

І.В. Челпанова

Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького
Львів, Україна

Надійшла: 21.10.2024

Прийнята: 17.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.101-113>

УДК: 616.714-089.843-073.7-018.1

РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКИ НИЖ- НЬОЇ ЩЕЛЕПИ ПІСЛЯ ТРАНСПЛАН- ТАЦІЇ β -ТРИКАЛЬЦІЙФОСФАТУ: ГІСТОЛОГІЧНІ, ІМУНОГІСТОХІМІЧ- НІ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ АСПЕКТИ

Chelpanova I.V.   Mandibular bone remodeling after β -tricalcium phosphate transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. This article presents the research results of the histological, immunohistochemical, and ultrastructural characteristics of bone-ceramic regenerate after β -tricalcium phosphate transplantation into an experimental defect in the rabbit mandible, since complete and high-quality regeneration of maxillofacial bones, its mechanisms and dynamics remain not fully understood, need clarification and detailing. **Aim.** To study in an experiment the dynamics of histological, immunohistochemical, and ultrastructural changes in the lower jaw bone after its traumatic injury with subsequent replacement of the defect with β -tricalcium phosphate. **Methods.** Experiments were conducted on 45 male rabbits aged 6-7 months, weighing 2.5-3.0 kg. 20 animals constituted the control group, and 20 the experimental group. Another 5 intact animals were used to study the normal structure of the bone tissue of the studied area of the mandible. The control group included animals with a bone tissue defect that healed under a blood clot. The experimental group consisted of rabbits where the bone defect was filled with β -tricalcium phosphate (β -TCP). 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.** Implantation of the β -TCP material doesn't affect the nature and dynamics of alterative changes in the native bone tissue of the mandibular alveolar part after trauma, but during the 2-3rd weeks of the experiment it causes a significant increase in the number and density of membranous osteogenesis foci on the periphery of the bone regenerate with their subsequent anastomosis and association with the bone trabeculae of the native cancellous bone. The realization of the osteoconductive potential of synthetic β -TCP granules occurs through the creation of conditions for active neovascularization, migration and cytodifferentiation of osteogenic cells, and these processes spread in a wave-like manner from the periphery to the deep zone of the regenerate. The osteoblasts ultrastructure, near the border with the native bone, indicates a limitation of their synthetic activity, while osteoblasts in the thickness of the ceramic-bone regenerate intensively synthesize amorphous and fibrous osteoid components. In the deep zone of the implant, the appearance of functioning microvessels prevents the formation of cartilage matrix foci and limits the degree of fibrosis, which is accompanied by the formation of islands of desmal osteogenesis. In 5 weeks after implantation of synthetic β -TCP in the peripheral areas of the bone-ceramic regenerate, intensive remodeling of the woven matrix into primitive bone plates occurs. Moreover, the restored osteons of the native bone adjacent to the implantation zone, as well as the structures of the restored periosteum, stimulate the appearance of mature osteocytes in the newly formed trabeculae of the regenerate. Implantation of synthetic calcium phosphate material significantly accelerates the spread of the bone remodeling wave from the periphery to the depths of the regenerate from 4 to 12 weeks of the experiment, but doesn't ensure complete osseointegration of the implant at the cellular level and restoration of the quality of fibrillogenesis at the ultrastructural level, also doesn't prevent partial fibrosis of the deep zone of the regenerate and doesn't ensure complete restoration of the osteocyte lacunae-canal system.

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

Citation:

Chelpanova IV. [Mandibular bone remodeling after β -tricalcium phosphate transplantation: histological, immunohistochemical and ultrastructural aspects]. Morphologia. 2024;18(4):101-13. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.101-113>

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

 ilona.med75@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Дослідження динамічних змін у кістковій тканині після створення експериментального дефекту та його заповнення остеопластичними матеріалами є актуальним напрямком стоматології та пластичної реконструктивної медицини. Незважаючи на вже відомі дані про використання таких матеріалів у клінічній практиці, механізми та темпи повної регенерації кісток щелепно-лицевої ділянки залишаються недостатньо вивченими та потребують уточнення і розширення. Кілька мільйонів пацієнтів потребують кісткової пластики щорічно [1]. З огляду на здатність кісткової тканини до природної регенерації об'ємні посттравматичні дефекти вимагають особливої уваги та підходів у лікуванні. Інфіковані дефекти суттєво уповільнюють регенерацію та спричиняють низку ускладнень, що значно погіршують повне відновлення [2]. Класичними прикладами застосування остеопластики є заповнення кісткових дефектів спричинених травмами [3-4], для синус-ліфтингу та встановлення зубних імплантатів або заповнення кісткових дефектів після остеотомії [5-8].

Синтетичні замінники кістки, зокрема біоактивна кераміка, набувають популярності завдяки своїй здатності стимулювати проліферацію, диференціювання та регенерацію клітин кісткової тканини. Серед них β -трикальційфосфат (β -ТКФ) є широко використовуваним та ефективним синтетичним замінником для кісткової трансплантації. Він має остеокондуктивні та остеоіндуктивні властивості, швидко розкладається в організмі, а його структуру згодом замінює природна кісткова тканина. Ці властивості роблять β -ТКФ одним із найпотужніших замінників кісткового трансплантата [9]. Проте, результати активного використання β -трикальційфосфату в клінічній практиці не завжди відповідають очікуванням [10]. Дослідження гістологічних перебудов кісткового регенерату після застосування різних остеотропних матеріалів було проведено низкою дослідників за допомогою класичного світлооптичного аналізу [11]. Також, значну увагу морфологів привернули дослідження, що стосуються клітинних та внутрішньоклітинних змін після застосування різних матеріалів з метою оптимізації регенераційних процесів у ділянці експериментального кісткового дефекту [12]. В останні роки великого значення набули дослідження щодо визначення імуногістохімічних характеристик клітинного, волокнистого та мікроциркуляторного компонентів під час регенераторних перетворень кісткової тканини та при її взаємодії з остеотропними матеріалами [13].

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

Матеріали та методи

Дослідження було проведено на 45 статевозрілих кроликах-самцях віком 6-7 місяців, вагою 2,5-3 кг. Тварини були розділені на контрольну та експериментальну групу (по 20 тварин кожна). Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. Тваринам контрольної та експериментальної груп під загальним наркозом, шляхом 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 4x3 мм.

До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини, який загоювався під кров'яним згустком. Експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали остеотропним матеріалом Synthetic β -tricalcium phosphate CerasorbM B-TCP (Inc. in North Carolina, USA) (β -TCF). 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 [14, 15].

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 на протязі 30 хвилин. Використовували систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision). Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (DAB) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення. Далі додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини з наступною дегідратацією та закріпленням бальзамом за стандартною процедурою [16, 17].

