

І.В. Челпанова

Львівський національний
медичний університет
імені Данила Галицького
Львів, Україна

Надійшла: 21.04.2023

Прийнята: 27.05.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.2.75-86>

УДК: 616.714-089.843-073.7-018.1

РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НАТУРАЛЬНОГО КОЛАГЕНУ: ГІСТО- ЛОГІЧНІ, ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ АСПЕКТИ

Chelpanova I.V.   Mandibular bone remodeling after natural collagen transplantation: histological, immuno-histochemical 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 natural collagen 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 natural collagen. **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 collagen (Col-C). The second experimental group consisted of 32 rabbits where the bone defect was filled with natural collagen, , with simultaneous intramuscular injection of Lincomycin at a dose of 12 mg/kg of animal weight once daily for 6 days (Col-C-Lincomycin). 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.** Augmentation of the experimental defect using natural collagen results in intensive stimulation of neovascularization and the formation of numerous islands of desmal osteogenesis not only at the periphery but also in the inner regions of the regenerate. However, periosteal regeneration on the surface of the implanted material proceeds at a restrained pace during the first three weeks of the experiment. During this period, against a background of persistent inflammatory infiltration, the osteoconductive effect of the collagen implant is realized through the formation of a developed spongy structure of woven bone trabeculae due to the active migration of osteoprogenitor cells and the high mitotic and synthetic activity of clustered osteoblasts, although their degree of maturation remains limited. Due to the predominance of proliferative dynamics (based on the study of Ki-67 and CD34 marker expression) over the rate of osteogenic cell maturation, five weeks post-implantation the bone regenerate is a dense network of woven bone trabeculae with isolated loci of remodeling and without compaction signs. In the first three weeks post-implantation, the osteoconductive potential of exogenous collagen is manifested by accelerated vascularization of the peripheral and deep zones of the regenerate, enhanced migration and proliferation of poorly differentiated fibroblast and osteoblast precursors, and a significant increase in the number and density of membranous osteogenesis foci. Between weeks 8 and 12 post-implantation of natural collagen, against a background of osteoclast activation, trabecular remodeling occurs synchronously throughout the osteoregenerate. Gradual compaction and mineralization of the lamellar bone tissue leads to the formation of a primitive lacuno-canalicular system, ensures significant but incomplete osteointegration of the regenerate, is accompanied by a reduction in the proliferative activity of fibroblast and osteoblast differentiating cells, maturation of most osteocytes, and stabilization of the overall histoarchitecture of the osteoregenerate.

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

Citation:

Chelpanova IV. [Mandibular bone remodeling after natural collagen transplantation: histological, immuno-histochemical and ultrastructural aspects.]. Morphologia. 2023;17(2):75-86. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.2.75-86>

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

 ilona.med75@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Опрацювання нових технологій для регенерації кісткової тканини є важливим напрямком реконструктивної медицини [1]. Остеопластика широко застосовується для лікування кісткових дефектів. Застосування колагену в регенерації кісткової тканини є популярною процедурою. Завдяки вдосконаленню методів його отримання та очищення, сучасні препарати колагену мають максимально збережену природну структуру та мінімальну здатність викликати імунну реакцію [2].

Найпоширенішим білком у кістковому матриксі є колаген I типу, який утворює структуру потрібної спіралі, що забезпечує структурну підтримку та механічну міцність [3], біосумісність, клітинну адгезію та остеопровідність [4]. Для успішного заміщення кісткової тканини та забезпечення необхідної васкуляризації матеріали на основі колагену потребують модифікації, яка полягає в створенні комбінацій колагену з іншими біоактивними речовинами. Перспективним є поєднання колагену і лікарських засобів, наприклад, антибіотиків, в тому числі лінкоміцину, а вибір матеріалу для кісткової пластики залежить від багатьох факторів, таких як доступність, розмір дефекту, біомеханічні властивості, простота обробки, вартість, етичні аспекти, біологічні властивості та можливі ускладнення [5].

Вивчення гістологічних та ультраструктурних перебудов кісткового регенерату після застосування різних остеотропних матеріалів, його міжклітинного матриксу та клітинних елементів заслуговують особливої уваги [6, 7]. При чому, визначення імуногістохімічних характеристик клітинного, волокнистого та мікроциркуляторного компонентів під час остеорегенеративних перетворень набуває ще більшої актуальності з огляду на зростання кількості травматичних уражень кісток [8].

Мета дослідження – визначити динаміку гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних змін у кістці нижньої щелепи кролика після її травматичного ушкодження із наступним заміщенням дефекту модифікованим натуральним колагеном з одночасним застосуванням лінкоміцину.

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 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 4x3 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 натуральним колагеном Collacone («Botiss dental», Germany) (Кол-К). Другу групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали натуральним колагеном з одночасним дом'язовим введенням лінкоміцину у дозі 12 мг/кг маси тварини 1 раз на добу впродовж 6 діб (Кол-К-Лінкоміцин).

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 [9, 10].

Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно протоколів компанії ThermoScientific (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 тетрахлоїду (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 [11, 12].

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 [13]. 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 [14].

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 [15, 16].

Результати та їх обговорення

При гістологічному дослідженні демінералізованої нижньої щелепи через одну добу після імплантації натурального колагену значний периваскулярний та інтерстиційний набряк істотно пошкоджував загальну гістоархітектуру періосту. Виявлялись численні дрібні осередки крововиливів та тромбоутворення внаслідок руйнування стінок мікросудин. Лейкоцитарна інфільтрація мала суттєву виразність. По краях шахти у материнській кістці спостерігались дрібні скупчення фібринових мас і осередки гемосидерозу. У просвітах мікросудин компактної кортикальної пластинки визначались ознаки стази та сладжування еритроцитів. Прояви дезорганізації та гомогенізації пластинок остеонів материнської кістки супроводжувались появою численних резорбційних лакун. При електронномікроскопічному дослідженні виявлялись поодинокі активні остеокласти, що підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами. Остеоцити характеризувались значним інтрацелюлярним набряком. Також спостерігались інтерстиційний набряк та деструкція пучків колагенових фібрил. Зі сторони ушкодженого травмою періосту навколо дефекту спостерігались ознаки підвищення проліферативної активності ендотеліоцитів, що підтверджувалось значним накопиченням в їх ядрах імуногістохімічної мітки Ki-67.

