

І.В. Челпанова

Львівський національний університет імені
Данила Галицького
Львів, Україна

Надійшла: 16.10.2022
Прийнята: 10.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.51-59>

УДК:611.71.018:616.71-089.843-003.93

УЛЬТРАСТРУКТУРНЕ ТА МОРФОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДИНАМІКИ РЕГЕНЕРАЦІЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ КОМБІНАЦІЇ ОКТАКАЛЬЦІЙФОСФАТУ З ХІТОЗАНОМ І АМПІЦИЛІНОМ ДЛЯ ОСТЕОПЛАСТИКИ

Chelpanova I.V.   Ultrastructural and morphometric study of bone tissue regeneration dynamics using a combination of octacalcium phosphate with chitosan and ampicillin for osteoplasty.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. The relevance of this study is to provide a comprehensive understanding of the dynamics of bone tissue remodeling after the creation of a defect and subsequent filling with an osteoplastic material containing chitosan, a cationic linear polysaccharide. Despite the established clinical use of osteoplastic materials and the unique properties of chitosan, its impact on bone regeneration in the maxillofacial region, its mechanisms and dynamics, remain incompletely understood and require further clarification and detailed investigation. **Aim.** The aim of this study is to determine the dynamics of histoarchitectural remodeling of bone-ceramic regenerate following the transplantation of octacalcium phosphate in combination with chitosan and ampicillin into an experimental defect in the rabbit mandible. **Methods.** Adult male rabbits aged 6-7 months and weighing 2.5-3 kg were used for the study. The control group consisted of animals with a bone defect that healed under a blood clot. The experimental group consisted of rabbits in which the bone defect was filled with an osteotropic material containing octacalcium phosphate, chitosan acetate, and ampicillin (OCP-N-Chitosan-Ampicillin). Post-traumatic bone tissue status within the defect area was monitored for 84 days. Ultrastructural changes were studied using scanning electron microscopy. To determine changes in the regenerate composition, three parameters were counted. The data was analyzed using the Student's t-test, and a difference at $p < 0.05$ was considered statistically significant. **Results.** The OCP-N-Chitosan-Ampicillin material induced significant regenerative changes in the surface of the lower jaw experimental bone defect that occurred after the injury and correlated with the dynamics of changes in the relative volume of bone tissue, osteoplastic material, and connective tissue in the regenerate. Morphometric analysis of the relative volume of the regenerative components of the experimental defect established a phased nature of the dynamics of the studied changes. The osteocyte lacuno-canalicular system formed following implantation of the material exhibited characteristics of a typical structure. No foci of incomplete osteogenesis were observed. Compared to the control group, in the area of the external bone lamellae after application of the OCP -N-Chitosan-Ampicillin material, the osteons of the regenerate, in terms of structure and geometry, corresponded to the normal bone of the mandibular ramus. **Conclusion.** In the experimental group of animals where the defect was filled with OCP-N-Chitosan-Ampicillin material, an active increase in the relative volume of bone tissue in the regenerate was observed. This increase followed a similar dynamic trend as the control group, but it was significantly more intense and advanced than the control.

Key words: mandible/lower jaw, dentoalveolar apparatus, bone tissue, bone regeneration, osteoplastic materials, chitosan, morphometric study, scanning electron microscopy, rabbits.

Citation:

Chelpanova IV. [Ultrastructural and morphometric study of bone tissue regeneration dynamics using a combination of octacalcium phosphate with chitosan and ampicillin for osteoplasty]. *Morphologia*. 2022;16(4):51-9. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.51-59>

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

 ilona.med75@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Пошкодження кісток є поширеною проблемою сьогодення, яка може виникати через тра-

вми, хвороби або хірургічні втручання. Тому, розробка ефективних методів відновлення кісткової тканини, які б сприяли швидкому загоєнню

кісток, знижували ризик ускладнень та покращували якість життя пацієнтів є одним з пріоритетних питань сучасної стоматології та травматології [1, 2]. Враховуючи природну здатність кістки до регенерації, об'ємні дефекти, патологічні переломи або інфекції можуть перешкоджати процесу загоєння. З літературних оглядів, опублікованих Ferraz MP. відомо, що в таких випадках необхідне хірургічне втручання з використанням кісткових замінників. Хітозан є природним полімером, отриманим шляхом деацетилювання хітину. [3]. Хітозан, отриманий шляхом деацетилювання хітину є сприятливим природним біополімером для регенеративної медицини, оскільки має здатність до біорозкладання, нетоксичний, біоактивний, біосумісний, не викликає імунної відповіді та має антибактеріальні властивості, а також, має структуру, схожу на глікозаміноглікани і протеоглікани, виявлені у позаклітинному матриксі, які пов'язані з основними фізіологічними функціями в тканині [4, 5].