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 [18]. 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 [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 дослідження демінералізованих фрагментів коміркової частини нижньої щелепи через одну добу після утворення трепанаційного отвору дозволило візуалізувати різноманітні ознаки альтеративних процесів у прилеглих до експериментального дефекту ділянках кісткової тканини, а також виявити характерні реактивні зміни у складі ясен і пародонта. Зокрема, навколо дефекту визначались численні дрібні осередки крововиливів та тромбоутворення внаслідок руйнування стінок мікросудин. Значний периваскулярний та інтерстиційний набряк істотно пошкоджував загальну гістоархітектуру періосту і м'яких тканин ясен. Помірна лейкоцитарна інфільтрація спостерігалась лише в окремих невеликих ділянках. У кістковій тканині по краях шахти визначались численні дрібні скупчення фібринових мас і осередки гемосидерозу. У просвітах гемокапілярів компактної кортикальної пластинки часто визначались явища стазу та складування еритроцитів. Запальні зміни окістя у вигляді тонкої простої періостальної реакції були виражені в помірному ступені.

У материнській компактній кістці навколо дефекту в контрольній групі спостерігались дезорганізація та гомогенізація пластинок остеонів з

появою численних резорбційних лакун. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії виявлялись морфологічні ознаки активації поодиноких остеокластів, що підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням парафінових зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами, а також прояви інтрацелюлярного набряку остеокитів, інтерстиційного набряку та деструкції колагенових волокон з гомогенізацією кісткового матриксу.

Через одну добу експерименту порожнина експериментального дефекту була заповнена кров'яним згустком. З боку періосту навколо дефекту не виявлялося будь-яких ознак неоваскулогенезу, фіброзування або проліферації фібробластів. Поблизу ендосту ушкоджених кісткових трабекул у поверхневих ділянках згустку спостерігались примітивні гемокапіляри та ендотеліальні тяжі в супроводі фібробластів, що свідчило про утворення грануляційної тканини на периферії експериментального дефекту.

Через один тиждень після нанесення експериментальної травми прояви набряку та інші ознаки травматичного запалення навколо зони дефекту були редуковані. Ступінь дезорганізації материнської пластинчастої кістки поглиблювався у порівнянні з попереднім терміном спостереження, посилювалась гомогенізація кісткового матриксу та зростала площа резорбційних порожнин, заповнених тканинним детритом і фібринодними масами, зберігались депозити гемосидерину. Поверхня травмованих остеонів і кісткових трабекул по краях дефекту виглядала горбистою внаслідок утворення гетероморфних остеоїдних виростів. У складі таких виростів поряд із поодинокими остеокластами навколо окремих повнокровних гемокапілярів спостерігалась значна кількість остеобластів, які не утворювали суцільного фронту та не контактували між собою. При імуногістохімічному вивченні розподілу експресії Ki-67 ядра переважної більшості остеобластів містили мітку даного маркера, що вказувало на їх істотний проліферативний потенціал. На електронограмах навколо остеобластів спостерігалась відносно невелика кількість помірно впорядкованих пучків колагенових волокон, занурених у розвинутий органічний матрикс.

Наприкінці першого тижня експерименту в периферичних ділянках регенерату, що формувалась після утворення кров'яного згустку, спостерігались численні осередки перетинчастого остеогенезу зі щільним вмістом новоутворених примітивних гемокапілярів і гетероморфних клітин – фібробластів, остеобластів та їх попередників, прогеніторних недиференційованих клітин. При імуногістохімічному дослідженні активне накопичення мітки маркера Ki-67 в ядрах означених клітин свідчило про їхню активну проліферацію на периферії регенерату, а висока щільність CD34-позитивних структур вказувала на значну

активність процесів неоваскулогенезу в даній локалізації. Гематогенні клітини навколо гемокапілярів на периферії регенерату зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. На електронограмах навколо фібробластів і остеобластів в остеогенних острівцях розташовувались невпорядковані колагенові волокна з ознаками незрілості, які не утворювали організованих пучків. Остеоїд в осередках перетинчастого остеогенезу був збагачений на аморфний компонент. У глибоких ділянках посттравматичного детриту, що заповнював експериментальну шахту, клітини фібробластного ряду розташовувались дифузно поодинокі на значній відстані одна від одної; механоцити інших гістогенетичних рядів не виявлялись; мікросудини зустрічались вкрай рідко.

Протягом 2-го і 3-го тижнів після експериментальної травми в контрольній групі тварин запальні прояви у складі кісткової тканини та структурах пародонту поблизу зони дефекту поступово редукувались. Спостерігались морфологічні ознаки дезорганізації материнської кістки та гомогенізації кісткового матриксу навколо зони травми. Зберігались резорбційні порожнини з вмістом тканинного детриту, фібрину або гемосидерину. По краях ушкодженої материнської кістки на поверхні травмованих остеонів і кісткових трабекул спостерігались численні гетероморфні вирости остеїдної структури, які занурювались у репаративний регенерат між остеогенними острівцями. У складі виростів від трабекул материнської кістки спостерігались повнокровні гемокапіляри в оточенні незначної кількості остеокластів. Переважна більшість остеокластів була представлена компактними овальними формами з розмірами до 70 мкм. Остеобласти за чисельністю значно переважали над іншими клітинами і розташовувались поодинокі в товщі органічного матриксу остеїдних виростів від спікул і трабекул материнської кістки.

При визначенні експресії маркера проліферації Ki-67 переважна кількість імуногістохімічної мітки накопичувалась в ядрах остеобластів, у той час як ядра остеокластів, ендотеліоцитів і остеоцитів материнської кістки Ki-67 не експресували. Вивчення Calcitonin-SP17-клональних антитіл показало відсутність суттєвої резорбційної активності остеокластів. Застосування маркера CD34 виявило низький ступінь васкуляризації. На електронограмах остеїд у даній локалізації містив незначну кількість слабко орієнтованих пучків колагенових волокон навколо остеобластів з розвинутою зернистою ендоплазматичною сіткою та комплексом Гольджі.

Протягом 2-3-го тижнів у тварин контрольної групи на периферії кісткового регенерату осередки перетинчастого остеогенезу анастомозували з утворенням трабекул. В їх складі візуалізувались численні гемокапіляри в оточенні остеоб-

ластів, наближених один до одного і розташованих групами. У міжтрабекулярних просторах зосереджувались фібробласти у невеликій кількості та численні остеопрогеніторні клітини. Інтенсивне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 спостерігалось переважно в ядрах клітин-попередниць остеобластів; маркера CD34 – у мембранах і цитоплазмі ендотеліальних клітин на периферії регенерату. Остеокласти та інші гематогенні клітини зустрічались у незначній кількості. Calcitonin-SP17-позитивні клітинні елементи не виявлялися. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії у складі остеїду примітивних трабекул визначались різні за ступенем зрілості колагенові волокна та їх пучки з невпорядкованою орієнтацією. Волокнистий компонент у міжтрабекулярних просторах навколо фібробластів поступався за площею аморфному компоненту. У внутрішніх ділянках регенерату, який заповнював порожнину експериментального дефекту, спостерігався дуже низький ступінь васкуляризації. Поряд із помірними ознаками фіброзування визначались невеликі скупчення відокремлених хондробластів з утворенням осередків хрящового матриксу, який не містив мікросудин і волокон.