Поблизу ендосту ушкоджених кісткових трабекул на межі з імплантованим матеріалом локалізувались гемокапіляри та ендотеліальні тяжі в супроводі фіброblastів, що вказувало на утворення прошарку грануляційної тканини по

краях експериментального дефекту. Це підтверджувалось активним накопиченням імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 у ядрах фіброblastів і ендотеліоцитів ендосту. У периферичних ділянках імплантованого колагену спостерігались численні новоутворені примітивні гемокапіляри без формених елементів крові, навколо яких виявлялася висока концентрація молодиференційованих клітин.

Через один тиждень після нанесення експериментального дефекту та імплантації матеріалу Кол-К прояви набряку та інші ознаки травматичного запалення навколо зони дефекту зростали, ознаки дезорганізації материнської пластинчастої кістки посилювались у порівнянні з попереднім терміном спостереження. Як і в групі контрольних тварин, спостерігалась гомогенізація кісткового матриксу та збільшувалась площа резорбційних порожнин, заповнених детритом, фібриноідом або гемосидериновими депозитами. Структури періосту не виявляли ознак відновлення, хоча численні мікросудини занурювались в товщу імплантованого матеріалу. Травмовані остеони і кісткові трабекули по краях дефекту мали горбисту поверхню внаслідок утворення численних дрібних остеїдних виростів. У складі таких виростів поряд із поодинокими остеокластами навколо гемокапілярів спостерігалась значна кількість остеобластів, які при імуногістохімічному забарвленні із застосуванням маркера Ki-67 інтенсивно накопичували проліферативну мітку. При ультраструктурному дослідженні навколо остеобластів виявлялись невідповідні пучки колагенових волокон, занурених у гомогенний органічний матрикс.

Наприкінці першого тижня експерименту в периферичних ділянках регенерату між фібрилами екзогенного колагену виявлялись численні осередки десмального остеогенезу зі щільним вмістом новоутворених примітивних гемокапілярів і гетероморфних клітин – фіброblastів, остеобластів та їх низькодиференційованих попередників. Активне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 в ядрах означених клітин свідчило про їхню активну проліферацію. Значна щільність CD34-позитивних структур у вигляді примітивних гемокапілярів і ендотеліальних тяжів вказувала на активний неоваскулогенез на периферії та у внутрішніх ділянках регенерату, що супроводжувалось активною міграцією остеопрогеніторних клітин. Гематогенні клітини навколо гемокапілярів зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. На електронних знімках навколо фіброblastів і остеобластів в численних острівцях перетинчастого остеогенезу візуалізувались невідповідні колагенові волокна з ознаками незрілості, які не утворювали організованих пучків. В остеїді цих острівців аморфний компонент низької електронної щільності значно переважав над колагеновими волокнами.

У глибокій зоні регенерату виявлялась незначна кількість кровоносних мікросудин в оточенні активних фіброblastів. На відміну від контрольної групи, дана зона містила острівці перетинчастого остеогенезу.

Протягом 2-го і 3-го тижнів після імплантації колагенового конусу запальні прояви у складі кісткової тканини та структурах пародонту поблизу зони дефекту поступово редукувались у порівнянні з попереднім терміном. При електронномікроскопічному дослідженні виявлялись ультраструктурні ознаки дезорганізації материнської кістки та гомогенізації кісткового матриксу навколо зони травми, невеликі резорбційні порожнини (рис. 1).

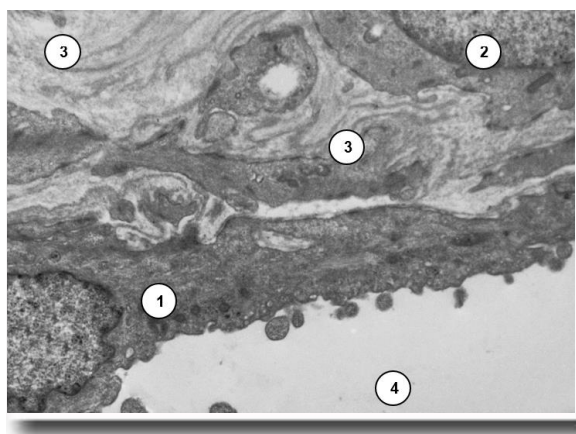


Рис. 1. Електронна трансмісійна мікрофотографія ушкодженої ділянки материнської кістки нижньої щелепи кролика через 2 тижні після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Кол-К. 1 – фіброblast по краю резорбційної порожнини; 2 – остеобlast; 3 – гомогенізований кістковий матрикс; 4 – резорбційна порожнина. $\times 5000$.

До кінця 3-го тижня тканинна структура періосту відновлювалась частково. По краях ушкодженої материнської кістки на поверхні травмованих остеонів і кісткових трабекул спостерігалась численні гетероморфні вирости остеїдної структури, які занурювались у товщу імплантату між остеогенними острівцями. Вирости від трабекул материнської кістки містили повнокровні гемокапіляри в оточенні незначної кількості остеокластів. Остеобlastи за чисельністю значно переважали над іншими клітинами і розташовувались поодинокі в товщі органічного матриксу. При визначенні експресії маркера проліферації Ki-67 переважна кількість імуногістохімічної мітки накопичувалась в ядрах остеобlastів, у той час як ядра ендотеліоцитів детермінант Ki-67 не експресували. Вивчення Calcitonin-SP17-клональних антитіл показало помірну резорбційну активність остеокластів. Застосування маркера CD34 виявило значний ступінь васкуляризації. На електронограмах остеїд у даній локалізації містив незначну кількість слабо орієнтованих пучків колагенових волокон навколо остеоб-

lastів, хоча вони містили розвинуту зернисту ендоплазматичну сітку та комплекс Гольджі.

На периферії та у внутрішніх ділянках кісткового регенерату остеїди перетинчастого остеогенезу, на відміну від групи контролю, візуалізувались у значно більшій кількості. Остеогенні остеїди анастомозували з утворенням трабекул, а також об'єднувались з горбистими кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. В їх складі візуалізувались численні гемокапіляри в оточенні остеобlastів, які розташовувались поодинокі або утворювали групи. У міжтрабекулярних просторах зосереджувались фіброblastи у невеликій кількості та численні остеопрогеніторні клітини. При електронномікроскопічному дослідженні остеїд новоутворених трабекул містив гетероморфні колагенові волокна та їх пучки з неупорядкованою орієнтацією, які суттєво поступалися за площею аморфному матриксу (рис. 2). У міжтрабекулярних просторах навколо фіброblastів фіброзний компонент регенерату поступався аморфному компоненту. Ультраструктура остеобlastів на межі з материнською кісткою та в товщі регенерату свідчила про їх високу синтетичну і секреторну активність. Інтенсивне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 спостерігалось переважно в ядрах остеобlastів і їх клітин-попередниць рівномірно майже по всьому об'єму імплантату. Значна експресія маркера CD34 у мембранах і цитоплазмі ендотеліальних клітин також визначалась як на периферії, так і у внутрішніх зонах регенерату. Остеокласти та інші гематогенні клітини зустрічались у незначній кількості, Calcitonin-SP17-позитивні структури не виявлялись.

