-67 у ядрах фібробластів і ендотеліальних клітин ендосту.

Через один тиждень після експериментальної травми та імплантації матеріалу ОКФ-Н поряд із незначними ознаками травматичного запалення навколо зони дефекту виявлялась істотна дезорганізація і деструкція материнської пластинчастої кістки, спостерігалась гомогенізація кісткового матриксу, зростала площа резорбційних порожнин, заповнених детритом, фібриноїдом або гемосидериновими депозитами. Травмовані остеони і кісткові трабекули по краях дефекту набували горбистих контурів внаслідок утворення численних виростів остеоїду на їх поверхні. У таких ділянках поряд із поодинокими остеокластами навколо гемокапілярів спостерігалась значна кількість відокремлених один від одного остеобластів, які імуногістохімічно при вивченні маркера Кі-67 виявляли інтенсивне забарвлення. При електронномікроскопічному дослідженні навколо остеобластів виявлялись хаотично угруповані колагенові волокна, занурені у гомогенний органічний матрикс.

Наприкінці першого тижня експерименту в периферичних ділянках регенерату, на відміну від групи контролю, виявлялась значна кількість острівців десмального остеогенезу зі щільним вмістом новоутворених примітивних мікросудин і гетероморфних клітин – фібробластів, остеобластів та їх недиференційованих попередників. Інтенсивне накопичення маркера Кі-67 в ядрах означених механоцитів свідчило про їхню високу проліферативну активність на периферії регенерату. Значна щільність CD34-позитивних структур у вигляді примітивних гемокапілярів або ендотеліальних паростків вказувала на активний неоваскулогенез в даній локалізації. Гематогенні клітини навколо гемокапілярів зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. На електронограмах поблизу остеобластів в остеогенних острівцях спостерігались невпорядковані колагенові волокна з ознаками незрілості, рідко угруповуючись у невеличкі пучки. У складі остеоїду острівців десмального остеогенезу колагенові волокна за площею поступалися аморфному компоненту.

Протягом 2-го і 3-го тижнів після імплантації модифікованого натурального октакальційфосфату запальні прояви у материнській кістці та структурах пародонту поблизу зони дефекту редукувались. Ознаки дезорганізації кісткової тканини та гомогенізації кісткового матриксу навколо зони травми зберігались в окремих випадках. Резорбційні порожнини з вмістом тканинного детриту, фібрину або гемосидерину зустрічались рідко. По краях ушкодженої материнської

кістки на поверхні травмованих остеонів і кісткових трабекул спостерігались численні гетероморфні вирости остеоїдної структури, які були занурені у товщу репаративного регенерату між остеогенними острівцями або анастомозували з ними. Вирости трабекул материнської кістки містили повнокровні гемокапіляри в оточенні незначної кількості остеокластів та сполучались з мікросудинами відновленого ендосту. Остеокласти були представлені переважно компактними овальними формами; остеокласти по краях трабекул, що занурювались всередину регенерату, мали ознаки активації, що вказувало на їх ймовірну участь у процесі об'єднання материнських відновлених трабекул з новоутвореними трабекулами регенерату. Остеобласти за чисельністю значно переважали над іншими клітинами і розташовувались поодинці в товщі органічного матриксу остеоїдних виростів від спікул і трабекул материнської кістки. При вивченні експресії маркера проліферації Кі-67 переважна кількість імуногістохімічної мітки накопичувалась в ядрах остеобластів, у той час як ядра остеокластів, остеоцитів і ендотеліальних клітин істотного проліферативного потенціалу не виявляли. Вивчення Calcitonin-SP17-клональних антитіл показало відсутність суттєвої резорбційної активності остеокластів в основі материнських трабекул та, навпаки, їх суттєву активацію на верхівках відновлених трабекул і зростаючих спікул. Застосування маркера CD34 виявило помірний ступінь васкуляризації материнської губчастої кістки. При електронномікроскопічному дослідженні остеоїд у даній локалізації містив незначну кількість слабко орієнтованих пучків колагенових волокон навколо відокремлених один від одного остеобластів з ознаками помірної синтетичної активності.

