

І.В. Челпанова

Львівський національний
медичний університет
імені Данила Галицького
Львів, Україна

Надійшла: 07.01.2023

Прийнята: 15.02.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.63-77>

УДК: 616.714-089.843-073.7-018.1

ПЕРЕБУДОВИ КІСТКИ НИЖНЬОЇ ЩЕ- ЛЕПИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ОК- ТАКАЛЬЦІЙФОСФАТУ ТА ХІТОЗАНУ: ГІСТОЛОГІЧНІ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ АСПЕКТИ

Chelpanova I.V.   Mandibular bone restructuring after octacalcium phosphate and chitosan 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 and chitosan 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 and activated chitosan. **Methods.** Experiments were conducted on 89 male rabbits aged 6-7 months, weighing 2.5-3.0 kg. 20 animals constituted the control group, and 64 the two experimental groups. 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 first experimental group consisted of 32 rabbits where the bone defect was filled with modified natural octacalcium phosphate with a mix of chitosan and ampicillin (OCP-N-Chitosan-Ampicillin). The second experimental group consisted of 32 rabbits where the bone defect was filled with activated chitosan (Chitosan-A). 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. Relief changes were studied by scanning electron microscopy. **Results and conclusion.** Layered implantation of the OCP-N-Chitosan-Ampicillin material (the outer segment of the graft is a complex of chitosan and ampicillin, the inner segment is modified natural octacalcium phosphate granules) creates conditions for the realization of a secondary osteoinduction effect. Specifically, one week post-implantation, a hypoxic zone forms under the dense chitosan coating. This induces intensive periosteal regeneration and activates neovascularization, accompanied by migration and cytodifferentiation of osteoprogenitor cells from two directions: 1) from the microvessels of the regenerated periosteum and 2) from the damaged trabeculae of the native bone at the edges of the experimental defect. During weeks 2-3, the pores of the inner implant segment containing modified octacalcium phosphate ensure complete vascularization of the bone-ceramic regenerate, filling it with islands of desmal osteogenesis. This is followed by the formation of woven bone trabeculae and a wave-like spread of bone tissue remodeling processes from the periphery of the regenerate towards its deeper zone. The application of Chitosan-A resulted in limited growth of the relative volume of bone tissue in the regenerate over the study period. This growth rate was significantly lower than the dynamic changes observed in the control group. Eight weeks post-implantation of activated chitosan, against a background of limited osteointegration in the peripheral regions of the regenerate, slow diffuse remodeling of loosely arranged trabeculae occurs with the formation of primitive bone lamellae. Signs of compaction of the newly formed bone near the periosteum appear only after 12 weeks of the experiment. Osteons with deformed geometry contain predominantly immature osteocytes, and the orientation of collagen fiber bundles within the bone lamellae shows limited spatial organization against a background of a significant proportion of amorphous osteomatrix. At the end of the experiment, the deep zone of the regenerate contains heteromorphic connective tissue areas and loosely arranged bone trabeculae with signs of incomplete remodeling.

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

Citation:

Chelpanova IV. [Mandibular bone restructuring after octacalcium phosphate and chitosan transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects]. Morphologia. 2023;17(1):63-77. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.1.63-77>

 Chelpanova I.V. 0000-0001-5215-814X

 ilona.med75@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Актуальним питанням сучасної медицини є остеорегенерація в галузі щелепно-лицевої та реконструктивної хірургії. Важливим напрямком є пошук ефективних методів пришивдшення загоєння кісток та уникнення різноманітних ускладнень. Природні механізми регенерації кістки не завжди призводять до успішного загоєння. У випадку великих посттравматичних дефектів, інфікуванні значно погіршуються темпи регенерації та виникає низка ускладнень, що негативно впливає на повне та якісне ремоделювання [1, 2].

Одним із найпопулярніших матеріалів для заповнення кісткових дефектів є октакальційфосфат. Він швидко резорбується в організмі, а його структура легко замінюється природною кістковою тканиною [3]. У таких випадках необхідне хірургічне лікування із застосуванням синтетичних остеопластичних матеріалів, часто збагачених антибактеріальними компонентами. Одним із таких матеріалів є хітозан – похідна сполука хітину. Хітозан – природний біополімер, що має високу біосумісність, відсутність імуногенності та токсичності, а його хімічний склад суттєво не відрізняється від складу позаклітинного матриксу кісткової тканини [4, 5]. Поєднання органічних властивостей хітозану та сполук кальцію мінерального матриксу стало основою створення якісно нового остеопластичного матеріалу, який з успіхом застосовується сьогодні у стоматологічній практиці. Дослідники повинні зосередитися на поєднанні хітозану з іншими біоматеріалами або біоактивними молекулами, щоб підвищити їхній регенеративний потенціал. Крім того, необхідні клінічні випробування, щоб дослідити ефективність і безпеку біоматеріалів на основі хітозану, які можуть стати важливим доповненням до сфери відновлення мінералізованих тканин [6].

Клітинні та тканинні перебудови, що відбуваються під час загоєння експериментальних кісткових дефектів привернули значну увагу дослідників, в тому числі після використання остеотропних матеріалів [7]. Дослідження, що стосуються ультраструктурних перебудов міжклітинного матриксу, фібробластів, остеобластів та остеоцитів під час остеорегенерації змодельованих кісткових дефектів заслуговують особливої уваги [8]. Дослідження щодо визначення імуногістохімічних характеристик клітинного, волокнистого та мікроциркуляторного компонентів під час регенераторних перетворень кісткової тканини та при її взаємодії з остеотропними матеріалами останнім часом набули особливого значення [9, 10].

Мета дослідження – визначити динаміку гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних змін у кістці нижньої щелепи кролика після її травматичного ушкодження із наступним заміщенням дефекту остеопластичним матеріа-

лом ОКФ-Н і активованим хітозаном.

Матеріали та методи

Дослідження було проведено на 89 статевозрілих кроликах-самцях віком 6-7 місяців, вагою 2,5-3 кг. Тварини були розділені на контрольну (20 тварин) та дві експериментальні групи (по 32 тварини кожна). Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. Тваринам контрольної та експериментальних груп під загальним наркозом, шляхом внутрішньоочеревинного 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.

Першу експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали остеотропним матеріалом Compact BoneB («Dentegris», Німеччина), який містить натуральний октакальційфосфат, а також комплексом хітозан ацетату з ампіциліном (Київмедпрепарат, Україна) (ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін). Другу експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали хітозаном, активованим оцтовою кислотою (ChitopharmTMM; Product no.44202; Norway) (Хітозан-А). 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, морфометрію, а також вивчення рельєфних змін шляхом скануючої електронної мікроскопії та 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 (QBEnd/10; 1:250), Calcitonin (SP17; Ready to use), Ki-67 (SP6; 1:250) у вологих камерах при температурі

23-25°C протягом 30 хвилин. Використовували систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision). Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетраходу (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°C 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].

Рельєфні особливості кісткової тканини в зоні експериментального дефекту вивчали методом скануючої електронної мікроскопії, виконаної на растровому електронному мікроскопі JEOL T220A. Зразки фіксували в 2,0%-му розчині глутаральдегіду, проводили процедуру сублімаційного сушіння та металізували термічним напыленням шару міді (до 20 нм). Для фотографування використовували напругу прискорення 20 кВ [17].

Для визначення змін складу регенерату використовували підрахунок відносного об'єму 1) кісткової тканини, 2) остеопластичного матеріалу, 3) сполучної тканини в регенераті, що були визначені на цифрових мікрофотографіях демінералізованих гістологічних зрізів фрагментів нижньої щелепи, забарвлених гематоксиліном та еозином, з використанням програмного пакету ImageJ 1.47v за рекомендаціями [18].

Для визначення підпорядкування отриманих даних нормальному закону розподілу використовували аналіз гістограми розподілу, показники коефіцієнтів асиметрії та екстинкції, критерій Шапіро-Уїлка. Результати кожної групи в різні моменти часу підпорядковувались нормальному закону розподілу, їх подано у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартне відхилення середнього. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми значеннями показників у різні терміни експерименту, а також для порівняння даних групи контролю з експериментальною групою в однакові строки спостережен-

ня використовували t-критерій Стюдента. Різницю між групами вважали достовірною при $p < 0,05$. Для проведення статистичних обрахунків та створення графіків було використано програмне забезпечення RStudio v1.2.5042. Для оформлення графіків та таблиць було використано електронні таблиці Excel з пакету MS Office 2010 із застосуванням ліцензійної програми STATISTICA (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA). Послідовність статистичних процедур проводили відповідно до рекомендацій [19].