За даними Signorini L, Marenzi G et al. популярність кісткової пластики зростає завдяки розробці нових біоматеріалів, які використовуються як трансплантати або каркаси для відновлення кісткових дефектів. Останніми роками хітозан, продемонстрував свої унікальні характеристики, такі як: біосумісність, здатність до біодеградації та остеокондуктивність. Крім того, наявність численних активних аміногруп у його хімічній структурі дозволяє легко модифікувати його, що може представляти великий інтерес для його застосування у регенеративній галузі медицини та стоматології.

Відомо, що 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. "Золотим стандартом" кісткової пластики для великих дефектів вважається використання аутологічної кістки з гребеня клубової кістки. Однак, цей метод має свої недоліки [6, 7]. Оптимальні кісткові трансплантати мають відповідати наступним ключовим критеріям: стимулювати остеогенез, сприяючи загоєнню та відновленню кісткових структур, не викликати імунної відповіді та сприяти швидкій реваскуляризації, стимулювати остеоіндукцію та остеокондукцію для якісного заміщення трансплантату кістковою тканиною, аналогічною до тканин організму-господаря [7]. Сьогодні, широко застосовують матеріали тваринного походження, ксеногенні матеріали або ксенотрансплантати з їх неорганічною складовою – гідроксиапатитом. Ксеногенні матеріали вигідно відрізняються від інших матеріалів своєю хімічною структурою, яка дуже близька до структури людської кістки. Зокрема, співвідношення кальцію та фосфату в ксеногенних матеріалах (1,67) точно відповідає

цьому показнику в людській кістці, що робить їх ідеальними для трансплантації. Така схожість, особливо у матеріалах з бичачої кістки, значно покращує їх здатність стимулювати регенерацію кісткової тканини. Октакальційфосфат часто використовують з метою заповнення кісткових дефектів, оскільки він швидко розкладається в організмі, а його структуру легко замінює природна кісткова тканина [8]. Удосконалений кристалічний матеріал октакальційфосфат сприяє факторам, що стимулюють регенерацію кісток [9]. Він давно став одним із найпопулярніших і найчастіше використовуваних ксеногенних матеріалів, особливо в стоматології. З літературних оглядів, опублікованих Maliki S, Sharma G, Kumar A, et al. відомо, що нанокompозити, гідрогелі та мембрани на основі хітозану використовуються в регенеративній медицині та стоматології. У галузі стоматології він набув великої популярності завдяки своєму природному походженню, біосумісності та зниженій цитотоксичності, антимікробним властивостям. Однак він, як і раніше, має певні обмеження відносно його структури та молекулярної маси. Проте, цей природний наноматеріал широко використовується і має відмінний потенціал для розширення своїх біотичних властивостей у найближчому майбутньому. Будучи другим за поширеністю біополімером у природі після целюлози, потенціал хітозану як стійкого майбутнього матеріалу у стоматології та медицині потребує подальшого вивчення. [10, 11].

Мета дослідження – визначити динаміку гістоархітектурних перебудов кістково-керамічного регенерату після трансплантації октакальційфосфату у поєднанні з хітозаном та ампіциліном в експериментальний дефект нижньої щелепи кролика.

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 знечуленням, шляхом внутрішньоочеревинного введення Тіопенату («Брофарма», Україна), з розрахунку 25 мг/кг маси тіла тварини на рівні беззубої ділянки коміркової частини нижньої щелепи за допомогою стоматологічного бора наносили кісткоруйнуючу травму у вигляді шахти глибиною 4 мм та шириною 3 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 комбінацією остеотропного матеріалу CompactBoneB (Dentegris, Німеччина) – натураль-