Через 4 і 5 тижнів після нанесення експериментальної травми у тварин контрольної групи будь-які запальні прояви у складі кісткової тканини та в структурах пародонту були відсутні. По краях дефекту новоутворені з боку материнської кістки трабекули орієнтувались переважно радіально відносно регенерату. Окремі трабекули і спікули занурювались в товщу регенерату та анастомозували з грубоволокнистою кістковою тканиною острівців десмального остеогенезу. Навколо повнокровних гемокапілярів, що відгалужувались від мікросудинного русла періосту, у ділянках компактної материнської кістки, які мали морфологічні ознаки посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу, спостерігалась поява активних остеокластів, що підтверджувалось при імуногістохімічному вивченні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл.

Резорбційні порожнини з вмістом тканинного детриту, фібрину або гемосидерину зустрічались рідко, проте поява лакун Гаушипа свідчила про початок відновлення ушкоджених внаслідок травми остеонів материнської кістки. Остеобласти за чисельністю переважали над іншими клітинами та розташовувались поодинокі або групами в товщі органічного матриксу трабекул поблизу ендосту материнської губчастої кістки, що поєднувалось з їх активним вrostанням всередину регенерату. Розподіл імуногістохімічної мітки Ki-67 вказував на високу проліферативну активність остеобластів, на відміну від інших сполучнотканинних клітин. При електронномікроскопічному дослідженні в цитоплазмі остеобластів спостерігались добре розвинуті синтетичні і сек-

реторні структури, проте остеоїд у даній локалізації містив обмежену кількість сформованих колагенових волокон або їх пучків.

У тварин контрольної групи на периферії кісткового регенерату спостерігались численні трабекули, які анастомозували між собою з утворенням губчастої гістоархітектури. Основою новоутворених трабекул була грубоволокниста кісткова тканина з розвинутою сіткою гемокапілярів, групами гетероморфних остеобластів поряд із низькодиференційованими остеогенними клітинами (рис. 1). Поодинокі остеокласти розташовувались поблизу острівців десмального остеогенезу та межували з фіброblastами (рис. 2).



Рис. 1. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика контрольної групи через 4 тижні після травми. 1 – остеобласт; 2 – низькодиференційована остеогенна клітина; 3 – позаклітинний матрикс. $\times 4000$.

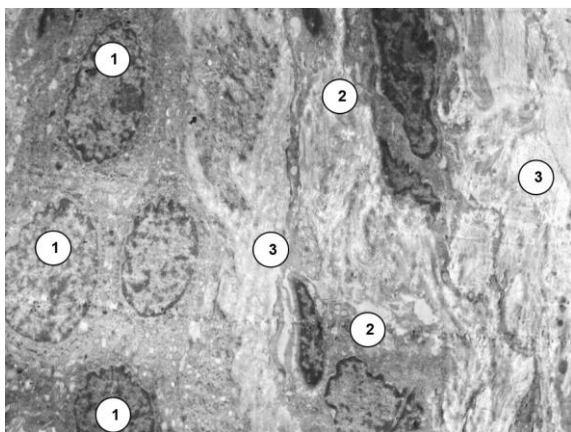


Рис. 2. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика контрольної групи через 4 тижні після травми. 1 – ядра остеокластів; 2 – фіброblast та його відростки; 3 – локус десмального остеогенезу. $\times 3000$.

Інтенсивна експресія маркера проліферації Ki-67 спостерігалась в ядрах остеобластів і їх клітин-попередниць у тих трабекулах, що формувалися за рахунок острівців десмального остеогенезу.

незу всередині регенерату, на відміну від поверхневих його ділянок. Розподіл маркера CD34 вказував на активне утворення гемокапілярного русла не лише на периферії регенерату, а й у глибоких зонах. Імуногістохімічне вивчення Calcitonin-SP17-реактивних елементів, поряд із появою резорбційних лакун, вказувало на початок ремоделювання ретикулофіброзної тканини кісткових трабекул, що спостерігалось через 5 тижнів експерименту в периферійних ділянках регенерату. На відміну від цього, у внутрішніх зонах регенерату на тлі обмеженої васкуляризації та фіброзування візуалізувались численні дрібні осередки хрящового остеогенезу, в яких були відсутні гемокапіляри та пучки колагенових волокон.

Наприкінці 5-го тижня у периферичних ділянках кісткового регенерату на електронограмах у складі остеоїду більшості новоутворених трабекул визначалися пучки щільно та хаотично упакованих колагенових волокон. В окремих випадках колагенові волокна утворювали паралельні комплекси з формуванням ламелярної конфігурації поблизу остеобластів, що свідчило про ініціацію ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки. На даному етапі експерименту спостерігалась поява первинних остеокитів з ознаками структурно-функціональної незрілості – зі значним об'ємом цитоплазми, недорозвинутими відростками, збереженим комплексом Гольджі та численними елементами гранулярної ендоплазматичної сітки. У широких просторах між новоутвореними трабекулами пухка сполучна тканина містила гемокапіляри переважно зі сформованими міжендотеліоцитарними контактами, мієлоїдна тканина не виявлялась.

На восьмому тижні посттравматичної регенерації в ділянках материнської кістки, прилеглих до зони дефекту, спостерігались ознаки відновлення ушкоджених остеонів. На світлооптичному рівні осередків дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу не виявлялось, загальна тканинна структура періосту частково відновлювалась, активні остеокласти поблизу резорбційних лакун межували з невеликими групами остеобластів, остеокити остеонів мали звичайну форму і контактували один з одним своїми відростками. Вивчення розподілу імуногістохімічної мітки Ki-67 показало незначну проліферативну активність остеобластів і ендотеліальних клітин, що вказувало на відносну стабілізацію компактно організації зовнішньої кісткової пластинки коміркових відростків. Також обмежена проліферативна активність клітин спостерігалась у складі відновлених трабекул губчастої материнської кістки, частина яких анастомозувала з новоутвореними кістковими трабекулами регенерату.