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/EU про дотримання постанов, законів, адміністративних положень Держав ЄС з питань захисту тварин, які використовуються з науковою метою [20, 21].

Результати та їх обговорення

Гістологічне вивчення демінералізованої нижньої щелепи через одну добу після нанесення експериментального дефекту та пошарової імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін (зовнішній сегмент трансплантату – комплекс хітозану з ампіциліном, внутрішній сегмент – гранули модифікованого натурального октакальційфосфату) показало наявність масованого тромбоутворення у просвітах зруйнованих мікросудин та численних дрібних крововиливів. Спостерігались виразний периваскулярний та інтерстиційний набряк періосту і м'яких тканин поблизу механічної остеодеструкції, екстравазальні скупчення еритроцитів і поліморфноядерних. По краях експериментальної шахти у материнській кістковій тканині визначались дрібні скупчення фібринових мас і гемосидеринові накопичення. Остеони поблизу дефекту містили численні резорбційні лакуни і гомогенізовані пластинки. На електронограмах спостерігались поодинокі активовані остеокласти, що свідчило про незначну резорбцію ушкоджених кісткових пластинок та підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням парафінових зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами. Гомогенізація кісткового матриксу супроводжувалась інтрацелюлярним набряком остеоцитів і деструкцією пучків колагенових фібрил. У складі періосту навколо хітозанового сегменту трансплантату виявлялись ознаки активного неоваскулогенезу без проявів фіброзування або проліферації фіброblastів. Визначення маркера Ki-67 виявило незначну проліферативну активність клітин різ-

них 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 проліферації Ki-67 у ядрах фібробластів і ендотеліальних клітин ендосту.

Через один тиждень після експериментальної травми та імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін поряд із незначними ознаками травматичного запалення навколо зони дефекту спостерігалась істотна дезорганізація і деструкція материнської пластинчастої кістки, гомогенізація кісткового матриксу. У порівнянні зі станом на першу добу зростала площа резорбційних порожнин з тканинним детритом, фібриноідом або гемосидериновими депозитами. Травмовані остеони і кісткові трабекули по краях дефекту набували горбистих контурів внаслідок утворення численних остеοїдних випинань на їх поверхні. У цих ділянках навколо гемокапілярів спостерігались поодинокі остеокласти, значна кількість відокремлених один від одного остеобластів, які імуногістохімічно при вивченні маркера Ki-67 інтенсивно накопичували імуногістохімічну мітку. При ультраструктурному дослідженні навколо остеобластів виявлялись хаотично угруповані колагенові волокна, занурені у гомогенний матрикс.

Наприкінці першого тижня експерименту спостерігалось активне відновлення періосту на поверхні зовнішнього хітозанового покриття імплантованого матеріалу з активним вrostанням новоутворених примітивних гемокапілярів або ендотеліальних паростків від поверхні у глибину трансплантату. Неоваскулогенез у даній центральній ділянці регенерату супроводжувався значною міграцією остеопрогеніторних клітин, частка яких набувала ультраструктурних ознак остеобластів. На відміну від групи контролю, в периферичних ділянках регенерату поблизу межі з материнською губчастою кісткою виявлялась велика кількість острівців десмального остеогенезу зі щільним вмістом новоутворених примітивних мікросудин і гетероморфних клітин – фібробластів, остеобластів та їх недиференційованих попередників. Інтенсивне накопичення маркера Ki-67 в ядрах означених клітин свідчило про їхню високу проліферативну активність на периферії регенерату. Значна щільність CD34-позитивних структур (гемокапілярів або ендотеліальних тяжів) вказувала на активний неоваскулогенез в даній локалізації. Гематогенні клітини навколо гемокапілярів зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. На електронограмах поб-

лизу остеобластів в остеогенних острівцях спостерігались поодинокі невпорядковані колагенові волокна або їхні пучки з ознаками незрілості. У складі остеοїду острівців десмального остеогенезу аморфний компонент за площею суттєво переважав над колагеновими волокнами (рис. 1).

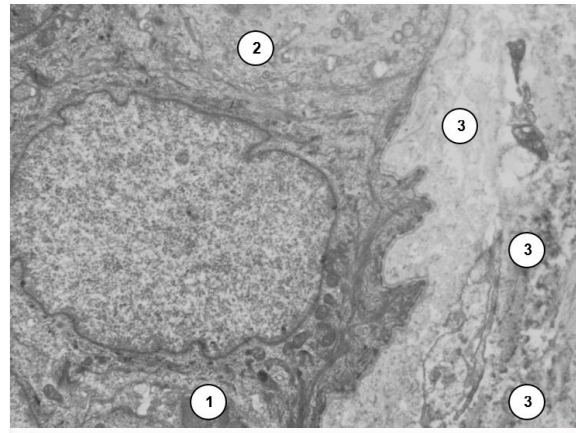


Рис. 1. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 1 тиждень після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. 1 – фрагмент цитоплазми остеобласта; 2 – малодиференційована остеогенна клітина; 3 – неструктурований остеοїд. $\times 3000$.

Протягом 2-3-го тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін запально-інфільтративні прояви у твердих і м'яких тканинах навколо зони дефекту майже не виявлялись. На поверхні зовнішнього (хітозанового) сегменту імплантованого матеріалу спостерігались ознаки активного відновлення клітинного, волокнистого і мікросудинного компонентів періосту. Дезорганізація кісткової тканини та гомогенізація кісткового матриксу навколо зони травми спостерігались рідко. Резорбційні порожнини розташовувались на значній відстані одна від одної. Численні остеοїдні вирости по краях ушкодженої материнської кістки на поверхні травмованих остеонів і кісткових трабекул були занурені у товщу репаративного регенерату між острівцями десмального остеогенезу або анастомозували з ними. Вирости трабекул материнської кістки містили повнокровні гемокапіляри в оточенні незначної кількості остеокластів та сполучались з мікросудинами відновленого ендосту. Активовані остеокласти по краях відновлених трабекул материнської кістки в тих ділянках, що занурювались у глибину регенерату, свідчили про об'єднання материнських трабекул з новоутвореними трабекулами регенерату. Серед клітинних субпопуляцій чисельно переважали остеобласти, які розташовувались поодинокі в товщі органічного матриксу остеοїдних виростів на поверхні трабекул материнської кістки. Експресія маркера проліферації Ki-67 була найвищою в ядрах остеобластів у порівнянні з іншими клі-

тинними диферонами. При вивченні Calcitonin-SP17-клональних антитіл не спостерігалось суттєвої резорбційної активності остеокластів в основі материнських трабекул, проте на верхівках відновлених трабекул і спікул їхня активність була високою. Вивчення експресії маркера CD34 показало помірний ступінь васкуляризації материнської губчастої кістки. При ультраструктурному дослідженні остеїд на поверхні відновлених трабекул містив незначну кількість слабко орієнтованих пучків колагенових волокон навколо остеобластів з ознаками незначної синтетичної активності.

На периферії кісткового регенерату протягом 2-3-го тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін кількість і щільність острівців перетинчастого остеогенезу значно перевищували показник контрольної групи тварин. Остеогенні острівці анастомозували з утворенням трабекул, а також об'єднувались з горбистими кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. В їх складі візуалізувались численні мікросудини різного ступеня морфологічної зрілості в оточенні остеобластів, які часто утворювали групи. У міжтрабекулярних просторах зосереджувались поодинокі фібробласти та численні недиференційовані клітини остеогенного диферону. При ультраструктурному дослідженні остеїд новоутворених трабекул містив колагенові волокна різного ступеня зрілості та їх варіативні за розміром пучки з невпорядкованою орієнтацією. Ультраструктура остеобластів всередині керамічно-кісткового регенерату, які містили розвинений комплекс Гольджі та численні елементи гранулярної ендоплазматичної сітки, вказувала на їх високу синтетичну активність. При імуногістохімічному дослідженні маркер Ki-67 інтенсивно накопичувався в ядрах клітин-попередниць остеобластів; маркер CD34 – у мембранах і цитоплазмі ендотеліальних клітин по всьому об'єму кістково-керамічного регенерату, Calcitonin-SP17-позитивні остеокласти з пригніченою резорбтивною активністю не виявлялися. Навпаки, переважали активовані остеокласти з розвинутою гофрованою облямівкою (рис. 2).

Глибока зона кістково-керамічного регенерату містила значну кількість мікросудин і ендотеліальних паростків, що свідчило про інтенсивний неоваскулогенез. На відміну від групи контролю, навколо функціонуючих гемокапілярів утворювались численні острівці перетинчастого остеогенезу, в той час як осередки хрящового матриксу не виявлялись. Поодинокі осередки фіброзування в площині зони регенерату були невеликими за площею.