На периферії кісткового регенерату протягом 2-3-го тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н утворювалась значно більша, ніж у контрольній групі тварин, кількість і щільність осередків перетинчастого остеогенезу. Остеогенні остівці анастомозували з утворенням трабекул, а також об'єднувались з горбистими кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. В їх складі візуалізувались численні гемокапіляри в оточенні остеобластів, які розташовувались поодинці або утворювали групи поблизу клітинпопередниць (рис. 1).

У міжтрабекулярних просторах зосереджувались поодинокі фібробласти та численні недиференційовані клітини остеогенного диферону. При трансмісійній електронній мікроскопії у складі остеоїду новоутворених трабекул визначались колагенові волокна різного ступеня зрілості та їх гетероморфні пучки з невпорядкованою орієнтацією, які суттєво поступалися за площею аморфному матриксу низької електронної щільності. Ультраструктура остеобластів, що розташовувались поблизу верхівок відновлених материнських трабекул, свідчила про їх помірну синтетичну активність. Навпаки, остеобласти всередині керамічно-кісткового регенерату містили розвинений комплекс Гольджі та численні елементи гранулярної ендоплазматичної сітки. Інтенсивне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Кі-67 спостерігалось переважно в ядрах клітин-попередниць остеобластів; маркера CD34 – у мембранах і цитоплазмі ендотеліальних клітин на периферії регенерату. Остеокласти та інші гематогенні клітини зустрічались у незначній кількості, Calcitonin-SP17-позитивні клітинні елементи не виявлялися.



Рис. 1. Електронна трансмісійна мікрофотографія фрагмента периферичної зони регенерату нижньої щелепи кролика через 5 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н. 1 – остеобласт; 2 – малодиференційована остеогенна клітина. ×2500.

У глибокій зоні кістково-керамічного регенерату спостерігались ознаки активного неоваскулогенезу, що на третьому тижні спостережень проявлялось утворенням численних примітивних не заповнених еритроцитами мікросудин або ендотеліальних паростків. Частина новоутворених гемокапілярів мала заповнений еритроцитами просвіт та суцільну ендотеліальну стінку в оточенні сполучнотканинних елементів. На відміну від групи контролю, навколо таких морфологічно і функціонально зрілих мікросудин візуалізувались острівці десмального остеогенезу, в той час як осередки хрящового матриксу не виявлялись. Осередки фіброзування в глибокій зоні регенерату зустрічались у незначній кількості і були невеликими за площею.

Через 4-5 тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н по краях дефекту спостерігались радіально орієнтовані новоутворені з боку материнської кістки трабекули, які занурювались в товщу регенерату та анастомозували з грубоволокнистою кістковою тканиною новоутворених трабекул з формуванням спільного безперервного ендосту. У ділянках компактної материнської кістки ознаки посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу спостерігались в помірному ступені. Поблизу мікросудин каналів Гаверса візуалізувались активні остеокласти, що підтверджувалось при імуногістохімічному дослідженні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Численні лакуни Гаушипа вказували на інтенсивне відновлення ушкоджених унаслідок травми кісткових пластинок материнської кістки. На відміну від контрольної крупи, на поверхні кістково-керамічного регенерату відбувалося активне відновлення клітинного, волокнистого і мікросудинного компонентів періосту, причому через 4 тижні експерименту серед остеогенних клітин переважали остеопрогеніторні елементи, а через 5 тижнів – остеобласти. Поблизу ендосту материнської губчастої кістки спостерігались численні остеобласти, які розташовувались ізольовано або групами в товщі органічного матриксу відновлених трабекул. Остеобласти за чисельністю переважали над іншими клітинами в тих трабекулах і спікулах, які заглиблювались всередину регенерату. Інтенсивне накопичення імуногістохімічної мітки Кі-67 вказувало на високу проліферативну активність остеобластів, на відміну від інших сполучнотканинних клітин. Електронна мікроскопія виявляла високу синтетичну активність остеобластів. На відміну від контрольної групи, остеоїд у даних трабекулах містив значну кількість сформованих колагенових волокон, об'єднаних у пучки, з їх суттєвим переважанням над аморфним матриксом.