На периферії кісткового регенерату новоутворені трабекули містили розгалужену сітку гемокапілярів, навколо яких візуалізувались чис-

ленні активні остеокласти, остеобласти і поодинокі остецити. У даних периферичних трабекулах спостерігались ознаки активного ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини з утворенням пластинок примітивних гетероморфних остеонів, геометрія яких широко варіювала та відрізнялась від зрілих остеонів материнської кістки. У міжтрабекулярних просторах візуалізувались поодинокі ділянки мієлоїдної тканини. Поблизу періосту спостерігались ознаки активної компактизації кісткової тканини. Інтеграція поверхні репаративного регенерату з материнською кісткою була частковою, переважно на рівні переходу її зрілих трабекул у новоутворену губчасту кістку регенерату. На електронограмах пластинчаста кісткова тканина в даній локалізації містила пучки щільно упакованих паралельних колагенових волокон, які межували з осередками неупорядкованих фібрил і збагачених на аморфний матеріал низької електронної щільності. Остецити між кістковими пластинками мали ознаки обмеженої структурно-функціональної зрілості (рис. 3).

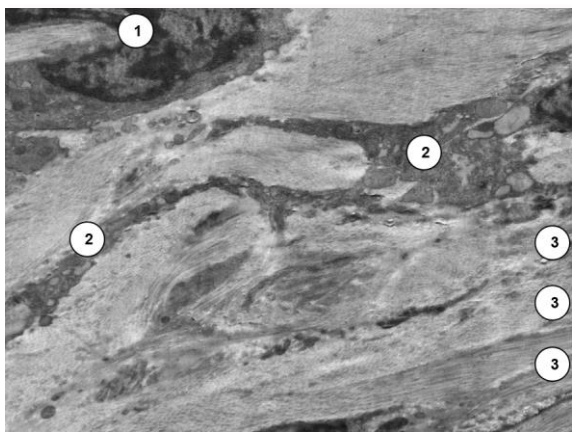


Рис. 3. Електронна трансмісійна мікрофотографія периферичної ділянки регенерату нижньої щелепи кролика контрольної групи через 8 тижнів після травми. 1 – ядра остеокластів; 2 – фібробласт та його відростки; 3 – локус десмального остеогенезу. $\times 4000$.

У більш глибоких ділянках регенерату розташовувались трабекули, які складались переважно з грубоволокнистої кісткової тканини та містили як осередки її ремоделювання, так і окремі залишки хрящового остеогістогенезу. Між такими трабекулами спостерігались скупчення фіброзної тканини з поодинокими фібробластами. На відміну від попереднього терміну експерименту, в глибоких ділянках регенерату відбувалось активне вrostання ендотеліальних тяжів, що підтверджувалося імуногістохімічним визначенням CD34-позитивних структур між гіаліновими остриями, позбавленими мікросудинного і волокнистого вмісту. Імуногістохімічне вивчення Calcitonin-SP17-реактивних елементів показало, що не дивлячись на значну васкуляризацію грубо-

волокнистих трабекул і присутність істотної кількості остеокластів, інтенсивність ремоделювання глибоких ділянок регенерату була обмеженою. Трансмісійна електронна мікроскопія показала високий вміст хаотично розташованих колагенових волокон та їх пучків поблизу остеобластів, які мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності.

Через 12 тижнів після експериментальної травми в контрольній групі тварин на світлооптичному рівні спостерігалось повне відновлення загальної тканинної структури періосту в зоні ушкодження та остеоцитарної лакуно-каналцевої системи у складі материнської кістки навколо експериментального дефекту. За гістоархітектурою та розподілом клітинних елементів, а також за досліджуваними імуногістохімічними і електронномікроскопічними характеристиками материнська кісткова тканина коміркової частини нижньої щелепи тварин контрольної групи не відрізнялась від групи інтактних тварин.

Кісткові трабекули в периферичних ділянках регенерату містили розвинену мікросудинну сітку та типові клітинні елементи, що складали основу пластинчастої кісткової тканини. Невелика кількість остеокластів і остеобластів поряд із численними зрілими остеоцитами свідчили про завершення процесів ремоделювання грубоволокнистої тканини в пластинчасту, проте за мікроархітектурою та формою остеони регенерату істотно відрізнялися від типової будови. Зокрема, при трансмісійній електронній мікроскопії мікрошаруватий композит колагенових фібрил сусідніх кісткових пластинок був роз'єднаний варіабельними за товщиною просторами аморфного матеріалу низької електронної щільності, що вказувало на незавершений або ушкоджений процес мінералізації кісткового матриксу остеонів. Крім того, упакування колагенових волокон у паралельні комплекси всередині остеонних пластинок було нерівномірним та розрізнялося між сусідніми остеонами компактної кістки регенерату.

Ділянки мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах візуалізувались лише на периферії репаративного регенерату. Інтеграція його поверхні з материнською кісткою була неповною, переважно за рахунок анастомозування між зрілими трабекулами материнської кістки і новоутвореною губчастою кісткою регенерату.

Через 12 тижнів експерименту глибокі ділянки регенерату містили трабекули з ознаками активного ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини з утворенням примітивних кісткових пластинок, геометрія яких широко варіювала та відрізнялась від зрілих остеонів материнської кістки. За допомогою електронної мікроскопії в пластинчастій кістковій тканині в даній локалізації візуалізувались різні за орієнтацією волокон пучки. Зокрема, щільно упаковані паралельні фібрили межували з осередками неупорядкованих

волокон, в яких зберігалась значна частка аморфного компонента новоутвореного остеїду. Остеоцити між кістковими пластинками в глибоких ділянках регенерату мали розвинену цитоплазму, майже не утворювали відростків, містили елементи комплексу Гольджі та гранулярного ретикулу.

У глибоких ділянках регенерату кісткові трабекули склалися з грубоволокнистої кісткової тканини або ділянок її ремоделювання. Острівці хрящового остеогістогенезу, на відміну від попереднього терміну експерименту, у таких трабекулах не виявлялись. Між гетероморфними за гістоархітектурою кістковими трабекулами спостерігались значні вогнища фіброзування, які містили поодинокі фібробласти та помірну кількість CD34-позитивних ендотеліальних елементів. Імуногістохімічне вивчення Calcitonin-SP17-реактивних остеокластів виявило значну активність резорбції грубоволокнистої тканини трабекул, причому розподіл маркера Ki-67 демонстрував обмеження проліферативного потенціалу ендотеліоцитів і остеобластів у даній локалізації.