Через 4-5 тижнів після експериментальної травми та імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін виявлялись радіально орієнтовані новоутворені з боку материнської кістки трабекули.

Вони анастомозували з грубоволокнистими новоутвореними трабекулами остеорегенерату, утворюючи безперервний ендост. У ділянках компактної материнської кістки з ознаками посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу навколо мікросудин зосереджувались активні остеокласти, що імуногістохімічно підтверджувалось при застосуванні Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Наявність лакун Гаушипа вказували на інтенсивне відновлення ушкоджених унаслідок травми кісткових пластинок материнської кістки. На поверхні зовнішнього сегменту імплантованого матеріалу виявлялась відновлена гістоструктура періосту зі значним вмістом як остеопрогеніторних клітин, так і остеобластів. Поблизу ендосту материнської губчастої кістки спостерігались численні остеобласти, які розташовувались ізольовано або групами в товщі органічного матриксу відновлених трабекул. Чисельно серед клітин трабекул у внутрішніх ділянках остеорегенерату переважали остеобласти. Вони інтенсивно накопичували імуногістохімічну мітку Ki-67, що вказувало на їх високу проліферативну активність, на відміну від інших клітин. На відміну від контрольної групи, при електронній мікроскопії виявлялась висока синтетична активність остеобластів, причому фіброгенез суттєво переважав над секрецією аморфного компоненту остеїду.

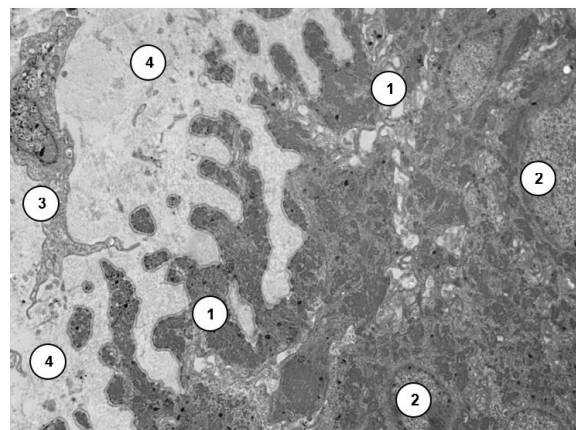


Рис. 2. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 3 тижні після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. 1 – гофрована облямівка остеокласта; 2 – ядра остеокласта; 3 – незрілий остеоцит; 4 – остеїд. $\times 3000$.

Губчата структура кістково-керамічного регенерату складалася з поліморфних трабекул, утворених за рахунок відновлення травмованих трабекул материнської кістки, а також за рахунок попереднього розповсюдження осередків десмального остеогенезу. В грубоволокнистих трабекулах кількісно переважали остеобласти з ультраструктурними ознаками високої секреторної активності. Кількість остеокластів суттєво зростала у порівнянні з попереднім терміном експе-

рименту. Переважна частина остеокластів була активованою, що підтверджувалось при ультраструктурному дослідженні та при імуногістохімічному визначенні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Ці ознаки свідчили про ініціацію ремоделювання грубоволокнистих трабекул через 4 тижні на межі регенерату з кістковими пластинками материнської кістки, а також при переході відновлених трабекул материнської губчастої кістки в новоутворені грубоволокнисті трабекули регенерату. Ультраструктурно при ремоделюванні утворювалися щільні пучки паралельно орієнтованих колагенових волокон з формуванням гетероморфних кісткових пластинок. Серед остеоцитів переважали ультраструктурно незрілі клітини, проте на 4-му тижні зростала частка зрілих остеоцитів у тих периферичних ділянках регенерату, які анастомозували з мінералізованим матриксом відновлених материнських трабекул. Також зрілі остеоцити визначались у складі новоутворених трабекул у внутрішніх зонах остеорегенерату в місцях межування з гранулами імплантованого матеріалу, що вказувало на ініціацію дозрівання остеогенних клітин з боку екзогенного октакальційфосфату незалежно від розповсюдження хвилі ремоделювання від материнської кістки.

Протягом 4-5-го тижнів експерименту глибока зона кістково-керамічного регенерату, на відміну від групи контролю, містила острівці перетинчастого остеогенезу поряд із численними примітивними грубоволокнистими кістковими трабекулами. В окремих трабекулах спостерігались ознаки ремоделювання, хоча кількість остеокластів і остеоцитів в глибокій зоні регенерату була значно меншою, ніж на його периферії. В ядрах остеобластів спостерігалась інтенсивна експресія маркера проліферації Ki-67. Трансмісійна електронна мікроскопія показала високу синтетичну активність остеобластів, навколо яких утворювалися невідповідні пучки колагенових волокон. Імуногістохімічний розподіл маркера CD34 вказував на значну васкуляризацію глибокої зони кістково-керамічного регенерату, що пояснювало обмежене у порівнянні з контролем фіброзування даної зони і відсутність острівців хрящового остеогенезу.

Через 8 тижнів експерименту спостерігалось формування остеоцитарної лакуно-каналцевої системи у складі материнської кістки навколо експериментального дефекту. Гістоархітектура і розподіл клітинних субпопуляцій, імуногістохімічні і ультраструктурні характеристики материнської кістки навколо нанесеної експериментальної травми після остеопластики матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін відповідали інтактній будові.

Периферичні трабекули кістково-керамічного регенерату склалися з пластинчастої кісткової тканини. Кісткові пластинки ново-

утворених остеонів мали типову будову. Переважна частина остеокластів інтенсивно накопичувала Calcitonin-SP17-мітку, що вказувало на гальмування їх резорбтивної активності та з урахуванням незначної кількості резорбційних лакун свідчило про стабілізацію гістоархітектури відновленої пластинчастої кістки. Поблизу відновленого періосту спостерігались компактизовані кісткові пластинки, які містили зрілі остеоцити з розвинутими відростками. Також зрілі остеоцити переважали в пластинчастій кістковій тканині новоутворених трабекул, що складали губчасту структуру периферичних і внутрішніх ділянок регенерату. Загальна структура лакуно-каналцевої системи на периферії кістково-керамічного регенерату виглядала помірно розвиненою і в цілому сформованою, геометрія остеонів на світлооптичному рівні наближалася до інтактної. У міжтрабекулярних просторах новоутвореної губчастої кістки визначались незначні за площею ділянки мієлоїдної тканини. Поверхня репаративного регенерату була повністю інтегрована з материнською кісткою, межа між новоутвореними трабекулами і материнською губчастою кісткою не візуалізувалась.

В окремих трабекулах глибокої зони спостерігались ознаки ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини. В ділянках формування кісткових пластинок численні остеобласти розташовувались поблизу гетероморфних зон остеоду, в яких пучки щільно упакованих паралельних колагенових волокон межували з осередками невідповідних фібрил та аморфним матеріалом низької електронної щільності. Остеобласти мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності. У порівнянні з попереднім терміном кількість остеобластів помітно зменшувалась, в той час як щільність остеоцитів ставала більшою. Остеоцити між новоутвореними пластинками мали ознаки структурно-функціональної незрілості, в той час як на поверхні гранул імплантату локалізувались переважно зрілі форми клітин, що свідчило про стимулюючий вплив екзогенного октакальційфосфату на дозрівання остеоцитів.

Через 12 тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін спостерігалась повна остеоінтеграція кістково-керамічного регенерату як з компактною, так і з губчастою материнською кісткою. На відміну від групи контролю, остеоцитарна лакуно-каналцева система мала ознаки типової будови у зоні зовнішньої кісткової пластинки, повністю відновлений періост, осередки незавершеного остеогенезу або неповного ремоделювання не виявлялись. Мікроархітектура та форма остеонів регенерату не відрізнялись від будови остеонів материнської кістки та від структури інтактних остеонів. При ультраструктурному дослідженні між пучками паралельно орієнтованих зрілих колагенових волокон сусідніх пластинок розташовувались рівномірні

за шириною прошарки аморфного матеріалу, що свідчило про завершений характер упорядкування кісткового матриксу. У порівнянні з попереднім терміном кількість остеогенних клітин була помітно меншою. Низька інтенсивність імуногістохімічної мітки проліферативного маркера Ki-67, а також невелика кількість остеокластів і остеобластів поряд із переважанням зрілих остеоцитів свідчили про завершений характер ремоделювання. Кісткові трабекули в периферичних і внутрішніх ділянках регенерату містили розвинену гемокапілярну сітку. При імуногістохімічному вивченні експресії маркера CD34 спостерігалось рівномірне розповсюдження зрілих гемокапілярів по всьому об'єму кістково-керамічного регенерату. Утворення мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах спостерігалось лише на периферії репаративного регенерату.