Кістково-керамічний регенерат у своїх периферичних і внутрішніх зонах містив губчасту структуру поліморфних трабекул, одна частина з яких утворювалась за рахунок відновлення травмованих трабекул материнської кістки, а інша – за рахунок росту та об'єднання численних острівців десмального остеогенезу. В грубоволокнистих трабекулах кількісно переважали остеобласти. Кількість остеокластів була значно вишою. ніж у попередній термін експерименту і при порівнянні з групою контрольних тварин. Значна частина остеокластів мала ознаки активації на ультраструктурному рівні, що підтверджувалось при імуногістохімічному дослідженні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл і вказувало на початок ремоделювання периферичних ділянок грубоволокнистої кісткової тканини вже через 4 тижні після імплантації матеріалу ОКФ-Н. Такі остеокласти зустрічались переважно на межі кістково-керамічного регенерату з пластинчастою кістковою тканиною кортикальної пластинки материнської кістки, а також при переході відновлених трабекул материнської губчастої кістки в новоутворені грубоволокнисті трабекули регенерату. Трансмісійна електронна мікроскопія показала, що під час ремоделювання у складі більшості трабекул утворювалися щільно упаковані колагенові волокна з формуванням паралельних пучків і примітивних кісткових пластинок. Поряд із пластинками або між ними визначались гетероморфні великі за розмірами остеоцити зі збереженими елементами комплексу Гольджі і гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, що свідчило про їх структурнофункціональну незрілість. Частина остеоцитів поблизу відновлених остеонів материнської кістки, навпаки, набувала характерних зрілих ознак. Важливим фактом, що спостерігався через 5 тижнів експерименту, була поява зрілих остеоцитів на поверхні гранул імплантованого октакальційфосфату у внутрішніх ділянках регенерату, що свідчить про ініціювальний вплив мінералізації на цитодиференціювання остеоцитів не лише з боку відновлених трабекул материнської кістки, а й з боку екзогенних гранул октакальційфосфату.

У внутрішніх зонах кістково-керамічного регенерату, на відміну від групи контролю, виявлялись численні острівці десмального остеогенезу, а також примітивні грубоволокнисті кісткові трабекули з великим вмістом гемокапілярів. Фіброзування було незначним, осередки хрящового остеогенезу не виявлялися. На відміну від периферичних трабекул, ознаки ремоделювання в глибокій зоні регенерату зустрічалися рідко. В ядрах остеобластів спостерігалась інтенсивна експресія маркера проліферації Кі-67. Імуногістохімічний розподіл маркера CD34 вказував на значну васкуляризацію глибокої зони кістковокерамічного регенерату, що пояснювало обмежене фіброзування даної зони і відсутність острівців хрящового остеогенезу.

На восьмому тижні після імплантації матеріалу ОКФ-Н спостерігалося повне відновлення загальної тканинної структури періосту в зоні ушкодження на поверхні регенерату та формування остеоцитарної лакуно-канальцевої системи у складі материнської кістки навколо експериментального дефекту. Загальна тканинна архітектура і розподіл клітинних субпопуляцій, а також досліджувані імуногістохімічні і ультраструктурні характеристики материнської кісткової тканини коміркової частини нижньої щелепи після остеопластики ОКФ-Н не відрязнялись від групи інтактних тварин.