льного замісника бичачої кістки, основним кристалічним матеріалом якого є нативний октакальційфосфат, з Хітозан-ацетат+Ампіцилін (Київмедпрепарат, Україна) (ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін). Порошок Хітозан-ацетат+Ампіцилін (водорозчинна сіль) – це комплекс для стимуляції загоєння ран. Замість оцтової кислоти, якою активують неактивних хітозан додали ампіцилін, що має карбоксильну групу (- заряд) та зв'язується з хітозаном іонними зв'язками. Хітозан має позитивний заряд. Ампіцилін в даному комплексі складає 1/10 від маси хітозану, а при додаванні оцтової кислоти знижується РН та підвищується розчинність. Ампіцилін – ампіциліну тригідрат має широкий спектр антимікробної дії. Активний щодо грампозитивних мікроорганізмів і ряду грамнегативних мікроорганізмів, що має значення з урахуванням широкого спектру мікрофлори ротової порожнини. Дослідження стану кісткової тканини в ділянці нанесеного дефекту здійснювали через 1, 7, 14, 21, 28, 35, 56 та 84 доби після нанесення травми.

Динаміку гістоархітектурних перебудов кісткової тканини в зоні експериментального дефекту нижньої щелепи вивчали методом скануючої електронної мікроскопії, виконаної на скануючому електронному мікроскопі JEOL T220A на базі лабораторії фізичних методів дослідження в геології ЛНУ ім. І. Франка. Для отримання мікрофотографій фрагментів міжзубної ділянки коміркової частини нижньої щелепи зразки фіксували в 2,0 % розчині глютаральдегіду та тричі (по 10 хв.) промивали дистильованою водою. Після промивки проводили процедуру сублімаційного сушіння, з замороженням вологих зразків та наступним вміщенням їх у вакуумну камеру, для сублімації вологи упродовж 1,5-2 годин до повного випаровування. Висушені зразки тканин приклеювали до циліндричних мідних столиків, після чого їх поверхню металізували шляхом термічного напылення тонкого шару міді (до 20 нм). Напылення здійснювали в напылювачі ВУП-5. Для фотографування поверхні зразків використовували збільшення $\times 15-200$, прискорююча напруга в усіх дослідах була рівною 20 кВ [12, 13].

Для виготовлення гістологічних препаратів фрагменти кістки нижньої щелепи з остеотропними матеріалами фіксували у свіжоприготованому 10% розчині формаліну, демінералізували у 10 % водному розчині азотної кислоти (HNO_3), що дозволяло максимально зберегти структури регенерату. Після цього фрагменти кісток проводили у спиртах висхідної концентрації спиртів з подальшою заливкою у парафін. З отриманих парафінових блоків виготовляли зрізи товщиною 5–7 мкм на санному мікроскопі марки MC-2 ТУ-64-1-1629-78. Отримані зрізи поміщали на предметні скельця, депарафінували та забарвлювали гематоксиліном та еозином загальноприйнятим

методом [14], візуалізували за допомогою світлового мікроскопа UlabXSP –137TLED (КНР) та фотографували камерою XCAM-1080 P (КНР). Для визначення змін складу регенерату використовували підрахунок відносного об'єму кісткової тканини; остеопластичного матеріалу; сполучної тканини в регенераті, що були визначені на демінералізованих гістологічних зрізах фрагментів нижньої щелепи, забарвлених гематоксиліном та еозином. Порівнювали морфометричні показники кісткової тканини тварин контрольної групи з тваринами, яким застосовували ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін.

Для визначення підпорядкування отриманих даних нормальному закону розподілу використовували аналіз гістограми розподілу, показники коефіцієнтів асиметрії та екстинкції, критерій Шапіро-Уїлка. Результати кожної групи в різні моменти часу підпорядковувались нормальному закону розподілу, їх подано у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартне відхилення середнього. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми значеннями показників у різні терміни експерименту, а також для порівняння даних групи контролю з експериментальною групою в однакові строки спостереження використовували t-критерій Стюдента. Різницю між групами вважали достовірною при $p < 0,05$.