Глибока зона регенерату містила помірно розгалужені трабекули, які склалися з кісткових пластинок, переважна частина яких мала інтактну будову. Трансмісійна електронна мікроскопія виявила щільно упаковані паралельні фібрили з незначною часткою аморфного матеріалу новоутвореного остеїду. Більшість остеоцитів між кістковими пластинками була представлена зрілими формами (рис. 3).

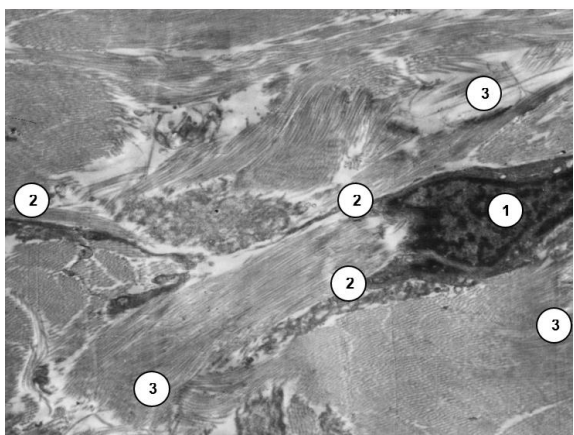


Рис. 3. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 8 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. 1 – фрагмент цитоплазми остеоцита; 2 – відростки остеоцита; 3 – пучки колагенових волокон кісткових пластинок. $\times 3000$.

В окремих глибоких ділянках регенерату зберігались дрібні осередки грубоволокнистої кісткової тканини без залишків імплантованого матеріалу, які містили помірну кількість активних остеокластів. На відміну від спостережень у контрольній групі, обмежена кількість активних остеокластів з низькою Calcitonin-SP17-реактивністю виявлялася лише у ділянках геометричної модифікації кісткових пластинок новоутворених кісткових трабекул після завершення

ремоделювання. Аналіз розподілу експресії маркера Ki-67 виявив низьку проліферативну активність механоцитів і обмежений проліферативний потенціал ендотеліоцитів у трабекулах глибокої зони регенерату, що поряд із помірною кількістю CD34-позитивних ендотеліальних елементів свідчило про завершений характер ремоделювання кісткової тканини в глибокій зоні регенерату. Прояви фіброзування глибокої зони регенерату суттєво редукувалися у порівнянні з попереднім терміном дослідження. Сполучнотканинні ділянки навколо мікросудин зустрічалися в незначній кількості та мали вигляд тонких прошарків, збагачених на варіативно орієнтовані пучки колагенових волокон.

Дослідження особливостей мікрорельєфу кісткової поверхні за допомогою сканувальної електронної мікроскопії в ділянці експериментального кісткового дефекту нижньої щелепи кроликів після імплантації в його порожнину матеріалу Хітозан-А виявило істотні відмінності від результатів ультраструктурного дослідження в контрольній групі. Через одну добу після імплантації на відносно гладкому рельєфі поверхні шахти на рівні компактної кортикальної пластинки спостерігалися травмовані кровоносні мікросудини із тромбованими просвітами в оточенні дрібних крововиливів. Між ушкодженими кістковими трабекулами та спікулами губчастої кістки коміркового відростка по краях шахти виявлялися хаотично розташовані мікроскопічні рештки зруйнованих трабекул (рис. 4).

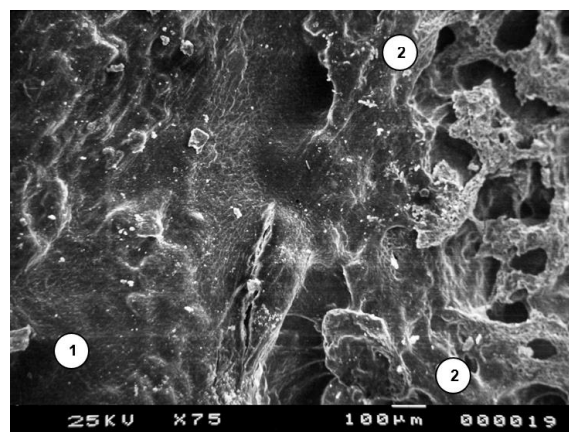


Рис. 4. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 1 добу після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – ушкоджена поверхня зовнішньої кісткової пластинки бічної стінки шахти; 2 – ушкоджені трабекули губчастої кістки міжзубної ділянки коміркової частини. $\times 75$.

У зоні безпосереднього механічного дефекту після застосування матеріалу Хітозан-А, на відміну від контрольної групи, спостерігалися обмежені за виразністю прояви периваскулярного набряку, незначні за об'ємом навколосудинні скупчення еритроцитів та поліморфноядерних

лейкоцитів. Ознаки стазу зустрічалися в просвіті поодиноких мікросудин. На периферії імплантованого матеріалу Хітозан-А виявлялися ділянки посттравматичної ексудації.

Через 1 тиждень експерименту на поверхні ушкоджених остеонів і кісткових трабекул спостерігали дуже обмежене формування остеїдних острівців і випинань. Через 2 і 3 тижні ознаки остеогенезу ставали виразнішими, що проявлялося в утворенні на поверхні ушкоджених трабекул чіткої горбистості. Новоутворені острівці та випинання варіювали за розміром та формою і вкривали значну за площею поверхню трабекул (рис. 5). Ознаки запалення в ділянці експериментального кісткового дефекту (периваскулярний набряк, лейкоцитарна інфільтрація, судинний стаз) протягом 2-го тижня прогресивно зменшувалися; через 3 тижні після імплантації матеріалу Хітозан-А вони не виявлялися. Характерною особливістю регенераторного процесу в цей період було активне утворення сполучнотканинних трабекул і спікул на периферії регенерату, в той час як у його глибоких зонах осередки перетинчастого остеогенезу зустрічалися в поодиноких випадках, причому кількість кровоносних мікросудин у даній локалізації була значно меншою, ніж у тварин контрольної групи.

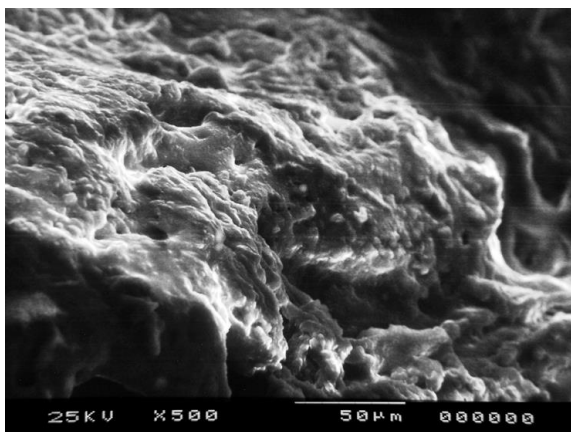


Рис. 5. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 3 тиж після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. Мікрорельєф поверхні новоутвореної трабекули. $\times 500$.

Через 4 і 5 тижнів після імплантації матеріалу Хітозан-А у периферичних відділах регенерату виявлялася невелика кількість новоутворених остеїдних трабекул з радіальною орієнтацією та обмеженим анастомозуванням. Поряд із ними залишалися значні за об'ємом маси остеотропного матеріалу. У глибоких зонах експериментального дефекту візуально визначалися окремі невеликі осередки десмального остеогенезу. На відміну від контрольної групи, новоутворені мікросудини не формували характерної сітки; примітивні гемокапіляри зустрічалися переважно поб-

лизу периферично розташованих осередків десмального остеогенезу з переважанням клітин фіброblastного ряду. Остеогенні клітини поодиночки визначалися на периферії регенерату поблизу материнської кістки. На межі регенерату з пластинчастою кістковою тканиною кортикальної пластинки материнської кістки також зустрічалися поодинокі остеокласти.

Через 8 тижнів після імплантації визначалася межа щільного прилягання грубоволокнистої тканини новоутворених трабекул на периферії регенерату до остеонного компонента кортикальної пластинки материнської кістки. На поверхні кісткових трабекул, а також поблизу частинок імплантованого матеріалу виявлялися активовані остеокласти, що свідчило про початок остеолітичного процесу у поверхневих ділянках регенерату. В глибині штучного дефекту залишалися значні маси нерезорбованого остеопластичного матеріалу, між якими зосереджувалися зони остеогенезу. Структурна організація регенерату в цих зонах була представлена неоднорідною губчастою структурою грубоволокнистої тканини з щільною сіткою новоутворених мікросудин, які були оточені масивними прошарками колагенових волокон. Кількість остеогенних клітин та остеокластів була значно нижчою, ніж у тварин групи контролю.