На периферії кісткового регенерату новоутворені трабекули складалися переважно з пластинчастої кістової тканини та містили розгалужену сітку мікросудин. Поліморфні кісткові пластинки примітивних остеонів межували з остеокластами, частина яких була представлена активованими формами поблизу резорбційних лакун. Інша частина остеокластів інтенсивно накопичувала Calcitonin-SP17-мітку, що вказувало на гальмування їх резорбтивної активності. Поблизу відновленого періосту спостерігались зрілі остеоцити з розвинутими відростками у складі компактизованих кісткових пластинок. Також зрілі остеоцити переважали в пластинчастій кістковій тканині новоутворених трабекул, що складати губчасту структуру периферичних і внутрішніх ділянок регенерату. У заглиблених трабекулах спостерігались ознаки ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини. В локусах формування кісткових пластинок навколо численних остеобластів пучки щільно упакованих паралельних колагенових волокон межували з осередками невпорядкованих фібрил та аморфним матеріалом низької електронної щільності. Остеоцити між новоутвореними пластинками мали ознаки структурно-функціональної незрілості – на електронограмах в цитоплазмі великих гетероморфних остеоцитів візуалізувались елементи комплексу Гольджі та гранулярної ендоплазматичної сітки. Як і на попередньому терміні експерименту, частина остеоцитів на поверхні гранул імплантату у внутрішніх ділянках регенерату мала ознаки структурно-функціональної зрілості, що підтверджувало ініціацію визрівання остеоцитів з боку екзогенного октакальційфосфату.

Загальна структура лакуно-канальцевої системи на периферії кістково-керамічного регенерату виглядала помірно розвиненою і в цілому сформованою, хоча остеональна геометрія значно варіювала. У міжтрабекулярних просторах новоутвореної губчастої кістки візуалізувались окремі ділянки міслоїдної тканини. Інтеграція поверхні репаративного регенерату з материнською кісткою через 8 тижнів аугментації ставала повною, межа між новоутвореними требекулами і материнською губчастою кісткою на світлооптичному рівні не візуалізувалась.

Глибока зона регенерату через 8 тижнів після імплантації ОКФ-Н була представлена гетероморфною губчастою структурою з переважанням примітивних кісткових пластинок у складі трабекул і помірною кількістю залишків грубоволокнистої тканини. Трансмісійна електронна мікроскопія показала високий вміст хаотично розташованих колагенових фібрил та їх пучків поблизу остеобластів, які мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності, і остеоцитів, які розташовувались між гетероморфними пучками волокон (рис. 2).

При порівнянні з попереднім терміном спостережень кількість остеобластів помітно зменшувалась, в той час як щільність остеоцитів ставала більшою. На відміну від спостережень у контрольній групі, обмежена кількість активних остеокластів Calcitonin-SP17-3 низькою реактивністю виявлялася лише у ділянках грубоволокнистої кісткової тканини тієї незначної частини кісткових трабекул, що піддавалися ремоделюванню. Прояви фіброзування глибокої зони регенерату редукувалися у порівнянні з попереднім терміном дослідження. Сполучнотканинні ділянки навколо мікросудин зустрічалися рідко та мали вигляд тонких прошарків, збагачених на хаотично угруповані колагенові волокна.



Рис. 2. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 8 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н. 1 – фрагмент цитоплазми остеоцита; 2 – пучки колагенових волокон кісткових пластинок; 3 – ділянка грубоволокнистої кісткової тканини. ×4000.

Через 12 тижнів після імплантації модифікованого натурального октакальційфосфату поряд із повним відновленням структури періосту в зоні ушкодження відбувалось формування остеоцитарної лакуно-канальцевої системи з ознаками типової будови у зоні зовнішньої кісткової пластинки. На відміну від групи контролю, після застосування ОКФ-Н осередки незавершеного остеогенезу або неповного ремоделювання не виявлялись, остеони регенерату за своєю структурою та геометрією не відрізнялись від будови інтактної материнської кістки.