Усі тварини знаходились в умовах віварію і процедури, що стосувалися питань утримання, догляду, маркування та всі інші маніпуляції проводились 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 дослідження

Вивчення мікрорельєфу кісткової поверхні за допомогою растрового електронного мікроскопа в ділянці експериментального кісткового дефекту нижньої щелепи кроликів після імплантації в його порожнину матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін продемонструвало ефективність процесів регенерації, що відбувалися після нанесення травми. Через одну добу після втручання гладка поверхня експериментального дефекту, її компактна кортикальна пластинка, містила в собі ушкоджені кровоносні мікросудини з внутрішньосудинними тромботичними масами в оточенні дрібних крововиливів. Між ушкодженими кістковими трабекулами та спікулами губ-

частої кістки коміркового відростка по краях шахти візуалізувалися зруйновані фрагменти окремих кісткових трабекул (рис. 1).

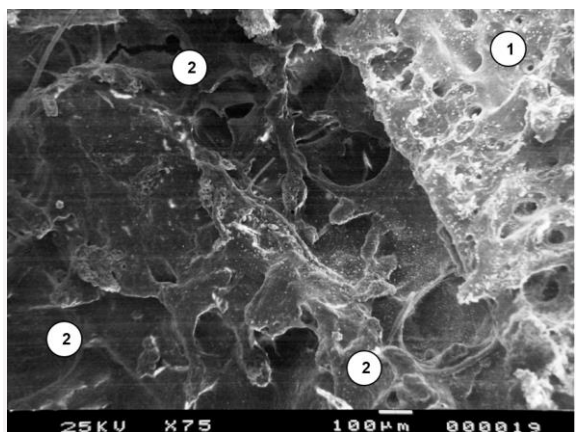


Рис. 1. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 1 добу після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. $\times 75$. 1 – деформована поверхня зовнішньої кісткової пластинки з ушкодженими мікросудинами; 2 – ушкоджені кісткомозкові простори між трабекулами губчастої кістки міжзубної ділянки коміркової частини.

У зоні механічної остеодеструкції були характерними явища периваскулярного набряку, спостерігались екстравазальні скупчення еритроцитів та поліморфнонуклеарів, в окремих судинах переважали ознаки стазу. У маргінальних зонах імплантованого матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін візуалізували накопичення гомогенної речовини, ексудату.

Упродовж 1-3 тижнів експерименту на поверхні ушкоджених остеонів і кісткових трабекул спостерігали активне формування остеοїдних острівців і випинань, які відрізнялися за розміром та формами та майже суцільно вкривали поверхню трабекул. Ознаки запалення в ділянці експериментального кісткового дефекту (периваскулярний набряк, лейкоцитарна інфільтрація, судинний стаз) прогресивно зменшувалися упродовж перших двох тижнів після втручання, а через 3 тижні експерименту вони зникали повністю. У поодиноких зонах перетинчастого остеогенезу спостерігали переважно дифузну локалізацію фібробластоподібних клітин, кількість яких була значно вищою, ніж у контрольній групі. У периферичних зонах регенерату, між фрагментами імплантованого матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін, новоутворені трабекули об'єднувались із трабекулами материнської губчастої кістки, що мали горбоподібний рельєф (рис. 2). У глибоких ділянках регенерату визначалася помірна кількість кровоносних мікросудин в оточенні активних фібробластів і щільних спікулоподібних сполучнотканинних виростів.

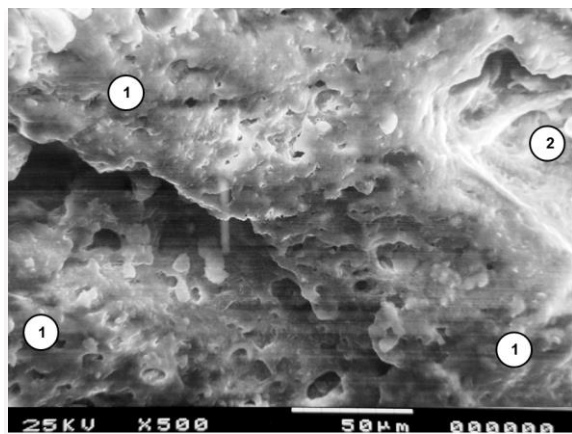


Рис. 2. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 3 тиж після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. $\times 500$. 1 – мікрорельєф поверхні новоутворених трабекул; 2 – ділянка з'єднання з материнською кісткою.