Дослідження гістологічних препаратів демінералізованої нижньої щелепи через одну добу після утворення трепанційного отвору та імплантації матеріалу β-ТКФ виявило численні дрібні осередки крововиливів та тромбоутворення внаслідок руйнування стінок мікросудин. Були характерними прояви дезорганізації та гомогенізації пластинок остеонів материнської кістки з появою численних резорбційних лакун. Електронномікроскопічно виявлялись морфологічні ознаки активності поодиноких остеокластів, що підтверджувалось негативним імуногістохімічним забарвленням парафінових зрізів Calcitonin-SP17-клональними антитілами, а також прояви інтрацелюлярного набряку остеоцитів, інтерстиційного набряку та деструкції фібрил на тлі гомогенізації кісткового матриксу. З боку періосту навколо дефекту не виявлялись будь-які ознаки неоваскулогенезу, фіброзування або проліферації фібробластів. Визначення проліферативного маркера Ki-67 виявило обмежену кількість Ki-67-позитивних клітин у даній локалізації. Поблизу ендосту ушкоджених кісткових трабекул на межі з імплантованим матеріалом спостерігались примітивні гемокапіляри та ендотеліальні тяжі в супроводі фібробластів, що вказувало на формування 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 проявлялись у незначному ступені. Навпроти, ознаки дезорганізації материнської пластинчастої кістки посилювались у порівнянні з попереднім терміном спостереження. Як і в групі

контрольних тварин, спостерігалась гомогенізація кісткового матриксу та зростала площа резорбційних порожнин, заповнених детритом, фібрином або гемосидериновими депозитами. 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 відокремлених один від одного остеобластів, які при імуногістохімічному забарвленні із застосуванням маркера Ki-67 інтенсивно накопичували мітку проліферації.

Наприкінці першого тижня експерименту в периферичних ділянках регенерату між фрагментами імплантованого матеріалу β-ТКФ виявлялись численні осередки десмального остеогенезу зі щільним вмістом новоутворених примітивних гемокапілярів і гетероморфних клітин – фібробластів, остеобластів та їх низькодиференційованих попередників. Активне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 в ядрах означених клітин свідчило про їхню активну проліферацію на периферії регенерату. Значна щільність CD34-позитивних структур у вигляді примітивних гемокапілярів і ендотеліальних тяжів вказувала на активний неоваскулогенез в даній локалізації. Гематогенні клітини навколо гемокапілярів зустрічались рідко, остеокласти не виявлялись. На електронограмах навколо фібробластів і остеобластів в острівцях десмального остеогенезу розташовувались невпорядковані 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 матеріалу β-ТКФ зберігались ознаки дезорганізації материнської кістки та гомогенізації кісткового матриксу навколо зони травми, невеликі резорбційні порожнини з вмістом тканинного детриту, фібрину або гемосидерину. По краях ушкодженої материнської кістки на поверхні травмованих остеонів і кісткових трабекул спостерігались численні гетероморфні вирости остеїдної структури, які занурювались у репаративний регенерат між остеогенними острівцями. У складі виростів від трабекул материнської кістки спостерігались повнокровні гемокапіляри в оточенні незначної кількості остеокластів. Переважна більшість остеокластів була представлена компактними овальними формами з розмірами до 70 мкм. Остеобласти за чисельністю значно переважали над іншими клітинами і розташовувались поодинокі в товщі органічного матриксу остеїдних виростів від спікул і трабекул материнської кістки. При визначенні експресії маркера проліферації Ki-67 переважна кількість імуногістохімічної мітки накопичувалась в ядрах остеобластів, у той час як ядра

остеокластів, ендотеліоцитів і остеоцитів материнської кістки молекул Ki-67 не експресували. Вивчення Calcitonin-SP17-клональних антитіл показало відсутність суттєвої резорбційної активності остеокластів. Застосування маркера CD34 виявило низький ступінь васкуляризації. На електронограмах остеїд у даній локалізації містив незначну кількість слабо орієнтованих пучків колагенових волокон навколо остеобластів з розвинутою зернистою ендоплазматичною сіткою та комплексом Гольджі.

Протягом 2-3-го тижнів після імплантації синтетичного кальційфосфатного матеріалу на периферії кісткового регенерату осередки перетинчастого остеогенезу, на відміну від групи контролю, візуалізувались у значно більшій кількості. Остеогенні остівці анастомозували з утворенням трабекул, а також об'єднувались з горбистими кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. В їх складі візуалізувались численні гемокапіляри в оточенні остеобластів, які розташовувались поодинокі або утворювали групи. У міжтрабекулярних просторах зосереджувались фіброblastи у невеликій кількості та численні остеопрогеніторні клітини. За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії у складі остеїду новоутворених трабекул визначались гетероморфні колагенові волокна та їх пучки з невпорядкованою орієнтацією, які суттєво поступалися за площею аморфному матриксу. У міжтрабекулярних просторах навколо фіброblastів фіброзний компонент регенерату поступався за площею аморфному компоненту. Ультраструктура остеобластів, що розташовувались поблизу межі з материнською кісткою, свідчила про певне обмеження їх синтетичної активності. Навпаки, ті остеобласти, що були зануреними у товщу керамічно-кісткового регенерату, містили розвинений комплекс Гольджі та численні елементи гранулярної ендоплазматичної сітки. Інтенсивне накопичення імуногістохімічної мітки маркера Ki-67 спостерігалось переважно в ядрах клітин-попередниць остеобластів; маркера CD34 – у мембранах і цитоплазмі ендотеліальних клітин на периферії регенерату. Остеокласти та інші гематогенні клітини зустрічались у незначній кількості, Calcitonin-SP17-позитивні клітинні елементи не виявлялися.

У внутрішніх ділянках кістково-керамічного регенерату, який заповнював порожнину експериментального дефекту, на демінералізованих гістологічних препаратах спостерігались ознаки активного неоваскулогенезу, що на третьому тижні спостережень проявлялось утворенням численних примітивних не заповнених еритроцитами мікросудин і ендотеліальних тяжів. Помірна кількість новоутворених гемокапілярів мала заповнений еритроцитами просвіт. Навколо таких функціонально спроможних мікросудин візуалізувались поодинокі островці десмального остеогенезу.

На відміну від контрольної групи, в глибоких ділянках регенерату не виявлялись осередки хрящового матриксу, позбавленого мікросудин і волокон; осередки щільної неоформленої сполучної тканини були невеликими та зустрічались у незначній кількості.

Через 4 і 5 тижнів після імплантації матеріалу β-ТКФ по краях дефекту новоутворені з боку материнської кістки трабекули орієнтувались переважно радіально відносно регенерату. Окремі трабекули і спікули занурювались в товщу регенерату та анастомозували з грубоволокнистою кістковою тканиною новоутворених трабекул з формуванням спільного безперервного ендосту. У ділянках компактної материнської кістки, які зберігали залишкові ознаки посттравматичної дезорганізації та гомогенізації кісткового матриксу, навколо гемокапілярів спостерігалась поява активних остеокластів, що підтверджувалось при імуногістохімічному дослідженні розподілу Calcitonin-SP17-клональних антитіл. Наявність численних лакун Гаушипа свідчила про активне відновлення ушкоджених унаслідок травми остеонів материнської кістки. Остеобласти за чисельністю переважали над іншими клітинами та розташовувались ізольовано або групами в товщі органічного матриксу трабекул поблизу ендосту материнської губчастої кістки, що поєднувалось з їх активним вrostанням всередину регенерату. Розподіл імуногістохімічної мітки Ki-67 вказував на високу проліферативну активність остеобластів, на відміну від інших сполучнотканинних клітин даної локалізації. При електронномікроскопічному дослідженні в цитоплазмі остеобластів спостерігались добре розвинуті синтетичні і секреторні цитоплазматичні структури. На відміну від контрольної групи, остеїд у даній локалізації містив значну кількість сформованих колагенових волокон, об'єднаних у пучки, з їх суттєвим переважанням над аморфним матриксом (рис. 4).