Кісткові трабекули в периферичних ділянках регенерату містили розвинену мікросудинну сітку та суттєво меншу у порівнянні з попереднім терміном кількість остеогенних клітин. Низька інтенсивність імуногістохімічної мітки проліферативного маркера Кі-67, а також невелика кількість остеокластів і остеобластів поряд із наявністю зрілих остеоцитів свідчили про завершення процесів ремоделювання периферичних і внутрішніх трабекул регенерату. Мікроархітектура та форма остеонів регенерату не відрізнялись від типової будови остеонів материнської кістки поблизу експериментального дефекту та від структури інтактних остеонів. При трансмісійній електронній мікроскопії між пучками паралельних колагенових волокон сусідніх кісткових пластинок візуалізувались рівномірні прошарки аморфного матеріалу низької електронної щільності, що опосередковано свідчило про завершений характер мінералізації кісткового матриксу. Як і в контрольній групі, після застосування ОКФ-Н спостерігалося утворення мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах на периферії репаративного регенерату, в той час як глибока зона регенерату осередків кровотворення не містила. Інтеграція поверхні кістковокерамічного регенерату з материнською кісткою була повною.

У глибокій зоні регенерату трабекули складалися зі сформованих кісткових пластинок і за своєю мікроархітектурою, на відміну від контрольної групи тварин, не відрізнялись від зрілих структур материнської кістки. При ультраструктурному дослідженні вони містили щільно упаковані паралельні фібрили з незначною часткою аморфного матеріалу новоутвореного остеоїду. Переважна частина остеоцитів між кістковими пластинками мала ознаки структурнофункціональної зрілості (рис. 3).



Рис. 3. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н. 1 – ядро незрілого остеоцита; 2 – залишки цитоплазми остеоцита; 3 – пучки колагенових волокон кісткових пластинок. ×3000.

В окремих глибоких ділянках регенерату зустрічались дрібні осередки грубоволокнистої кісткової тканини, які містили помірну кількість активованих остеокластів, проте без залишків імплантованого матеріалу. Пластинчаста тканина трабекул губчастої кістки регенерату містила остеокласти з обмеженою функціональною активністю. Між варіативними за формою кістковими трабекулами без ознак ремоделювання спостерігались дрібні вогнища фіброзування, які містили поодинокі фібробласти та помірну кількість СD34-позитивних ендотеліальних елементів. При трансмісійній електронній мікроскопії в ділянках фіброзу візуалізувались зрілі гемокапіляри з суцільною ендотеліальною стінкою і замкнутими міжендотеліальними контактами в оточенні гетероморфних пучків колагенових волокон з хаотичною орієнтацією. За своєю загальною площею дрібні осередки фіброзу поступалися контрольній групі. Аналіз розподілу експресії маркера Кі-67 виявив редукцію проліферативної активності механоцитів і обмежений проліферативний потенціал ендотеліоцитів у трабекулах глибокої зони регенерату, що свідчило про частково незавершений характер ремоделювання кісткової тканини в глибокій зоні регенерату.

Висновки

1. Остеокондуктивний ефект екзогенного модифікованого натурального октакальційфосфату реалізується через прискорення неоваскулогенезу з міграцією остеопрогеніторних клітин в напрямку від периферії до глибокої зони кістково-керамічного регенерату та через утворення численних остеогенних острівців по всьому його об'єму в перші три тижні після імплантації. Внаслідок анастомозування острівців десмального остеогенезу між собою та з відновленими трабекулами материнської кістки через 4 тижні після імплантації ОКФ-Н формується суцільна губчаста структура регенерату, яка складається з грубоволокнистих трабекул і фрагментів екзогенного октакальційфосфату, а також здійснюється відновлення періосту на поверхні імплантату з активацією остеокластів у периферичних трабекулах кістково-керамічного регенерату. Процеси ремоделювання поширюються від периферії до глибокої зони регенерату, що призводить до заміни грубоволокнистої тканини трабекул на примітивні кісткові пластинки з прискореним цитодиференціюванням численних остеоцитів. Через 5 тижнів після імплантації остеоцити з ультраструктурними ознаками зрілості з'являються поблизу відновлених мінералізованих остеонів материнської кістки і на поверхні гранул імплантованого октакальційфосфату у внутрішніх ділянках регенерату.