Через 12 тижнів після нанесення експериментальної травми та імплантації матеріалу Хітозан-А у периферичних ділянках регенерату, поблизу неушкодженої травмою материнської губчастої кістки, мікрорельєф поверхні більшості трабекул був чіткий, гладкий, без ознак новоутворення остеїду (рис. 6).

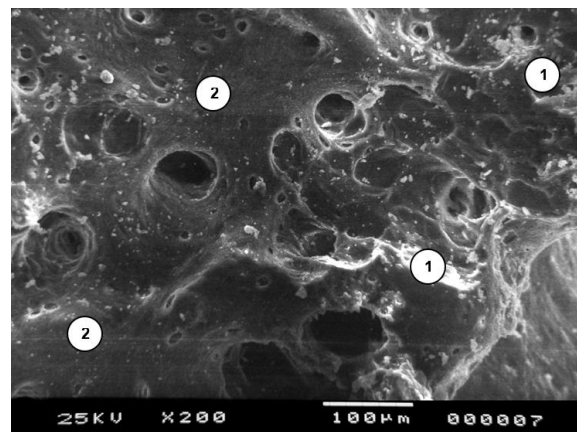


Рис. 6. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 12 тиж після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – мікрорельєф поверхні новоутворених трабекул; 2 – ділянка з'єднання з материнською кісткою. $\times 200$.

Навпроти, в глибоких зонах регенерату переважно зустрічалися осередки фіброзної та грубоволокнистої кісткової тканини, кількість остеогенних клітин та активованих остеокластів була

значно вищою, ніж у контрольній групі. Залишки імплантованого матеріалу у великій кількості зустрічалися між новоутвореними трабекулами. На відміну від спостережень у контрольній групі тварин, такі зміни свідчили про продовження процесів ремоделювання трабекулярних структур регенерату.

Остеоцитарна лакуно-канальцева система у регенераті виявлялася лише поблизу материнської кістки коміркового відростка нижньої щелепи та не була характерною для більшої частини регенерату, що вказувало на незавершений або неповноцінний остеогенез в експериментальній групі тварин через 12 тижнів після імплантації матеріалу Хітозан-А.

При морфометричному вивченні динаміки змін відносного об'єму кісткової тканини в реге-

нераті експериментального дефекту в контрольній групі визначалося активне зростання параметра від першого до п'ятого тижня після нанесення дефекту (табл. 1). Зокрема, відносний вміст кісткової тканини в регенераті через 2 тижні експерименту в 2,75 рази ($p < 0,05$) перевищував значення 1-го тижня; через 3 тижні параметр зростав на 60,4 % ($p < 0,05$) відносно рівня попереднього терміну; через 4 і 5 тижнів – на 68,0 % ($p < 0,05$) і 32,0 % ($p < 0,05$) відповідно. У період від 5-го до 8-го тижня підвищення відносного об'єму кісткової тканини в регенераті, що формувалася під кров'яним згустком, становило 24,5 % ($p < 0,05$). У подальшому, до 12-го тижня експерименту, зміни показника не мали статистичної значущості у порівнянні з величиною 8-го тижня, стабілізуючись на рівні $(70,3 \pm 4,8) \%$.

Таблиця 1

Динаміка змін відносного об'єму кісткової тканини, остеопластичного матеріалу та сполучної тканини в регенераті (%), $M \pm m$

Термін	Кісткова тканина		Матеріал	Сполучна тканина	
	Контроль	Хітозан-А	Хітозан-А	Контроль	Хітозан-А
1 доба	$3,7 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,8$	$82,7 \pm 6,3$	$6,9 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,5$
7 діб	$5,6 \pm 0,8 \#$	$6,3 \pm 0,9$	$79,1 \pm 6,6$	$14,7 \pm 1,1 \#$	$13,2 \pm 1,5 \#$
14 діб	$15,4 \pm 1,2 \#$	$10,7 \pm 0,8 \#$	$80,5 \pm 6,8$	$30,5 \pm 2,4 \#$	$7,5 \pm 0,9 \#$
21 доба	$24,7 \pm 1,8 \#$	$16,2 \pm 1,8 \#$	$76,3 \pm 5,9$	$56,1 \pm 3,5 \#$	$7,1 \pm 1,3 \#$
28 діб	$41,5 \pm 3,4 \#$	$23,9 \pm 2,4 \#$	$59,8 \pm 4,7 \#$	$41,8 \pm 3,1 \#$	$14,7 \pm 1,8 \#$
35 діб	$54,8 \pm 3,7 \#$	$26,5 \pm 2,1 \#$	$52,4 \pm 4,2 \#$	$34,2 \pm 2,3 \#$	$18,6 \pm 2,5 \#$
56 діб	$68,2 \pm 4,5 \#$	$25,3 \pm 3,2 \#$	$50,1 \pm 4,0$	$20,7 \pm 1,7 \#$	$23,1 \pm 2,5$
84 доби	$70,3 \pm 4,8$	$26,6 \pm 3,8 \#$	$43,7 \pm 3,7 \#$	$24,5 \pm 2,0$	$27,1 \pm 3,2$

* – різниця статистично значуща при порівнянні з контрольною групою; #: різниця статистично значуща при порівнянні з попереднім терміном експерименту.

За результатами морфометричного аналізу динаміки відносного об'єму кісткової тканини в регенераті виявилось, що за умов застосування матеріалу Хітозан-А відбувалося обмежене зростання параметра протягом досліджуваного періоду, яке за інтенсивністю змін значно поступалося динаміці у тварин контрольної групи. Через 1 тиждень після травми значення параметра не перевищувало у статистично вагомому ступені показник першої доби та не відрізнялось істотно від контрольного рівня. Через 2 тижні після імплантації матеріалу Хітозан-А зростання параметра становило 69,8 % ($p < 0,05$) відносно величини 1-го тижня, проте його рівень на 30,5 % ($p < 0,05$) поступався контрольному. Через 3 тижні після імплантації спостерігалось підвищення вмісту кісткової тканини в регенераті на 88,8 % ($p < 0,05$) відносно попереднього терміну, але це зростання було на 34,4 % ($p < 0,05$) нижчим, ніж у тварин контрольної групи. Через 4 тижні експерименту зростання параметра становило 47,5 % ($p < 0,05$) відносно величини 3-го тижня, проте його рівень на 42,4 % ($p < 0,05$) поступався контрольному. У період від 5-го до 8-го тижня після

імплантації матеріалу Хітозан-А відносний об'єм кісткової тканини в регенераті варіював у межах 25-27 % та не відрізнявся у статистично вагомому ступені від величини 4-го тижня. При цьому параметр експериментальної групи істотно поступався відповідним за термінами контрольним показникам: через 5 тижнів – на 51,6 % ($p < 0,05$), через 8 тижнів – на 62,9 % ($p < 0,05$), через 12 тижнів – на 62,2 % ($p < 0,05$).

В експериментальній групі тварин, у яких пластику дефекту проводили з використанням матеріалу Хітозан-А, у перші три тижні не спостерігались будь-які ознаки біорезорбції. Через 4 тижні після остеопластики відносний об'єм імплантованого матеріалу в регенераті зменшувався на 21,6 % ($p < 0,05$) відносно значення третього тижня; через 5 тижнів експерименту параметр поступався попередньому терміну на 12,4 % ($p < 0,05$). Показник, що встановлено через 8 тижнів після імплантації, не відрізнявся істотно від значення 5-го тижня. Через 12 тижнів експерименту відносний об'єм матеріалу Хітозан-А становив $(43,7 \pm 3,7) \%$ від загального об'єму регенерату, що на 12,8 % ($p < 0,05$) поступалося рівню 8-го

тижня спостережень.

Вивчення відносного об'єму сполучної тканини в регенераті експериментального дефекту в контрольній групі дозволило встановити фазовий характер динаміки змін параметра. У перші три тижні експерименту спостерігалось активне зростання вмісту сполучнотканинного компонента у складі регенерату. Зокрема, через 1 тиждень після нанесення травми параметр зростав у 2,1 рази ($p < 0,05$) відносно значення через 1 добу; через 2 тижні експерименту – на 107,5 % ($p < 0,05$) у порівнянні з величиною 1-го тижня; через 3 тижні параметр підвищувався на 83,9 % ($p < 0,05$) відносно рівня попереднього терміну та сягав найвищого значення ($56,1 \pm 3,5$ %). У подальшій динаміці змін вмісту сполучної тканини спостерігалось поступове зниження показника: через 4 тижні – на 25,5 % ($p < 0,05$) відносно пікового значення 3-го тижня; через 5 і 8 тижнів – на 18,2 % ($p < 0,05$) і 39,5 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з попереднім терміном дослідження. У період від 8-го до 12-го тижня відносний об'єм сполучної тканини в регенераті, що формувався під кров'яним згустком, не змінювався у статистично вагомому ступені та стабілізувався на рівні ($24,5 \pm 2,0$ %).