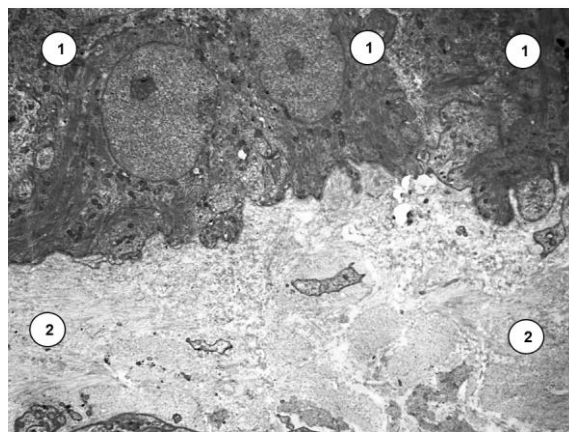


Рис. 4. Електронна трансмісійна мікрофотографія відновленої трабекули материнської кістки в ділянці заглиблення в регенерат нижньої щелепи кролика через 5 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом β-ТКФ. 1 – остеобласт; 2 – пучки колагенових волокон новоутвореного остеїду. ×3000.

На периферії кісткового регенерату спостерігались поліморфні грубоволокнисті кісткові трабекули з переважною радіальною орієнтацією, щільним анастомозуванням і поступовим переходом до губчастої архітектури при заглибленні в зону імплантації. В периферичних трабекулах кількісно переважали остеобласти. Помірна кількість остеоцитів значно перевищувала їх вміст при порівнянні з групою контролю. Остеокласти зустрічались переважно на межі кістково-керамічного регенерату з пластинчастою кістковою тканиною кортикальної пластинки материнської кістки, а також при переході відновлених трабекул материнської губчастої кістки в новоутворені грубоволокнисті трабекули регенерату. Поряд з тим фактом, що кількість остеокластів у даних ділянках була значно вищою, ніж у попередній термін експерименту і ніж у групі контрольних тварин, ультраструктурні ознаки активації остеокластів свідчили про початок ремоделювання периферичних ділянок грубоволокнистої кісткової тканини вже через 4 тижні після імплантації матеріалу β -ТКФ. На електроннограмах у складі більшості новоутворених трабекул визначалися щільно упаковані колагенові волокна з утворенням паралельних пучків і кісткових пластинок. Поряд із пластинками або між ними визначались гетероморфні великі за розмірами остеоцити з морфологічними ознаками обмеженої зрілості. Частина остеоцитів поблизу відновлених остеонів материнської кістки, навпаки, набувала характерних зрілих ознак, таких як зменшення маси цитоплазми, утворення відростків, редукція комплексу Гольджі та гранулярного ендоплазматичного ретикулу.

У внутрішніх зонах кістково-керамічного регенерату виявлялись ділянки грубоволокнистої кісткової тканини, які містили щільну сітку примітивних гемокапілярів. Значна кількість остеобластів утворювала численні скупчення між островами десмального остеогенезу та мікросудинами. На відміну від периферичних трабекул, в ядрах остеобластів і їх клітин-попередниць спостерігалась інтенсивна експресія маркера проліферації Ki-67. Розподіл маркера CD34 вказував на активне утворення гемокапілярного русла в глибокій зоні регенерату, що, ймовірно, запобігало значному фіброзуванню даної зони, як це було характерно для контрольної групи.

На восьмому тижні посттравматичної регенерації після імплантації матеріалу β -ТКФ спостерігалось повне відновлення загальної тканинної структури періосту в зоні ушкодження та формування остеоцитарної лакуно-каналцевої 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 β -ТКФ не відрзнялись від групи

інтактних тварин.

На периферії кісткового регенерату новоутворені трабекули склалися переважно з пластинчастої кісткової тканини та містили розгалужену сітку мікросудин. Поліморфні кісткові пластинки примітивних остеонів межували з остеокластами, частина яких була представлена активними формами поблизу резорбційних лакун. Інша частина остеокластів інтенсивно накопичувала Calcitonin-SP17-мітку, що вказувало на гальмування їх резорбтивної активності. Застосування остеопластики матеріалом β -ТКФ супроводжувалось появою зрілих остеоцитів на периферії трабекул регенерату, а також у ділянках компактизації кісткових пластинок поблизу відновленого періосту. У заглиблених трабекулах губчастої кістки регенерату на тлі активного ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини з утворенням кісткових пластинок остеоцити мали ознаки структурно-функціональної незрілості. Зокрема, 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.

Лакуно-каналцева система на периферії кістково-керамічного регенерату не виглядала сформованою. У міжтрабекулярних просторах новоутвореної губчастої кістки візуалізувались окремі ділянки мієлоїдної тканини. Інтеграція поверхні репаративного регенерату з материнською кісткою залишалась неповною.

У внутрішніх ділянках регенерату розташовувалась гетероморфна губчаста структура, яка складалася з примітивних кісткових пластинок, а також містила помітну кількість грубоволокнистої тканини. На відміну від групи контролю, після остеопластики з використанням β -ТКФ залишків хрящового остеогістогенезу не спостерігалось. Сполучнотканинні ділянки навколо мікросудин зустрічались рідко та мали вигляд тонких прошарків, збагачених на хаотично угруповані колагенові волокна. Серед остеогенних клітин переважали остеобласти, розташовані дифузно, в помірній кількості. Трансмісійна електронна мікроскопія показала високий вміст хаотично розташованих колагенових волокон та їх пучків поблизу остеобластів, які мали ознаки значної синтетичної і секреторної активності. На відміну від спостережень у контрольній групі, обмежена кількість активних остеокластів з низькою Calcitonin-SP17-реактивністю виявлялася лише у ділянках грубоволокнистої кісткової тканини незначної частини кісткових трабекул, що піддавалися ремоделюванню.

Через 12 тижнів після імплантації матеріалу β -ТКФ поряд із повним відновленням структури

періосту в зоні ушкодження відбувалось формування остеокитарної лакуно-каналцевої системи з ознаками типової будови у зоні зовнішньої кісткової пластинки. На відміну від групи контролю, після застосування остеотропного матеріалу осередки незавершеного остеогенезу або неповного ремоделювання не виявлялись, остеони регенерату за своєю структурою та геометрією не відрізнялись від будови інтактної материнської кістки.