2. Через 8 тижнів після імплантації ОКФ-Н на тлі компактизації новоутворених трабекул поблизу відновленого періосту відбувається нормалізація і стабілізація гістоархітектоніки остеонів у периферичних зонах регенерату, який повністю інтегрується з материнською кісткою. В глибокій зоні уповільнені процеси перетинчастого остеогенезу змінюються на активне ремоделювання з утворенням незрілих остеоцитів і примітивних кісткових пластинок. Через 12 тижнів після імплантації ОКФ-Н переважна частина кістково-керамічного регенерату містить повноцінно відновлену остеоцитарну лакуноканальцеву систему. В глибокій зоні регенерату залишаються окремі осередки грубоволокнистої кісткової тканини, які містять помірну кількість активованих остеокластів, секреторно активні механоцити без імуногістохімічних ознак проліферації, а також дрібні ділянки фіброзування без залишків імплантованого матеріалу.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з порівняльним аналізом тканинних, клітинних і ультраструктурних характеристик процесів регенерації нижньої щелепи після її травматичного ушкодження із наступною імплантацією різних остеопластичних матеріалів.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науководослідної теми «Морфофункціональні та імуногістохімічні особливості тканин і органів в нормі та при патологічних станах» (номер державної реєстрації 0122U000168).

Літературні джерела References

1. Campana V, Milano G, Pagano E, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. J Mater Sci Mater Med. 2014;25(10):2445-2461.

https://doi.org/10.1007/s10856-014-5240-2

2. Xue N, Ding X, Huang R, Jiang R, Huang H, Pan X, et al. Bone tissue engineering in the treatment of bone defects. Pharmaceuticals. 2022;15:879. https://doi.org/10.3390/ph15070879

3.Migliorini F, Cuozzo F, Torsiello E, Spiezia F, Oliva F, Maffulli N. Autologous bone grafting in trauma and orthopaedic surgery: an evidence-based narrative review. J Clin Med. 2021;10:4347. https://doi.org/10.3390/jcm10194347

4. Gillman CE, Jayasuriya AC. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. Mater Sci Eng C. 2021;130:112466. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466

5. Kovrlija I, Locs J, Loca D. Octacalcium phosphate: Innovative vehicle for the local biologically active substance delivery in bone regeneration. Acta Biomater. 2021;135:27-47. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.021

6. Suzuki O, Shiwaku Y, Hamai R. Octacalcium phosphate bone substitute materials: Comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials. Dent Mater J. 2020;39(2):187-199.

https://doi.org/10.4012/dmj.2020-001

7. Lee EU, Kim DJ, Lim HC, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Comparative evaluation of biphasic calcium phosphate and biphasic calcium phosphate collagen composite on osteoconductive potency in rabbit calvarial defect. Biomater Res. 2015;19:1. https://doi.org/10.1186/s40824-014-0026-7

8. Winkler T, Sass FA, Duda GN, Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. Bone Joint Res. 2018;7(3):232-243. https://doi.org/10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1

9. Everts V, Niehof A, Tigchelaar-Gutter W,

Beertsen W. Transmission Electron Microscopy of Bone. Methods Mol Biol. 2019;1914:617-629. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_32

10. Niikura T, Oda T, Jimbo N, et al. Immunohistochemical analysis revealed the expression of bone morphogenetic proteins-4, 6, 7, and 9 in human induced membrane samples treated with the Masquelet technique. J Orthop Surg Res. 2022;17(1):29. https://doi.org/10.1186/s13018-022-02922-y

11. Mulish M, Welsh U. (Eds.). Romeis Mikroscopiche technic. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. 551 p. https://doi.org/ 10.1007/978-3-8274-2254-5

12. Suvarna SK, Layton C, Bancroft GD. (Eds.). Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 8th Edition. Elsevier; 2019. 558 p. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6864-5.00008-6

13. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. Methods Mol Biol. 2019;1897:289-98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

14. Nguyen T. Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices. Cambridge: Cambridge University Press; 2022. 272 p.