Морфометричний аналіз в експериментальній групі тварин, у яких застосовували Хітозан-А, динаміка змін відносного об'єму сполучної тканини в регенераті суттєво відрізнялась за напрямком та інтенсивністю від тієї, що встановлена в контрольній групі. Після обмеженого зростання параметра впродовж першого тижня експерименту спостерігалось різке падіння вмісту сполучнотканинного компонента регенерату. Зокрема, через 2 тижні після травми значення показника у експериментальних тварин зменшувалось на 43,2 % ($p < 0,05$) у порівнянні з величиною першого тижня, що в 4,1 рази поступалося контрольному рівню відповідного терміну експерименту. Через 3 тижні після імплантації матеріалу відносний об'єм сполучної тканини в регенераті залишався на рівні ($7,1 \pm 1,3$ %), що було в 7,9 рази нижчим за контрольну величину. На відміну від контрольної групи, починаючи з 4-го тижня спостерігалось поступове збільшення досліджуваного параметра в експериментальній групі. Через 4 тижні параметр після імплантації матеріалу Хітозан-А зростав відносно 3-го тижня на 107,0 % ($p < 0,05$), при цьому поступаючи відповідному за терміном значенню контролю на 64,8 % ($p < 0,05$). Через 5 тижнів параметр в експериментальній групі перевищував значення 4-го тижня на 26,5 % ($p < 0,05$), проте поступався значенню контролю на 45,6 % ($p < 0,05$). У терміни 8 і 12 тижнів після імплантації матеріалу Хітозан-А вміст сполучної тканини в регенераті мав тенденцію до збільшення та в статистично значущому ступені не відрізнявся від відповідних за терміном контрольних значень.

При гістологічному дослідженні демінералізованих фрагментів коміркової частини нижньої щелепи через одну добу після імплантації активованого хітозану виявлялись численні дрібні осередки крововиливів та тромбоутворення внаслідок руйнування стінок мікросудин. Значний периваскулярний та інтерстиційний набряк істотно пошкоджував загальну гістоархітектуру періосту. Лейкоцитарна інфільтрація мала обмежену виразність. По краях шахти у материнській кістці спостерігались дрібні скупчення фібринових мас і осередки гемосидерозу. У просвітах мікросудин компактної кортикальної пластинки визначались ознаки стазу та складування еритроцитів. Прояви дезорганізації та гомогенізації пластинок остеонів материнської кістки супроводжувались появою численних резорбційних лакун. Електронномікроскопічно виявлялись поодинокі активні остеокласти, що підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами. Остеоцити містили набряклу цитоплазму, навколо них спостерігався інтерстиційний набряк та деструкція пучків колагенових фібрил. Зі сторони періосту навколо дефекту не виявлялись будь-які ознаки неоваскулогенезу, фіброзування або проліферації фібробластів. Визначення проліферативного маркера виявило обмежену кількість Ki-67-позитивних клітин у даній локалізації. Поблизу ендосту ушкоджених кісткових трабекул на межі з імплантованим матеріалом спостерігались гемокапіляри та ендотеліальні тяжі в супроводі фібробластів, що вказувало на утворення прошарку грануляційної тканини по краях експериментального дефекту. Це підтверджувалось активним накопиченням імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 у ядрах фібробластів і ендотеліоцитів ендосту.

Через один тиждень після нанесення експериментальної травми прояви набряку та інші ознаки травматичного запалення навколо зони дефекту зберігались і в окремих ділянках навіть зростали у порівнянні з попереднім терміном експерименту. Прояви дезорганізації материнської кістки посилювалися, спостерігалась гомогенізація кісткового матриксу та зростала площа резорбційних порожнин, заповнених детритом, фібриноідом або гемосидериновими депозитами. На поверхні хітозанового імплантату спостерігались ознаки періостальної реакції, що супроводжувалось активним вrostанням мікросудин у товщу регенерату, проте міграція малодиференційованих клітин не відбувалась. Травмовані остеони і кісткові трабекули материнської кістки по краях дефекту мали горбисту поверхню внаслідок утворення дрібних остеоїдних виростів. У складі таких виростів поряд із поодинокими остеокластами навколо гемокапілярів спостерігалась значна кількість остеобластів, які розташовувались поодинокі та при імуногістохімічно-

му вивченні експресії маркера Ki-67 інтенсивно накопичували мітку проліферації. При ультраструктурному дослідженні навколо остеобластів виявлялись окремі неупорядковані пучки колагенових волокон, проте переважав гомогенний органічний матрикс.

Наприкінці першого тижня експерименту в периферичних ділянках регенерату між фрагментами імплантованого матеріалу спостерігалась значна щільність CD34-позитивних структур у вигляді примітивних гемокапілярів і ендотеліальних паростків, що вказувало на активний неоваскулогенез. Навколо гемокапілярів зустрічались численні остеопрогеніторні клітини. Звертала на себе увагу та обставина, що попри щільну васкуляризацію поверхневих ділянок імплантату кількість осередків десмального остеогенезу значно поступалася контрольній групі. Помірне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 в ядрах фіброblastів, остеобластів та їх низькодиференційованих попередників свідчило про обмежену проліферацію на периферії регенерату. На електроннограмах навколо фіброblastів і остеобластів в поодиноких острівцях десмального остеогенезу розташовувались неупорядковані колагенові волокна з ознаками незрілості, які не утворювали організованих пучків. В остеїді цих острівців аморфний компонент низької електронної щільності значно переважав над колагеновими волокнами.

Протягом 2-го і 3-го тижнів після імплантації спостерігалась суттєва активізація відновлення періостальних структур разом із інтенсивним репаративним остеогенезом на внутрішній поверхні ушкодженої материнської кістки. Численні новоутворені остеїдні випинання вкривали переважну частину поверхні трабекул. Запально-інфільтративні прояви в ділянці експериментального кісткового дефекту поступово редукувались.

У периферичних ділянках регенерату на тлі активного неоваскулогенезу спостерігалось накопичення дрібних острівців десмального остеогенезу та їх об'єднання з утворенням тонких грубоволокнистих трабекул. Значна кількість остеопрогеніторних клітин навколо мікросудин вказувала на їх активну міграцію у внутрішні ділянки імплантованої маси хітозану, проте утворення остеогенних острівців, на відміну від групи контролю, залишалось обмеженим, а їх вміст з обмеженою кількістю колагенових пучків виглядав слабо структурованим (рис. 7). Також була незначною проліферативна активність фіброblastів, остеобластів та їх низькодиференційованих попередників, що підтверджувалось результатами імуногістохімічного визначення експресії маркера Ki-67.

У глибокій зоні остеорегенерату осередки перетинчастого остеогенезу зустрічались рідко, не анастомозували один з одним, ступінь васку-

ляризації був значно меншим, ніж у тварин контрольної групи. Між поодинокими остеогенними острівцями на тлі значної маси імплантованого матеріалу візуалізувались дрібні прошарки пухкої сполучної тканини. При трансмісійній електронній мікроскопії в даній локалізації гетероморфні остеобласти розташовувались поодинокі та мали ультраструктурні ознаки помірної синтетичної активності.

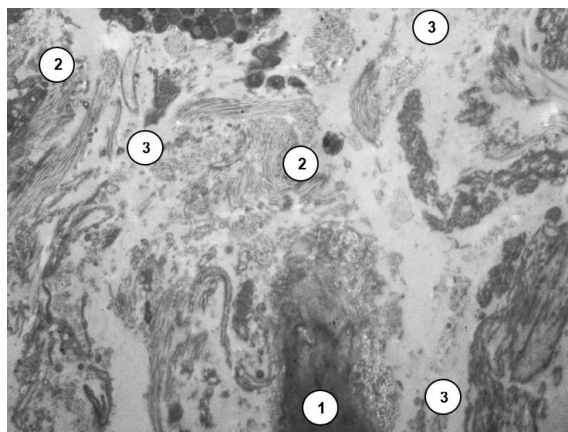


Рис. 7. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 2 тижні після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – фрагмент остеобласта з ознаками незрілості; 2 – пучки колагенових волокон; 3 – аморфний матрикс. $\times 2000$.