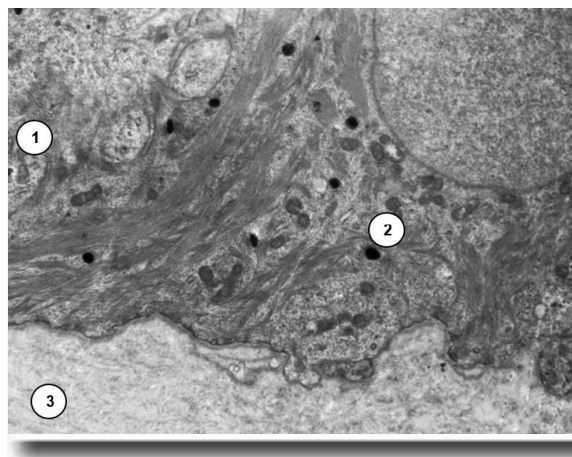


Рис. 2. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 2 тижні після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Кол-К. 1 – малоциференційована остеогенна клітина; 2 – остеобlast; 3 – остеїд. $\times 5000$.

Внутрішня зона регенерату містила численні примітивні не заповнені еритроцитами мікросудини і капілярні паростки. Значна частина новоутворених гемокапілярів мала заповнений фор-

меними елементами крові просвіт. Навколо таких функціонально спроможних мікросудин візуалізувалися численні дрібні острівці десмального остеогенезу. На відміну від контрольної групи, в глибоких ділянках регенерату не виявлялись осередки хрящового матриксу, позбавленого мікросудин і волокон. Частина остеогенних острівців об'єднувалась з утворенням тонких грубоволокнистих кісткових трабекул без ознак ремоделювання. Значна частка глибокої зони була представлена осередками щільної неоформленої сполучної тканини та містила фіброцити і фібробласти з помірною секреторною активністю.

Через 4 і 5 тижнів після імплантації натурального колагену у периферичних і внутрішніх ділянках регенерату виявлялась велика кількість тонких грубоволокнистих трабекул, які за рахунок анастомозування між собою та з відновленими трабекулами материнської кістки утворювали суцільну губчасту структуру остеорегенерату. Компактна материнська кістка не містила ознак посттравматичної дезорганізації, проте відновлені остеони значно варіювали за формою та розмірами. Навколо гемокапілярів новоутворених трабекул спостерігалась поява численних остеокластів, проте їх активність була незначною, що підтверджувалось при імуногістохімічному дослідженні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл і свідчило про початкові етапи ремоделювання ретикулофіброзної тканини з формуванням примітивних кісткових пластинок. На відміну від контрольної групи, обмежене за активністю та уповільнене за часом ремоделювання розпочиналось синхронно майже по всьому об'єму кісткового регенерату. При трансмісійній електронній мікроскопії у складі пластинок щільно упаковані колагенові волокна утворювали слабо орієнтовані та упорядковані пучки. У трабекулах глибокої зони регенерату кількісно переважали остеобласти з ультраструктурними ознаками значної синтетичної активності. Остеоїд поблизу остеобластів містив щільно 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. На відміну від попереднього терміну спостережень, глибока зона регенерату не містила остеогенних острівців. При імуногістохімічному дослідженні експресії маркера Ki-67 основні сполучнотканинні диферони не виявляли високої проліферативної активності. Фіброцити і фібробласти з помірною секреторною активністю утворювали значні осередки щільної неоформленої сполучної тканини між волокнами імплантованого екзогенного колагену, хоча їх загальна площа помітно поступалася попередньому терміну ек-

перименту.

На восьмому тижні посттравматичної регенерації після імплантації натурального колагену спостерігалось часткове відновлення загальної тканинної структури періосту в зоні ушкодження 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 матеріалом Кол-К не відрзнялись від групи інтактних тварин.

На периферії та у внутрішніх ділянках кісткового регенерату новоутворені трабекули містили розгалужену сітку мікросудин та мали мозаїчний тканинний склад. Зокрема, між чисельними осередками грубоволокнистої кісткової тканини трабекули містили скупчення примітивних кісткових пластинок. Гетероморфні пластинки примітивних остеонів межували з остеокластами, переважна частина яких була представлена активними формами поблизу резорбційних лакун. Інша частина остеокластів інтенсивно накопичувала Calcitonin-SP17-мітку, що вказувало на гальмування їх резорбтивної активності. За даними трансмісійної електронної мікроскопії, застосування остеопластики матеріалом Кол-К супроводжувалось накопиченням переважно незрілих остеоцитів не лише на периферії трабекул, а й у внутрішніх ділянках регенерату. На електроннограмах в цитоплазмі великих безвідростчастих остеоцитів візуалізувались численні елементи комплексу Гольджі та гранулярної ендоплазматичної сітки. Навколо численних остеобластів пучки щільно упакованих паралельних колагенових волокон межували з осередками невпорядкованих фібрил та аморфним матеріалом низької електронної щільності.

У глибокій зоні регенерату розташовувалась гетероморфна губчаста структура, яка складалася з примітивних кісткових пластинок, а також містила помітну кількість грубоволокнистої тканини. Серед остеогенних клітин переважали остеобласти, розташовані дифузно. При ультраструктурному дослідженні візуалізувались численні хаотично розташовані пучки колагенових волокон поблизу тих остеобластів, які мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності. Імуногістохімічне визначення експресії маркера Ki-67 виявило невисоку проліферативну активність остеобластів. Помірна кількість активних остеокластів з низькою Calcitonin-SP17-реактивністю виявлялася у ділянках грубоволокнистої кісткової тканини значної частини кісткових трабекул, що піддавалися ремоделюванню. На відміну від групи контролю, після остеопластики з використанням Кол-К сполучнотканинні

ділянки навколо мікросудин мали вигляд масивних прошарків, збагачених на хаотично угруповані колагенові волокна. Фіброцити і фібробласти з помірною секреторною активністю утворювали значні осередки щільної неоформленої сполучної тканини між волокнами імплантованого екзогенного колагену, хоча їх загальна площа помітно поступалася попередньому терміну експерименту. Загалом, інтеграція поверхні репаративного регенерату з материнською кісткою залишалась неповною.