15. Glauert AM. Recent advances of high voltage electron microscopy in biology. J Microsc. 1979;117(1):93-101. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1979.tb00233.x

16. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications [4th ed.]. Cambridge : Cambridge University Press; 2000. 543 p.

17. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg: Council of Europe. 1986;123:52.

18. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. Off J Eur Union. 2010;53(L276):33-79.

Челпанова І.В. Перебудови кістки нижньої щелепи після трансплантації октакальційфосфату: гістологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні аспекти.

РЕФЕРАТ. У статті представлені результати дослідження гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації октакальційфосфату (ОКФ-Н) в експериментальний дефект нижньої щелепи кролика, оскільки повна та якісна регенерація кісток щелепно-лицевої ділянки, її механізми та динаміка залишаються не до кінця вивченими, потребують уточнення і деталізації. **Мета** дослідження – визначити динаміку гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних змін у кістці нижньої щелепи кролика після її травматичного ушкодження із наступним заміщенням дефекту остеопластичним матеріалом ОКФ-Н. Методи. Досліди виконано на 45 кроликах-самцях віком 6-7 міс, масою 2,5-3,0 кг. 20 тварин становили контрольну групу, 20 – експериментальну. Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини, який загоювався під кров'яним згустком. Експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали модифікованим натуральним октакальційфосфатом (ОКФ-Н). Контроль посттравматичного стану кісткової тканини в ділянці дефекту здійснювали впродовж 84 діб з використанням наступних методик: моделювання кісткового дефекту, світлооптична оцінка гістоструктури декальцинованої кістки, імуногістохімічне визначення експресії маркерів CD34, Calcitonin, Ki-67, трансмісійна електронна мікроскопія. Результати та підсумок. Остеокондуктивний ефект екзогенного модифікованого натурального октакальційфосфату реалізується через прискорення неоваскулогенезу з міграцією остеопрогеніторних клітин в напрямку від периферії до глибокої зони кістково-керамічного регенерату та через утворення численних остеогенних острівців по всьому його об'єму в перші три тижні після імплантації. Внаслідок анастомозування острівців десмального остеогенезу між собою та з відновленими трабекулами материнської кістки через 4 тижні після імплантації ОКФ-Н формується суцільна губчаста структура регенерату, яка складається з грубоволокнистих трабекул і фрагментів екзогенного октакальційфосфату, а також здійснюється відновлення періосту на поверхні імплантату з активацією остеокластів у периферичних трабекулах кістково-керамічного регенерату. Процеси ремоделювання поширюються від периферії до глибокої зони регенерату, що призводить до заміни грубоволокнистої тканини трабекул на примітивні кісткові пластинки з прискореним цитодиференціюванням численних остеоцитів. Через 5 тижнів після імплантації остеоцити з ультраструктурними ознаками зрілості з'являються поблизу відновлених мінералізованих остеонів материнської кістки і на поверхні гранул імплантованого октакальційфосфату у внутрішніх ділянках регенерату. Через 8 тижнів після імплантації ОКФ-Н на тлі компактизації новоутворених трабекул поблизу відновленого періосту відбувається нормалізація і стабілізація гістоархітектоніки остеонів у периферичних зонах регенерату, який повністю інтегрується з материнською кісткою. В глибокій зоні уповільнені процеси перетинчастого остеогенезу змінюються на активне ремоделювання з утворенням незрілих остеоцитів і примітивних кісткових пластинок. Через 12 тижнів після імплантації ОКФ-Н переважна частина кістково-керамічного регенерату містить повноцінно відновлену остеоцитарну лакуно-канальцеву систему. В глибокій зоні регенерату залишаються окремі осередки грубоволокнистої кісткової тканини, які містять помірну кількість активованих остеокластів, секреторно активні механоцити без імуногістохімічних ознак проліферації, а також дрібні ділянки фіброзування без залишків імплантованого матеріалу.

Ключові слова: нижня щелепа, зубощелепний апарат, регенерація кісткової тканини, октакальційфосфат, гістоструктура, імуногістохімія, ультраструктура.