Через 4 і 5 тижнів після імплантації матеріалу Хітозан-А у периферичних ділянках регенерату виявлялась невелика кількість тонких грубоволокнистих трабекул з переважно радіальною орієнтацією, які анастомозували між собою, а також з відновленими трабекулами материнської кістки. Компактна материнська кістка зберігала залишкові ознаки посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу, навколо гемокапілярів спостерігалась поява активних остеокластів, що підтверджувалось при імуногістохімічному дослідженні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Через 5 тижнів невелика кількість остеокластів розташовувалась у складі новоутворених трабекул регенерату, що свідчило про початок ремоделювання ретикулофіброзної тканини периферичних ділянок з формуванням примітивних кісткових пластинок. При трансмісійній електронній мікроскопії у складі пластинок щільно упаковані колагенові волокна утворювали переважно паралельні пучки, хоча взаємна орієнтація пучків між собою була слабо впорядкованою (рис. 8). У тих трабекулах, що заглиблювались у товщу регенерату, кількісно переважали остеобласти з ультраструктурними ознаками помірної синтетичної активності. Остеїд поблизу остеобластів містив пухко угруповані колагенові волокна з варіативною орієнтацією їх пучків. На відміну від контрольної групи, в ядрах остеобластів і їх клітин-

попередниць спостерігалась невисока експресія маркера проліферації Ki-67, що свідчило про обмеження проліферативної активності остеогенного диферону.

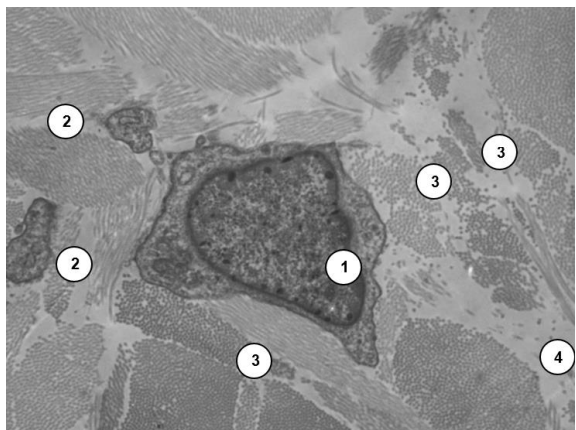


Рис. 8. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 5 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – незрілий остеокит; 2 – відросток остеокита; 3 – пучки колагенових волокон; 4 – аморфний матрикс. $\times 4000$.

Глибока зона дефекту у цей період містила невелику кількість дрібних острівців перетинчастого остеогенезу і поодинокі грубоволокнисті кісткові трабекули. На відміну від контрольної групи, візуалізувалась обмежена кількість гетероморфних поодинокі розташованих остеобластів з помірною синтетичною активністю. Трансмісійна електронна мікроскопія виявила розвинуті елементи комплексу Гольджі та гранулярного ендоплазматичного ретикулуму в цитоплазмі остеобластів, а також невелику кількість хаотично розташованих колагенових фібрил на тлі аморфного матриксу остеїду з низькою електронною щільністю. При імуногістохімічному аналізі розподілу маркера CD34 виявилось, що новоутворені гемокапіляри не формували характерної сітки, щільність судин була незначною, часто мікросудини не мали просвіту і виглядали як капілярні паростки. Експресія маркера проліферації Ki-67 в ядрах ендотеліоцитів мала високу інтенсивність, в той час як інші клітинні диферони виявляли невисоку проліферативну активність. У широких міжтрабекулярних просторах переважала пухка сполучна тканина з незначною васкуляризацією й ознаками помірного фіброзування.

Через 8 тижнів після імплантації активованого хітозану під відновленим періостом поблизу компактної материнської кістки і на периферії регенерату, що прилягав до губчастої материнської кістки, візуалізувалась пухка сітка новоутворених трабекул, які значно поступалися контрольній групі за ступенем анастомозування. Ті трабекули, що межували з материнською кісткою, містили примітивні кісткові пластинки з чисель-

ним переважанням незрілих форм остеокитів. У внутрішніх трабекулах виявлялись ознаки обмеженого за активністю ремоделювання. Зокрема, частина остеокластів навколо гемокапілярів мала ультраструктурні ознаки активації, хоча спостерігались також незрілі компактні клітини овоїдної форми з 3-5 ядрами, що не контактували з пучками колагенових волокон. У складі грубоволокнистої тканини поряд із відокремленими остеобластами переважали незрілі відносно великі остеокити, в той час як між кістковими пластинками зустрічались поодинокі остеокити з відростками та редукованою цитоплазмою. Новоутворені кісткові пластинки значно варіювали за розмірами, конфігурацією, щільністю пучків колагенових фібрил і їх просторовим упорядкуванням.

Через 12 тижнів після застосування активованого хітозану поблизу періосту регенерат містив компактнізовані кісткові пластинки із завершеним ремоделюванням, проте новоутворені остеони мали деформовану геометрію, яка значно відрізнялась від прилеглої материнської компактної кістки. Остеоцитарна лакуно-каналцева система регенерату на його периферії мала ознаки незавершеного відновлення. Остеокити між пластинками були представлені переважно незрілими формами (рис. 9).

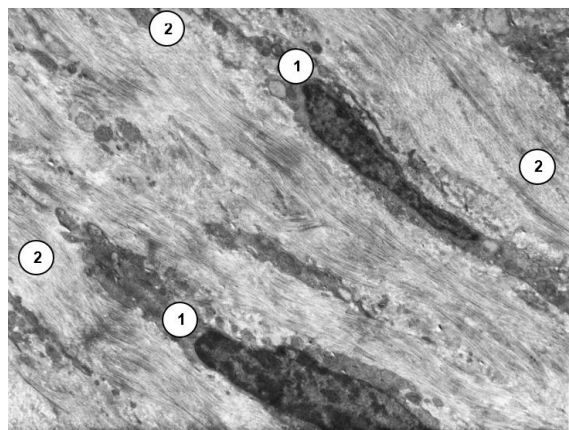


Рис. 9. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Хітозан-А. 1 – остеокит з ознаками незрілості; 2 – пучки колагенових волокон. $\times 4000$.

При трансмісійній електронній мікроскопії орієнтація пучків колагенових волокон у складі кісткових пластинок мала обмежену просторову впорядкованість на тлі аморфного остеомаатриксу. Кількість остеокластів навколо мікросудин значно перевищувала рівень контрольної групи, проте їх активність була невисокою. Новоутворені трабекули із завершеним ремоделюванням мали гладку поверхню та містили розвинуте гемокапілярне русло, що підтверджувалось при визначенні експресії ендотеліального маркера

CD34. Результати імуногістохімічного дослідження показали невисокий вміст Ki-67-позитивних ядер клітин переважної більшості трабекул, що свідчило про обмеження морфогенетичних перебудов на периферії остеорегенерату.

Наприкінці експерименту глибока зона регенерату містила гетероморфні сполучнотканинні ділянки і пухко розташовані кісткові трабекули з ознаками незавершеного ремоделювання. Крім того, візуалізувались поодинокі дрібні осередки десмального остеогенезу. Губчаста структура переважно грубоволокнистої тканини глибокої зони містила щільну сітку новоутворених мікросудин, які були оточені прошарками колагенових волокон. Кількість остеогенних клітин та остеокластів була значно нижчою, ніж у тварин групи контролю, проте визначались численні ознаки ремоделювання більшості трабекул.

Висновки

1. Пошарова імплантація матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін (зовнішній сегмент трансплантату – комплекс хітозану з ампіциліном, внутрішній сегмент – гранули модифікованого натурального октакальційфосфату) створює умови для реалізації ефекту вторинної остеоіндукції. Зокрема, через 1 тиждень після імплантації під щільним хітозановим покриттям утворюється зона гіпоксії, яка індукує інтенсивне відновлення періосту та активує неоваскулогенез із супровідною міграцією і цитодиференціюванням остеопрогеніторних клітин з двох напрямів: 1) від мікросудин відновленого періосту та 2) від ушкоджених трабекул материнської кістки по краях експериментального дефекту. Впродовж 2-3-го тижнів пори внутрішнього сегменту імплантату з модифікованим октакальційфосфатом забезпечують повну васкуляризацію кістково-керамічного регенерату, насичення його острівцями десмального остеогенезу з наступним утворенням грубоволокнистих трабекул і хвилеподібним розповсюдженням процесів ремоделювання кісткової тканини від периферії регенерату в напрямку його глибокої зони.