Через 12 тижнів після імплантації матеріалу Кол-К спостерігалось повне відновлення структури періосту в зоні ушкодження та компактизація новоутворених кісткових пластинок поблизу періосту у зоні зовнішньої кісткової пластинки. Остеоцитарна лакуно-каналцева система компактної кістки регенерату за своєю структурою та геометрією не відрізнялась від будови інтактної материнської кістки. На відміну від групи контролю, після застосування остеотропного матеріалу осередки незавершеного остеогенезу або неповного ремоделювання не виявлялись. Кісткові трабекули в периферичних ділянках регенерату мали гладку поверхню без ознак новоутворення остеїду, містили розвинену мікросудинну сітку та суттєво меншу у порівнянні з попереднім терміном кількість остеогенних клітин. Низька інтенсивність імуногістохімічної мітки маркера Ki-67, а також невелика кількість остеокластів і остеобластів поряд із численними остеокцитами свідчили про завершення процесів ремоделювання периферичних і внутрішніх трабекул регенерату. При ультраструктурному дослідженні пучки колагенових волокон у багатьох ділянках мали слабку взаємну орієнтацію. Між сусідніми кістковими пластинками прошарки аморфного матеріалу низької електронної щільності варіювали за товщиною, що вказувало на незавершений характер мінералізації кісткового матриксу. На відміну від контрольної групи, після імплантації колагену не спостерігалось утворення мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах як на периферії репаративного регенерату, так і в його глибокій зоні. Інтеграція поверхні кісткового регенерату з материнською кісткою була значно кращою, ніж на попередньому терміні експерименту, проте на світлооптичному рівні демаркація в деяких ділянках зберігалась у вигляді варіативної за товщиною смужки слабо структурованого матеріалу.

У глибокій зоні регенерату трабекули склалися переважно зі сформованих кісткових пластинок, проте їх геометрія широко варіювала та відрізнялась від зрілих структур материнської кістки. При ультраструктурному дослідженні вони містили щільно упаковані паралельні фібрили з незначною часткою аморфного матеріалу новоутвореного остеїду. Переважна частина остеокитів між кістковими пластинками мала

ознаки структурно-функціональної зрілості; окремі остеокцити, навпаки, мали розвинуту цитоплазму, майже не утворювали відростків, містили елементи комплексу Гольджі та гранулярного ретикулуму (рис. 3).

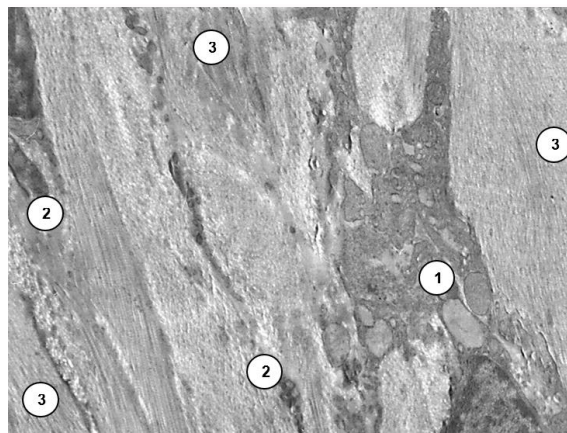


Рис. 3. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Кол-К. 1 – цитоплазма незрілого остеокцита; 2 – відросток зрілого остеокцита; 3 – пучки колагенових волокон. $\times 4000$.

У глибокій зоні регенерату зустрічались поодинокі дрібні осередки грубоволокнистої кісткової тканини, які містили помірну кількість активних остеокластів. При імуногістохімічному вивченні розподілу Calcitonin-SP17-позитивних остеокластів виявлялась помірна активність резорбції. Між гетероморфними кістковими трабекулами у стані ремоделювання спостерігались значні вогнища фіброзування, які містили поодинокі фібробласти та невисоку щільність CD34-позитивних ендотеліальних елементів. При трансмісійній електронній мікроскопії в ділянках фіброзу візуалізувались функціонуючі гемокапіляри з суцільною ендотеліальною стінкою і замкнутими міжэндотеліальними контактами в оточенні гетероморфних пучків зрілих колагенових волокон з хаотичною орієнтацією. За своєю загальною площею ділянки фіброзу помітно перевищували контрольний рівень.

При гістологічному дослідженні демінералізованої нижньої щелепи через одну добу після імплантації натурального колагену з введенням лінкоміцину інтерстиційний і периваскулярний набряк істотно пошкоджував загальну тканинну структуру періосту. Лейкоцитарна інфільтрація мала значну виразність. Спостерігались численні дрібні крововиливи та тромби у просвітах зруйнованих мікросудин. По краях дефекту у материнській кістці візуалізувались дрібні скупчення фібринових мас, у просвітах мікросудин у прилеглих тканинах визначались ознаки стазу. Значна дезорганізація та гомогенізація пластинок остеонів материнської кістки супроводжувалась появою численних резорбційних лакун. Трансмісій-

на електронна мікроскопія виявляла поодинокі активні остеокласти, що відповідало результатам імуногістохімічного аналізу експресії Calcitonin-SP17-клональних детермінант. Інтрацелюлярний набряк остеоцитів сполучався з інтерстиційним набряком та фрагментацією пучків колагенових волокон.

У складі ушкодженого травмою періосту навколо дефекту спостерігались ознаки підвищення проліферативної активності ендотеліальних клітин, що підтверджувалось значним накопиченням в їх ядрах імуногістохімічної мітки Ki-67. Поблизу ендосту зруйнованих кісткових трабекул губчастої материнської кістки на межі з імплантованим матеріалом локалізувались гемокapіляри та скупчення ендотеліальних клітин поблизу фібробластів, що свідчило про утворення грануляційної тканини по краях експериментального дефекту. Спостерігалось значне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 у ядрах фібробластів і ендотеліоцитів ендосту. Периферичні ділянки імплантованого колагену на тлі введення лінкоміцину містили численні новоутворені примітивні гемокapіляри без формених елементів крові, навколо яких визначалась висока концентрація малодиференційованих клітин.