Кісткові трабекули в периферичних ділянках регенерату 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 проліферативного маркера Ki-67, а також невелика кількість остеокластів і остеобластів поряд із численними зрілими остеокитами свідчили про завершення процесів ремоделювання периферичних трабекул регенерату. Проте, мікроархітектура та форма остеонів регенерату широко варіювали та помітно відрізнялись від типової будови інтактних остеонів. За допомогою електронної мікроскопії між пучками паралельних колагенових волокон сусідніх кісткових пластинок візуалізувались прошарки аморфного матеріалу низької електронної щільності, які варіювали за товщиною та опосередковано вказували на незавершений характер мінералізації кісткового матриксу.

Як і в контрольній групі, після застосування β -ТКФ спостерігалось утворення мієлоїдної тканини у міжтрабекулярних просторах на периферії репаративного регенерату, в той час як глибока зона регенерату осередків кровотворення не містила. Інтеграція поверхні кістково-керамічного регенерату з материнською кісткою була значно кращою, ніж у тварин групи контролю, проте на світлооптичному рівні демаркація в деяких ділянках зберігалась у вигляді варіативної за товщиною смужки неструктурованого матеріалу.

У глибокій зоні регенерату трабекули складалися 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 остеокити, навпаки, мали розвинуту цитоплазму, майже не утворювали відростків, містили елементи комплексу Гольджі та гранулярного ретикулumu (рис. 5).

В окремих глибоких ділянках регенерату зустрічались осередки грубоволокнистої кісткової тканини, які містили помірну кількість активних остеокластів. При імуногістохімічному вивченні розподілу Calcitonin-SP17-позитивних остеоклас-

тів виявлялась висока активність резорбції грубоволокнистої тканини трабекул у глибокій зоні регенерату, в той час як пластинчаста тканина більшості трабекул губчастої кістки регенерату містила остеокласти з обмеженою функціональною активністю. Між гетероморфними кістковими трабекулами у стані ремоделювання спостерігались дрібні вогнища фіброзування, які містили поодинокі фіброblastи та помірну кількість CD34-позитивних ендотеліальних елементів. При трансмісійній електронній мікроскопії в ділянках фіброзу візуалізувались функціонуючі гемокапіляри з суцільною ендотеліальною стінкою і замкнутими міжендотеліальними контактами в оточенні гетероморфних пучків зрілих колагенових волокон з хаотичною орієнтацією (рис. 6).

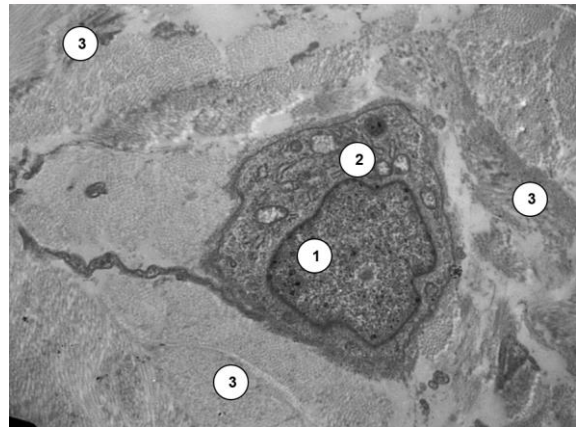


Рис. 5. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом β -ТКФ. 1 – ядро незрілого остеокита; 2 – залишки цитоплазми остеокита; 3 – пучки колагенових волокон примітивних кісткових пластинок. $\times 3000$.



Рис. 6. Електронна трансмісійна мікрофотографія глибокої ділянки регенерату нижньої щелепи кролика через 12 тижнів після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом β -ТКФ. 1 – ядро ендотеліокита; 2 – відросток фіброblastа; 3 – пучки колагенових волокон в осередку фіброзу. $\times 2500$.

За своєю загальною площею ділянки фіброзу помітно поступалися контрольній групі. Аналіз

розподілу експресії маркера Ki-67 виявив помірний проліферативний потенціал ендотеліоцитів у трабекулах глибокої зони регенерату, в той час як істотна щільність Ki-67-позитивних ядер остеобластів, на відміну від групи контролю, свідчила про їх помірну проліферацію в глибокій зоні регенерату.

Висновки

1. Альтеративні зміни кісткової тканини коміркової частини нижньої щелепи після утворення трепанційного отвору супроводжуються формуванням гетероморфних остеїдних виростів на поверхні ушкоджених остеонів і кісткових трабекул починаючи з першого тижня після травми за рахунок проліферації остеобластів з наступним зростанням їх синтетичної активності. Впродовж перших трьох тижнів після травми загоєння дефекту під кров'яним згустком здійснюється через утворення численних острівців перетинчастого остеогенезу в грануляційній тканині на тлі інтенсивного неоваскулогенезу з паралельною міграцією й активацією остеопрогеніторних клітин з їх наступним цитодиференціюванням, що через три тижні експерименту призводить до формування та анастомозування примітивних кісткових трабекул на периферії регенерату. Обмежена васкуляризація глибокої зони експериментального дефекту в перші три тижні після травми супроводжується активним фіброзуванням та утворенням дрібних відокремлених осередків хрящового остеогенезу.

2. Через 5 тижнів у периферичних ділянках кісткового регенерату з боку трабекул материнської кістки ініціюється ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки з появою незрілих остеоцитів. У внутрішні ділянки регенерату поширюється губчаста структура новоутворених грубоволокнистих кісткових трабекул за рахунок інтенсивної проліферації остеобластів і активації ангиогенезу. Через 8 тижнів загоєння утворюється добре васкуляризована суцільна губчаста структура кісткового регенерату, глибока зона якого зберігає численні дрібні ділянки фіброзу. Через 12 тижнів репаративний регенерат частково інтегрований з материнською кісткою, переважно за рахунок анастомозування її зрілих трабекул з новоутвореною губчастою кісткою регенерату. Пластинчаста кісткова тканина на периферії регенерату широко варіює за гістоархітектурою та ступенем диференціювання остеобластів і остеоцитів, відрізняючись від зрілих остеонів материнської кістки. Глибока зона регенерату поряд із численними ділянками фіброзу містить трабекули з ознаками активного ремоделювання грубоволокнистої кісткової тканини, що призводить до утворення примітивних кісткових пластинок з переважанням незрілих остеоцитів.