2. Поява зрілих остеоцитів на 4-му тижні індукується мінералізованим матриксом відновлених материнських трабекул на периферії імплантату, а також гранулами екзогенного октакальційфосфату по всьому об'єму остеорегенерату за умов кисневого дефіциту його внутрішніх ділянок. Через 8 тижнів імплантація ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін забезпечує завершення ремоделювання периферичних трабекул і компактизацію відновленої пластинчастої тканини поблизу періосту з утворенням повноцінної остеоцитарної лакуно-каналцевої системи. Поширення хвилі ремоделювання у глибоку зону кістково-керамічного регенерату через 12 тижнів обумовлює формування остеонів з наближеною до інтактною гістоархітектурою, обмеження проліфера-

тивної та синтетичної активності остеобластів і редукцію фібротичних змін. Імплантація даного матеріалу завершується повною остеоінтеграцією кістково-керамічного регенерату як з компактною, так і з губчастою материнською кісткою.

3. За умов застосування матеріалу Хітозан-А відбувається обмежене зростання відносного об'єму кісткової тканини в регенераті, яке за інтенсивністю змін значно поступається динаміці у тварин контрольної групи. Встановлено фазовий характер динаміки змін сполучнотканинного компонента у складі регенерату. Після обмеженого зростання параметра впродовж першого тижня експерименту спостерігається різке його падіння на другому тижні, що в 4,1 рази поступається контрольному рівню. Наприкінці експерименту залишки імплантованого матеріалу у великій кількості зустрічаються між новоутвореними трабекулами, що свідчить про продовження процесів ремоделювання трабекулярних структур регенерату.

4. Імплантація активованого хітозану створює умови для інтенсивного відновлення періосту і стимулює утворення остеоїдних виростів на поверхні ушкоджених кісткових трабекул за рахунок проліферації та синтетичної діяльності остеобластів впродовж перших трьох тижнів експерименту. В цей період на тлі активного неоваскулогенезу, на відміну від контрольної групи, відбувається гальмування утворення острівців перетинчастого остеогенезу та їх об'єднання в трабекули, не дивлячись на активну міграцію остеопрогеніторних клітин. Через 5 тижнів у периферичних ділянках регенерату утворюється примітивна губчаста структура стоншених новоутворених трабекул і спікул з обмеженим анастомозуванням і ознаками ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки. У цей період глибока зона регенерату складається з поодиноких грубоволокнистих кісткових трабекул, містить обмежену кількість гетероморфних поодинокі розташованих остеобластів з помірною синтетичною активністю, у широких міжтрабекулярних просторах переважає пухка сполучна тканина з ознаками помірного фіброзування.

5. Через 8 тижнів після імплантації активованого хітозану на тлі обмеженої остеоінтеграції в периферичних ділянках регенерату відбувається повільне дифузне ремоделювання пухко розташованих трабекул з утворенням примітивних кісткових пластинок. Ознаки компактизації новоутвореної кістки поблизу періосту з'являються лише через 12 тижнів експерименту. Остеони з деформованою геометрією містять переважно незрілі форми остеоцитів, причому орієнтація пучків колагенових волокон у складі кісткових пластинок має обмежену просторову впорядкованість на тлі значної частки аморфного остеоматриксу. Наприкінці експерименту глибока зо-

на регенерату містить гетероморфні сполучнотканинні ділянки і пухко розташовані кісткові трабекули з ознаками незавершеного ремоделювання.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з порівняльним аналізом тканинних, клітинних і ультраструктурних характеристик процесів регенерації нижньої щелепи після її травматичного ушкодження із наступною імплантацією ризних 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 науково-дослідної 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. Valtanen RS, Yang YP, Gurtner GC, Maloney WJ, Lowenberg, DW. Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future?. *Injury*. 2021;52(2):S72-S77. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.07.040>
3. 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>
4. Aguilar A, Zein N, Harmouch E, Hafdi B, Bornert F, Offner D, et al. Application of chitosan in bone and dental engineering. *Molecules*. 2019;24(16):3009. <https://doi.org/10.3390/molecules24163009>
5. Doderio A, Scarfi S, Mirata S, Sionkowska A, Vicini S, Alloisio M, et al. Effect of crosslinking type on the physical-chemical properties and biocompatibility of chitosan-based electrospun membranes. *Polymers (Basel)*. 2021;13(5):831. <https://doi.org/10.3390/polym13050831>
6. Sukpaita T, Chirachanchai S, Pimkhaokham A, Ampornaramveth RS. Chitosan-Based Scaffold for Mineralized Tissues Regeneration. *Mar Drugs*. 2021;19(10):551. <https://doi.org/10.3390/md19100551>
7. 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>
8. 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
9. 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>
10. 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>
11. Mulish M, Welsh U. (Eds.). *Romeis Mikroskopische 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. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR, Ritchie NWM, Scott JHJ, Joy DC. *Scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis*. New York, NY: Springer New York; 2017. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>
18. Poslavska OV. [Determination of linear dimensions and square surfaces areas of morphological objects on micrographs using ImageJ software]. *Morphologia*. 2016;10(3):377-81. Ukrainian.
19. Hruziova TS, Lekhan VM, Ohniov VA, Haliienko LI, Kriachkova LV, Palamar BI, et al. [Biostatistics]. Vinnytsia: New Book; 2020. 384 p.

Ukrainian.

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

21. 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 та хітозану: гістологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні аспекти.

РЕФЕРАТ. У статті представлені результати дослідження гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації октакальційфосфату (ОКФ-Н) і хітозану 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 і активованим хітозаном. **Методи.** Досліди виконано на 89 кроликах-самцях віком 6-7 міс, масою 2,5-3,0 кг. 20 тварин становили контрольну групу, 64 – дві експериментальні, по 32 в кожній. 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. Першу експериментальну групу складали 32 кролики, у яких кістковий дефект заповнювали модифікованим натуральним октакальційфосфатом з сумішшю хітозану та ампіциліну (ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін). Другу експериментальну групу складали 32 кролики, у яких кістковий дефект заповнювали активованим хітозаном (Хітозан-А). 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. Рельєфні зміни вивчали шляхом скануючої електронної мікроскопії. **Результати та підсумок.** Пошарова імплантація матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін (зовнішній сегмент трансплантату – комплекс хітозану з ампіциліном, внутрішній сегмент – гранули модифікованого натурального октакальційфосфату) створює умови для реалізації ефекту вторинної остеоіндукції. Зокрема, через 1 тиждень після імплантації під щільним хітозановим покриттям утворюється зона гіпоксії, яка індукує інтенсивне відновлення періосту та активує неоваскулогенез із супровідною міграцією і цитодиференціюванням остеопрогеніторних клітин з двох напрямів: 1) від мікросудин відновленого періосту та 2) від ушкоджених трабекул материнської кістки по краях експериментального дефекту. Впродовж 2-3-го тижнів пори внутрішнього сегменту імплантату з модифікованим октакальційфосфатом забезпечують повну васкуляризацію кістково-керамічного регенерату, насичення його острівцями десмального остеогенезу з наступним утворенням грубоволокнистих трабекул і хвилеподібним розповсюдженням процесів ремоделювання кісткової тканини від периферії регенерату в напрямку його глибокої зони. За умов застосування матеріалу Хітозан-А відбувалося обмежене зростання параметра відносного об'єму кісткової тканини в регенераті протягом досліджуваного періоду, яке за інтенсивністю змін значно поступалося динаміці у тварин контрольної групи. Імплантація активованого хітозану створює умови для інтенсивного відновлення періосту і стимулює утворення остеοїдних виростів на поверхні ушкоджених кісткових трабекул за рахунок проліферації та синтетичної діяльності остеобластів впродовж перших трьох тижнів експерименту. Через 5 тижнів у периферичних ділянках регенерату утворюється примітивна губчаста структура стоншених новоутворених трабекул і спікул з обмеженим анастомозуванням і ознаками ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки. Через 8 тижнів після імплантації активованого хітозану на тлі обмеженої остеοінтеграції в периферичних ділянках регенерату відбувається повільне дифузне ремоделювання пухко розташованих трабекул з утворенням примітивних кісткових пластинок. Ознаки компактизації новоутвореної кістки поблизу періосту з'являються лише через 12 тижнів експерименту. Остеони з деформованою геометрією містять переважно незрілі форми остеοцитів, причому орієнтація пучків колагенових волокон у складі кісткових пластинок має обмежену просторову впорядкованість на тлі значної частки аморфного остеοматриксу. Наприкінці експерименту глибока зона регенерату містить гетероморфні сполучнотканинні ділянки і пухко розташовані кісткові трабекули з ознаками незавершеного ремоделювання.

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