Протягом першого тижня після нанесення експериментального дефекту та імплантації матеріалу Кол-К-Лінкоміцин прояви набряку та інші ознаки травматичного запалення навколо зони дефекту частково зберігались, ознаки дезорганізації материнської пластинчастої кістки посилювались у порівнянні з попереднім терміном спостереження. Як і в групі контрольних тварин, спостерігалась гомогенізація кісткового матриксу та збільшувалась площа резорбційних порожнин, заповнених детритом, фібриноідом або гемосидериновими депозитами. Від ушкодженого періосту численні мікросудини занурювались у товщу імплантованого матеріалу, ознак відновлення періостальних структур не спостерігалось. Внаслідок утворення численних дрібних остеоїдних виростів травмовані остеони і кісткові трабекули материнської кістки по краях дефекту мали горбисту поверхню. При імуногістохімічному забарвленні із застосуванням маркера Ki-67 у складі таких виростів поряд із поодинокими остеокластами навколо гемокapілярів спостерігалась значна кількість остеобластів, які інтенсивно накопичували мітку і демонстрували високий проліферативний потенціал. Навколо остеобластів трансмісійна електронна мікроскопія виявила невпорядковані пучки колагенових волокон, занурених у гомогенний органічний матрикс.

Через один тиждень експерименту периферичні ділянки регенерату містили численні осередки десмального остеогенезу між фібрилами екзогенного колагену. В остеогенних острівцях

виявлялись численні новоутворені примітивні гемокapіляри в оточенні фібробластів, остеобластів та їх низькодиференційованих попередників. Ядра означених клітин інтенсивно накопичували імуногістохімічну мітку Ki-67, що свідчило про їхню активну проліферацію. CD34-позитивні структури у вигляді примітивних гемокapілярів і ендотеліальних тяжів свідчили про активний неоваскулогенез на периферії та у внутрішніх ділянках регенерату, що супроводжувалось активною міграцією остеогенних клітин-попередниць. Гематогенні клітини навколо гемокapілярів зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. При електронній мікроскопії поряд із фібробластами й остеобластами в численних острівцях десмального остеогенезу візуалізувались слабо орієнтовані гетероморфні пучки колагенових волокон. Остеоїд цих острівців містив значну частку аморфного компоненту низької електронної щільності, що за площею значно перевищувала вміст фіброзних структур. Глибока зона регенерату містила незначну кількість примітивних гемокapілярів в оточенні активних фібробластів. На відміну від контрольної групи, дана зона містила острівці десмального остеогенезу, осередки гіалінової тканини не виявлялись.

Протягом 2-3-го тижнів після імплантації колагенового конусу на тлі введення лінкоміцину запальні прояви у складі кісткової тканини та структурах пародонту поблизу зони дефекту ставали мінімальними, хоча частково зберігались ознаки дезорганізації кісткової тканини поблизу зони нанесеної травми, виявлялись резорбційні порожнини. До кінця 3-го тижня тканинна структура періосту відновлювалась не повною мірою. Гетероморфні остеоїдні спікули від травмованих кісткових трабекул материнської кістки заглиблювались у товщу імплантату між численними остеогенними острівцями. Вирости від трабекул материнської кістки містили повнокровні гемокapіляри в оточенні незначної кількості остеокластів. Остеобласти значно переважали серед інших сполучнотканинних клітин, у ряді випадків утворюючи дрібні скупчення на фронті органічного матриксу. При імуногістохімічному визначенні маркера проліферації Ki-67 значна експресія візуалізувалась в ядрах остеобластів. Ядра ендотеліальних клітин не виявляли проліферативного потенціалу. Розподіл маркера CD34 на демінералізованих зрізах свідчив про високий ступінь васкуляризації. При трансмісійній електронній мікроскопії остеоїд у даній локалізації містив незначну кількість хаотично розташованих пучків колагенових волокон навколо остеобластів.

Периферичні і внутрішні ділянки регенерату були насичені дрібними острівцями перетинчастого остеогенезу, їх щільність значно перевищувала таку в контрольній групі тварин. Остеогенні острівці значно варіювали за формою, часто ана-

стомозували між собою з утворенням трабекул, а також об'єднувались з відновленими трабекулами материнської губчастої кістки. Осередки десмального остеогенезу демонстрували високий ступінь васкуляризації. Остеобласти розташовувались поодинокі або утворювали групи. Міжтрабекулярні простори були неширокими, варіювали за формою, містили помірну кількість фіброblastів і велику кількість малодиференційованих остеогенних клітин. При електронній мікроскопії новоутворених трабекул у складі остеїду визначались гетероморфні колагенові волокна та їх пучки з невпорядкованою орієнтацією. За площею переважав аморфний матрикс помірної електронної щільності (рис. 4). Ультраструктура остеобlastів на межі з материнською кісткою та всередині остеорегенерату вказувала на високу синтетичну і секреторну активність. По всьому об'єму імплантату визначалось інтенсивне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 в ядрах остеобlastів і їх клітин-попередниць. Остеокласти та інші гематогенні клітини зустрічались у незначній кількості, Calcitonin-SP17-позитивні структури не виявлялись. Значна експресія маркера CD34 ендотеліальних клітин визначалась як на периферії, так і у внутрішніх зонах регенерату.

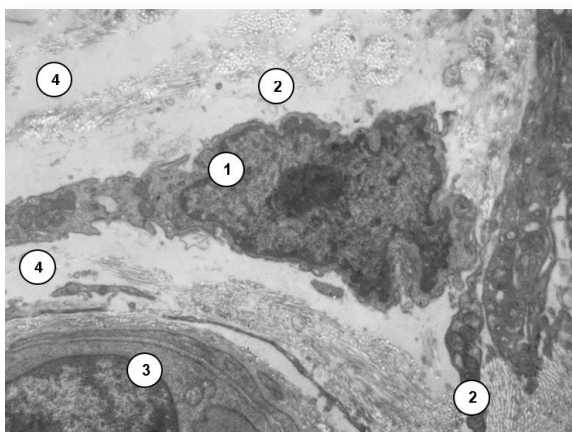


Рис. 4. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 2 тижні після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Кол-К-Лінкоміцин. 1 – малодиференційована остеогенна клітина; 2 – пучки колагенових волокон; 3 – ендотеліоцит гемокапіляра; 4 – аморфний матрикс остеїду. $\times 2500$.