3. Імплантація матеріалу β -ТКФ не впливає на характер і динаміку альтеративних змін материнської кісткової тканини коміркової частини

нижньої щелепи після травми, проте протягом 2-3-го тижнів експерименту зумовлює суттєве збільшення кількості і щільності осередків перетинчастого остеогенезу на периферії кісткового регенерату з їх подальшим анастомозуванням і об'єднанням з кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. Реалізація остеокондуктивного потенціалу синтетичних гранул β -ТКФ відбувається через створення умов для активного неоваскулогенезу, міграції та цитодиференціювання остеогенних клітин, причому означені процеси розповсюджуються хвилеподібно від периферії до глибокої зони регенерату. Ультраструктура остеобластів поблизу межі з материнською кісткою свідчить про обмеження їх синтетичної активності, в той час як остеобласти у товщі керамічно-кісткового регенерату інтенсивно синтезують аморфний і волокнистий компоненти остеїду. В глибокій зоні імплантату поява функціонуючих мікросудин запобігає формуванню осередків хрящового матриксу та обмежує ступінь фіброзування, що супроводжується утворенням острівців десмального остеогенезу.

4. Через 5 тижнів після імплантації синтетичного β -ТКФ у периферичних ділянках кістково-керамічного регенерату відбувається інтенсивне ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки, причому відновлені остеони материнської кістки, прилеглої до зони імплантації, а також структури відновленого періосту стимулюють появу зрілих остеоцитів у новоутворених трабекулах регенерату. Імплантація синтетичного кальційфосфатного матеріалу суттєво прискорює розповсюдження хвилі ремоделювання кісткової тканини від периферії вглиб регенерату в період з 4-го до 12-го тижнів експерименту, проте не забезпечує повної остеointegraції імплантату на клітинному рівні та відновлення якості фібрилогенезу на ультраструктурному рівні, не запобігає частковому фіброзуванню глибокої зони регенерату та не забезпечує повного відновлення остеокитарної лакуно-каналцевої системи.

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 імуністохімічні 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):2445-61. <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. Rolvien T, Barvencik F, Klatte TO, et al. β -TCP bone substitutes in tibial plateau depression fractures. *Knee*. 2017;24(5):1138-45. <https://doi.org/10.1016/j.knee.2017.06.010>
4. Shen C, Ma J, Chen XD, Dai LY. The use of beta-TCP in the surgical treatment of tibial plateau fractures. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009;17(12):1406-11. <https://doi.org/10.1007/s00167-009-0726-z>
5. Scheer JH, Adolphsson LE. Tricalcium phosphate bone substitute in corrective osteotomy of the distal radius. *Injury*. 2009;40(3):262-7. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.08.013>
6. Szabó G, Huys L, Coulthard P, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(3):371-81.
7. Stiller M, Kluk E, Bohner M, Lopez-Heredia MA, Müller-Mai C, Knabe C. Performance of β -tricalcium phosphate granules and putty, bone grafting materials after bilateral sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials*. 2014;35(10):3154-63. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.068>
8. Trombelli L, Franceschetti G, Stacchi C, et al. Minimally invasive transcrestal sinus floor elevation with deproteinized bovine bone or β -tricalcium phosphate: a multicenter, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2014;41(3):311-9. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12210>
9. Bohner M, Santoni BLG, Döbelin N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater*. 2020;113:23-41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.022>
10. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial?. *J Clin Periodontol*. 2019;46(21):92-102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>
11. 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):232-43. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1>
12. Everts V, Niehof A, Tigchelaar-Gutter W, Beertsen W. Transmission Electron Microscopy of Bone. *Methods Mol Biol*. 2019;1914:617-29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_32
13. 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>
14. 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>
15. Suvana 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>
16. 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
17. Nguyen T. *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge: Cambridge University Press; 2022. 272 p.
18. 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>
19. Hayat MA. *Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications* [4th ed.]. Cambridge : Cambridge University Press; 2000. 543 p.
20. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg: 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. Ремоделювання кістки нижньої щелепи після трансплантації β -трикальційфосфату: гістологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні аспекти.

РЕФЕРАТ. У статті представлені результати дослідження гістологічних, імуногістохімічних та ультраструктурних характеристик кістково-керамічного регенерату після трансплантації β -трикальційфосфату (β -ТКФ) 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 β -ТКФ. **Методи.** Досліди виконано на 45 кроликах-самцях віком 6-7 міс, масою 2,5-3,0 кг. 20 тварин становили контрольну групу, 20 – експериментальну. Ще 5 інтактних тварин було використано для вивчення нормальної структури кісткової тканини досліджуваної ділянки нижньої щелепи. До контрольної групи увійшли тварини з дефектом кісткової тканини, який загоювався під кров'яним згустком. Експериментальну групу складали кролики, у яких кістковий дефект заповнювали матеріалом β -ТКФ. 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.** Імплантація матеріалу β -ТКФ не впливає на характер і динаміку альтеративних змін материнської кісткової тканини коміркової частини нижньої щелепи після травми, проте протягом 2-3-го тижнів експерименту зумовлює суттєве збільшення кількості і щільності осередків перетинчастого остеогенезу на периферії кісткового регенерату з їх подальшим анастомозуванням і об'єднанням з кістковими трабекулами материнської губчастої кістки. Реалізація остеокондуктивного потенціалу синтетичних гранул β -ТКФ відбувається через створення умов для активного неоваскулогенезу, міграції та цитодиференціювання остеогенних клітин, причому означені процеси розповсюджуються хвилеподібно від периферії до глибокої зони регенерату. Ультраструктура остеобластів поблизу межі з материнською кісткою свідчить про обмеження їх синтетичної активності, в той час як остеобласти у товщі керамічно-кісткового регенерату інтенсивно синтезують аморфний і волокнистий компоненти остеоїду. В глибокій зоні імплантату поява функціонуючих мікросудин запобігає формуванню осередків хрящового матриксу та обмежує ступінь фіброзування, що супроводжується утворенням острівців десмального остеогенезу. Через 5 тижнів після імплантації синтетичного β -ТКФ у периферичних ділянках кістково-керамічного регенерату відбувається інтенсивне ремоделювання грубоволокнистого матриксу в примітивні кісткові пластинки, причому відновлені остеони материнської кістки, прилеглої до зони імплантації, а також структури відновленого періосту стимулюють появу зрілих остеоцитів у новоутворених трабекулах регенерату. Імплантація синтетичного кальційфосфатного матеріалу суттєво прискорює розповсюдження хвилі ремоделювання кісткової тканини від периферії вглиб регенерату в період з 4-го до 12-го тижнів експерименту, проте не забезпечує повної остеоінтеграції імплантату на клітинному рівні та відновлення якості фібрилогенезу на ультраструктурному рівні, не запобігає частковому фіброзуванню глибокої зони регенерату та не забезпечує повного відновлення остеоцитарної лакуно-канальцевої системи.

Ключові слова: нижня щелепа, зубощелепний апарат, регенерація кісткової тканини, β -трикальційфосфат, гістоструктура, імуногістохімія, ультраструктура.