У глибокій зоні регенерату, на відміну від контрольної групи, спостерігались численні незрілі мікросудини і капілярні паростки, що вказувало на активний неоваскулогенез. Ендотеліальні ядра інтенсивно експресували імуногістохімічну мітку проліферативного маркера Ki-67. Частина новоутворених гемокапілярів мала ознаки структурно-функціональної зрілості, заповнений форменими елементами крові просвіт. Навколо них концентрувались дрібні острівці перетинчастого остеогенезу. Осередки хрящового

матриксу не виявлялись. Крім відокремлених остеогенних острівців спостерігались тонкі грубоволокнисті кісткові трабекули. При трансмісійній електронній мікроскопії ознаки ремоделювання були відсутні. Глибока зона регенерату містила значні за площею осередки фіброзування, хоча клітини фіброblastичного диферону виявляли обмежену секреторну активність.

Протягом 4-5-го тижнів після імплантації натурального колагену з введенням лінкоміцину в периферичних і внутрішніх ділянках регенерату спостерігалась велика кількість тонких грубоволокнистих трабекул, які за рахунок анастомозування між собою та з відновленими трабекулами материнської кістки утворювали суцільну губчасту структуру остеорегенерату. Материнська кісткова тканина не містила ознак посттравматичної дезорганізації, проте відновлені остеони значно варіювали за своєю мікроархітектурою. Остеокласти навколо гемокапілярів новоутворених трабекул на межі з відновленими структурами материнської кістки мали вигляд активованих клітин, що підтверджувалось при імуногістохімічному дослідженні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл і свідчило про ініціацію ремоделювання ретикулофіброзної тканини з формуванням примітивних кісткових пластинок. Ультраструктура переважної більшості остеокитів вказувала на їх морфологічну незрілість. У внутрішніх ділянках регенерату окремі трабекули містили ознаки обмеженого за активністю ремоделювання. При трансмісійній електронній мікроскопії примітивні кісткові пластинки містили щільно упаковані колагенові волокна, які утворювали слабо орієнтовані та упорядковані пучки. У трабекулах глибокої зони регенерату кількісно переважали остеобласти з ультраструктурними ознаками значної синтетичної активності. Остеїд поблизу остеобlastів містив численні колагенові волокна з варіативною орієнтацією їх пучків. На відміну від контрольної групи, ядра остеобlastів і їх клітин-попередниць не виявляли здатності до значної експресії маркера Ki-67, що свідчило про обмеження проліферативної активності остеогенного диферону в даній локалізації. Глибока зона регенерату не містила остеогенних острівців. При імуногістохімічному дослідженні експресії маркера Ki-67 сполучнотканинні клітини не виявляли високої проліферативної активності. У значних за площею осередках щільної сполучної тканини фіброцити і фіброblastи виявляли помірну секреторну активність. Фібротичні осередки розташовувались між волокнами імплантованого екзогенного колагену, які мали ознаки часткової біорезорбції (рис. 5).

Через 8 тижнів після імплантації натурального колагену із застосуванням лінкоміцину спостерігались ознаки повільного відновлення клітинних і волокнистих компонентів періосту в

зоні ушкодження та формування остеоцитарної лакуно-каналцевої системи у складі материнської кістки навколо експериментального дефекту. Гістоархітектура і розподіл клітинних субпопуляцій, імуногістохімічні й ультраструктурні характеристики материнської кісткової тканини навколо експериментального дефекту у даний термін не відрзнялись від групи інтактних тварин.

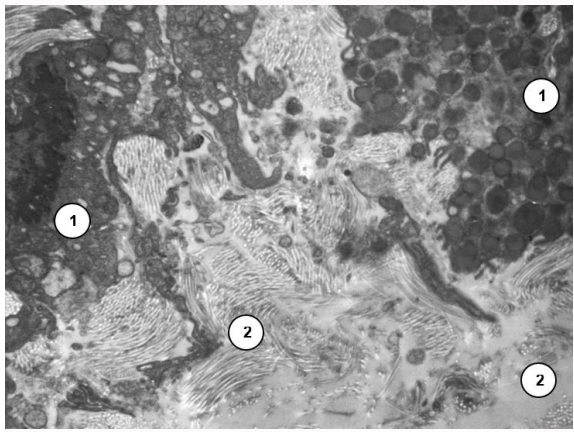


Рис. 5. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 5 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Кол-К-Лінкоміцин. 1 – макрофаг; 2 – екзогенні колагенові волокна імплантату в процесі біорезорбції. $\times 5000$.

Новоутворені грубоволокнисті трабекули кісткового регенерату містили розгалужену сітку мікросудин та мали різноманітний тканинний склад: чисельні осередки неупорядкованих фіброзних пучків межували зі скупченнями примітивних кісткових пластинок. У складі примітивних остеонів поблизу резорбційних лакун спостерігались численні остеокласти з ультраструктурними ознаками активації, помірним накопиченням імуногістохімічної Calcitonin-SP17-мітки. Між гетероморфними кістковими пластинками на периферії й у внутрішніх ділянках губчастої структури трабекул регенерату спостерігались переважно незрілі остецити без відростків зі збереженими цитоплазматичними елементами комплексу Гольджі та гранулярної ендоплазматичної сітки поблизу ядра. Поблизу відновленого періосту спостерігались ознаки компактизації остеорегенерату. Чисельно по всьому об'єму остеорегенерату переважали активні остеобласти в оточенні пучків щільно упакованих паралельних колагенових волокон. У порівнянні з попереднім терміном значно зменшувалась частка осередків слабо орієнтованих фібрил.

У глибокій зоні регенерату губчаста структура новоутворених трабекул мала ознаки активного ремоделювання. Водночас трабекули ставали більш масивними, ніж на попередньому терміні, міжтрабекулярні простори звужувались. Серед остеогенних клітин переважали остеобла-

сти, розташовані дифузно. При ультраструктурному дослідженні візуалізувались численні хаотично розташовані пучки колагенових волокон поблизу тих остеобластів, які мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності. Імуногістохімічне визначення експресії маркера Ki-67 виявило обмежену проліферативну активність остеобластів. У локусах ремоделювання візуалізувались активні остеокласти з низькою Calcitonin-SP17-реактивністю поблизу осередків грубоволокнистої кісткової тканини. На відміну від групи контролю, після остеопластики з використанням матеріалу Кол-К-Лінкоміцин у нешироких міжтрабекулярних просторах сполучнотканинні ділянки навколо мікросудин зберігались у вигляді щільних прошарків хаотично скупчених колагенових волокон. Фіброцити і фібробласти з помірною секреторною активністю утворювали значні осередки щільної неоформленої сполучної тканини між волокнами імплантованого екзогенного колагену.

Через 12 тижнів після імплантації матеріалу Кол-К з одночасним введенням лінкоміцину досягалось повне відновлення тканинної будови періосту в зоні ушкодження. У зоні зовнішньої кісткової пластинки спостерігалась компактизація новоутворених кісткових пластинок поблизу періосту. За гістоархітектурними ознаками остеоцитарна лакуно-каналцева система компактної кістки регенерату не відрізнялась від будови материнської кістки. Осередки незавершеного остеогенезу або неповного ремоделювання не виявлялись. Периферичні ділянки регенерату містили кісткові трабекули з гладкою поверхнею без ознак новоутворення остеїду, в яких візуалізувалася розвинена мікросудинна сітка. Кількість остеогенних клітин була значно меншою, ніж на попередньому терміні експерименту. При імуногістохімічному дослідженні ядра остеобластів, фібробластів і ендотеліальних клітин демонстрували низьку експресію проліферативного маркера Ki-67. Обмежена кількість остеокластів і остеобластів поряд із численними остеocyтами вказувала на завершений характер ремоделювання периферичних і внутрішніх кісткових трабекул по всьому об'єму остеорегенерату. При електронномікроскопічному дослідженні пучки колагенових волокон у багатьох ділянках мали переважно паралельну взаємну орієнтацію. Між сусідніми кістковими пластинками прошарки аморфного матеріалу низької електронної щільності у більшості випадків мали рівномірну товщину, що свідчило про завершення мінералізації кісткового матриксу. На відміну від контрольної групи, після імплантації колагену не спостерігалось утворення мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах як на периферії репаративного регенерату, так і в його глибокій зоні. Інтеграція поверхні кісткового регенерату з материнською кісткою була більш повноцінною, ніж на

попередньому терміні експерименту: на світлооптичному рівні демаркація в деяких ділянках компактної кістки зберігалась у вигляді варіативної за товщиною смужки слабо структурованого матеріалу, в той час як губчаста материнська кістка була повністю інтегрована з новоутвореними трабекулами остеорегенерату.

Глибока зона регенерату містила трабекули, які складались з варіативних за формою та розмірами сформованих кісткових пластинок. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії в них візуалізувались щільно упаковані паралельні фібрили з незначною часткою аморфного матеріалу новоутвореного остеоїду. Більшість остеокитів між кістковими пластинками мали помірно розвинуті відростки і компактну цитоплазму. Остеобласти розташовувались поодинокі, їх ультраструктура вказувала на обмеження синтетичної та секреторної активності (рис. 6).

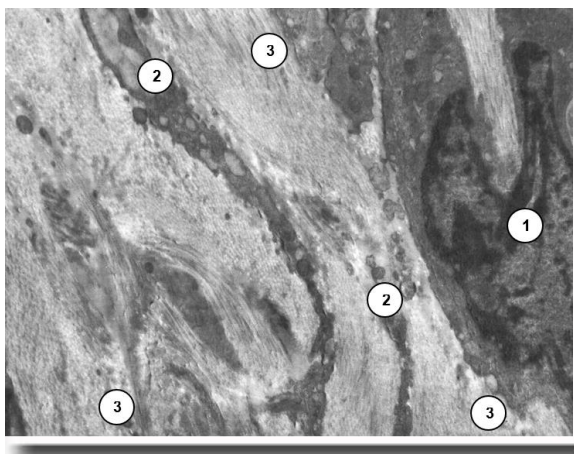


Рис. 6. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом Кол-К-Лінкоміцин. 1 – остеобласт; 2 – відросток остеокита; 3 – пучки колагенових волокон. $\times 4000$.

Глибока зона регенерату містила поодинокі дрібні залишки грубоволокнистої кісткової тканини, до яких наближались активні остеокласти. При імуногістохімічному вивченні розподілу Calcitonin-SP17-позитивних остеокластів виявлялась помірна активність резорбції. Визначення експресії маркера Ki-67 показало низький ступінь проліферативного потенціалу фібробластів і остеобластів, а також їх попередників. Між кістковими трабекулами спостерігались значні вогнища фіброзування, які містили поодинокі фібробласти та помірну щільність CD34-позитивних ендотеліальних елементів. За своєю загальною площею ділянки фіброзу помітно перевищували контрольний рівень.

Висновки

1. При аугментації експериментального дефекту із застосуванням натурального колагену відбувається інтенсивна стимуляція неоваскулогенезу та утворення численних острівців десма-

льного остеогенезу не лише на периферії, а й у внутрішніх ділянках регенерату, проте відновлення періосту на поверхні імплантованого матеріалу здійснюється стриманими темпами протягом перших трьох тижнів експерименту. В цей період на тлі збереженої запальної інфільтрації остеокондуктивний ефект колагенового імплантату реалізується через утворення розвиненої губчастої структури грубоволокнистих трабекул за рахунок активної міграції остеопрогеніторних клітин, високої мітотичної і синтетичної активності згрупованих остеобластів, хоча ступінь їх дозрівання залишається обмеженим. Внаслідок переважання проліферативної динаміки (за даними вивчення експресії маркерів Ki-67 і CD34) над швидкістю дозрівання остеогенних клітин через 5 тижнів після імплантації кістковий регенерат являє собою щільну сітку грубоволокнистих трабекул з поодинокими локусами ремоделювання без з ознак компактизації.

2. Через 8 тижнів по всьому об'єму репаративного регенерату відбувається активне ремоделювання трабекул з утворенням примітивних кісткових пластинок, які за рахунок прискореного фіброгенезу та обмеженого дозрівання остеокитів містять численні ультраструктурні ознаки неупорядкованого упакування гетероморфних колагенових волокон і їх пучків у складі кісткового матриксу. Наприкінці експерименту імплантація натурального колагену забезпечує повне відновлення періосту, часткову інтеграцію з материнською кісткою та завершення ремоделювання новоутворених трабекул, проте варіативні за геометрією кісткові пластинки, новоутворені остеони та остеокитарна лакуно-каналъцева система остеорегенерату суттєво відрізняються від інтактної структури.

3. Імплантація натурального колагену із застосуванням лінкоміцину зумовлює ефективну редукцію альтеративних і запальних змін у зоні експериментального дефекту, проте не впливає на темпи відновлення періосту. У перші три тижні після імплантації остеокондуктивний потенціал екзогенного колагену проявляється прискореною васкуляризацією периферичних і глибоких зон регенерату, посиленою міграцією та проліферацією малодиференційованих попередників фібробластів і остеобластів, суттєвим збільшенням кількості і щільності осередків перетинчастого остеогенезу. Впродовж 4-го і 5-го тижнів щільна губчаста гістоархітектура остеорегенерату по всьому об'єму експериментального дефекту, яка побудована з новоутворених грубоволокнистих трабекул і численних дрібних фібротичних ділянок, містить остеобласти з високою секреторною активністю та поодинокі остеокити з незрілою ультраструктурою. Процеси ремоделювання з утворенням примітивних кісткових пластинок ініціюються на периферії остеорегенерату з боку мінералізованих віднов-

лених трабекул материнської губчастої кістки, які виступають тригером дозрівання остеогенних клітин.

4. У період від 8-го до 12-го тижня після імплантації натурального колагену на тлі активації остеокластів ремоделювання трабекул здійснюється синхронно по всьому об'єму остеорегенерату, що супроводжується посиленням синтезу колагену у складі кісткових пластинок і, навпаки, його редукцією у міжтрабекулярних просторах. Поступова компактизація та мінералізація пластинчастої кісткової тканини призводить до формування примітивної лакуно-каналцевої системи, забезпечує значну, але не повну остеointegraцію регенерату, супроводжується обмеженням проліферативної активності диферонів фібробластів і остеобластів, дозріванням більшості остеокитів і стабілізацією загальної гістоархі-

тектури остеорегенерату.

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 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, R. S., Yang, Y. P., Gurtner, G. C., Maloney, W. J., & Lowenberg, D. W. 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. Buss DJ, Kröger R, McKee MD, Reznikov N. Hierarchical organization of bone in three dimensions: A twist of twists. *J Struct Biol*. 2021;6:100057. doi:10.1016/j.jysbx.2021.100057.

4. Li Y, Liu Y, Li R, Bai H, Zhu Z, Zhu L, et al. Collagen-based biomaterials for bone tissue engineering. *Mater. Des*. 2021;210:110049. doi:10.1016/j.matdes.2021.110049.

5. Tabrizi R, Khorshidi H, Shahidi S, Gholami M, Kalbasi S, Khayati A. Use of lincomycin-impregnated demineralized freeze-dried bone allograft in the periodontal defect after third molar surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(5):850-857. doi:10.1016/j.joms.2013.11.028

6. 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>

7. 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

8. 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>

9. 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>

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

11. 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

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

13. Glauret 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>

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

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

16. 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. Ремодельовання кістки нижньої щелепи після трансплантації натурального колагену: гістологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні аспекти.

РЕФЕРАТ. У статті представлені результати дослідження гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації натурального колагену 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 натуральним колагеном. **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. 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 склали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали натуральним колагеном Collacone («Botiss dental», Germany) (Кол-К). Другу групу склали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали натуральним колагеном з одночасним дом'язовим введенням лінкоміцину у дозі 12 мг/кг маси тварини 1 раз на добу впродовж 6 діб (Кол-К-Лінкоміцин). 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.** При аугментації експериментального дефекту із застосуванням натурального колагену відбувається інтенсивна стимуляція неоваскулогенезу та утворення численних острівців десмального остеогенезу не лише на периферії, а й у внутрішніх ділянках регенерату, проте відновлення періосту на поверхні імплантованого матеріалу здійснюється стриманими темпами протягом перших трьох тижнів експерименту. В цей період на тлі збереженої запальної інфільтрації остеокондуктивний ефект колагенового імплантату реалізується через утворення розвиненої губчастої структури грубоволокнистих трабекул за рахунок активної міграції остеопрогеніторних клітин, високої мітотичної і синтетичної активності згрупованих остеобластів, хоча ступінь їх дозрівання залишається обмеженим. Внаслідок переважання проліферативної динаміки (за даними вивчення експресії маркерів Ki-67 і CD34) над швидкістю дозрівання остеогенних клітин через 5 тижнів після імплантації кістковий регенерат являє собою щільну сітку грубоволокнистих трабекул з поодинокими локусами ремодельовання без з ознак компактизації. Через 8 тижнів по всьому об'єму репаративного регенерату відбувається активне ремодельовання трабекул з утворенням примітивних кісткових пластинок, які за рахунок прискороного фіброгенезу та обмеженого дозрівання остеокитів містять численні ультраструктурні ознаки невідповідного упакуння гетероморфних колагенових волокон і їх пучків у складі кісткового матриксу. Наприкінці експерименту імплантація натурального колагену забезпечує повне відновлення періосту, часткову інтеграцію з материнською кісткою та завершення ремодельовання новоутворених трабекул, проте варіативні за геометрією кісткові пластинки, новоутворені остеони та остеокитарна лакуно-каналцева система остеорегенерату суттєво відрізняються від інтактної структури. Імплантація натурального колагену із застосуванням лінкоміцину зумовлює ефективну редукцію альтеративних і запальних змін у зоні експериментального дефекту, проте не впливає на темпи відновлення періосту. У перші три тижні після імплантації остеокондуктивний потенціал екзогенного колагену проявляється прискороною васкуляризацією периферичних і глибоких зон регенерату, посиленою міграцією та проліферацією малодиференційованих попередників фібробластів і остеобластів, суттєвим збільшенням кількості і щільності осередків перетинчастого остеогенезу. Впродовж 4-го і 5-го тижнів щільна губчаста гістоархітектура остеорегенерату по всьому об'єму експериментального дефекту, яка побудована з новоутворених грубоволокнистих трабекул і численних дрібних фібротичних ділянок, містить остеобласти з високою секреторною активністю та поодинокі остеокити з незрілою ультраструктурою. Процеси ремодельовання з утворенням примітивних кісткових пластинок ініціюються на периферії остеорегенерату з боку мінералізованих відновлених трабекул материнської губчастої кістки, які виступають тригером дозрівання остеогенних клітин. У період від 8-го до 12-го тижня після імплантації натурального колагену на тлі активації остеокластів ремодельовання трабекул здійснюється синхронно по всьому об'єму остеорегенерату, що супроводжується посиленням синтезу колагену у складі кісткових пластинок і, навпаки, його редукцією у міжтрабекулярних просторах. Поступова компактизація та мінералізація пластинчастої кісткової тканини призводить до формування примітивної лакуно-каналцевої системи, забезпечує значну, але не повну остеointegraцію регенерату, супроводжується обмеженням проліферативної активності диферонів фібробластів і остеобластів, дозріванням більшості остеокитів і стабілізацією загальної гістоархітектури остеорегенерату.

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