Через 4 і 5 тижнів після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін у периферичних відділах регенерату виявлялися численні новоутворені остеοїдні трабекули, що мали радіальне розташування, були різної форми та пов'язані між собою численними анастомозами. Частинки введеного остеотропного матеріалу зустрічалися в поодиноких випадках. У глибоких зонах експериментального дефекту виявляли великі за площею маси грубоволокнистої кісткової тканини, у товщі яких спостерігали посилені явища неоваскулогенезу у вигляді густої сітки примітивних кровоносних мікросудин поблизу дифузно розташованих частинок частково резорбованого матеріалу. Проміжки між остеοгенними острівцями та гемокапілярами були заповнені вогнищевими скупченнями поліморфних остеобластів (рис. 3).

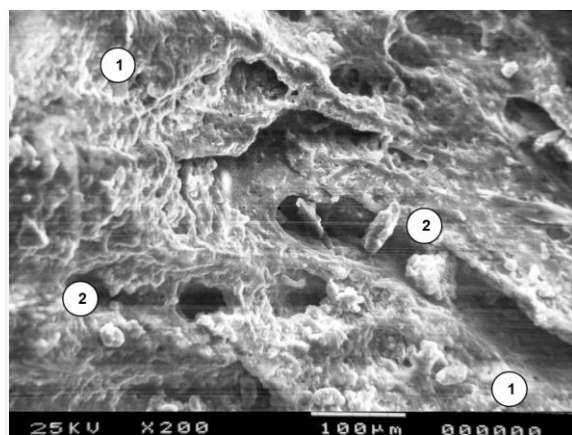


Рис. 3. Електронна сканограма зони кісткового дефекту нижньої щелепи кролика через 5 тиж після нанесення травми та заповнення дефекту матеріалом ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін. $\times 100$. 1 – мікрорельєф поверхні трабекул у глибокій зоні регенерату; 2 – поліморфні остеобласти.

В окремих територіальних одиницях глибокої зони регенерату довкола фрагментів імплантату спостерігали осередки перетинчастого остеогенезу зі значною кількістю клітин фіброblastного ряду. У новоутворених трабекулах, що лежали периферійно між залишками мікрочастинок матеріалу, переважно розташовувалися типові остеогенні клітини, як от остеобласти та первинні остецити. Це суттєво відрізнялося від зразків контрольної групи, в яких вміст вказаних клітин був значно нижчий. Поверхня більшості новоутворених трабекул мала горбистий рельєф. На межі регенерату з пластинчастою кістковою тканиною кортикальної пластинки материнської кістки у вигляді ланцюжка спостерігалися скупчення остеокластів. На відміну від попереднього терміну спостережень, осередків перетинчастого остеогенезу в поверхневій локалізації не спостерігали. Визначалася межа щільного прилягання грубоволокнистої тканини новоутворених трабекул до остеонного компонента кортикальної пластинки материнської кістки. На поверхні кісткових трабекул, а також поблизу частинок імплантованого матеріалу виявлялися активовані остеокласти, що говорить на користь інтенсивного остеолітичного процесу у складі регенерату. У порівнянні з 3-м тижнем експерименту вміст остеокластів був високий, що відповідало аналогічному показнику контрольної групи.

На 8-й тиждень експерименту трабекулярні структури в складі кісткового регенерату, зокрема, у глибині штучного кісткового дефекту на периферії зони регенерації нагадували пластинчасту кісткову тканину без чіткої зони демаркації з материнською губчастою кісткою. Структурна організація регенерату являла собою неоднорідну губчасту структуру, представлену примітивними кістковими пластинками новоутвореної грубоволокнистої тканини з елементами резорбованих фрагментів імплантованого матеріалу. При цьому кількість кровоносних мікросудин різко зростала у порівнянні з контрольною групою на відповідному терміні експерименту; прошарки сполучної тканини навколо новоутворених мікросудин були незначними, з поодинокими колагеновими волокнами. Кількість остеогенних клітин та остеокластів була нижчою, ніж на попередньому терміні експерименту. Поодинокі остеокласти зустрічалися в глибоких ділянках залишкових фрагментів грубоволокнистої кісткової тканини регенерату практично без залишків імплантованого матеріалу. На відміну від спостережень у контрольній групі тварин, вищезгадані зміни засвідчили більш швидкий процес ремоделювання означених ділянок. На межі регенерату із зовнішньою кістковою пластинкою материнської кістки новоутворені остеони виявляли ознаки формування лакуно-каналцевих структур, а структура регенерату наближалася до нормальної будови кістки коміркового відростка.

Через 12 тижнів після нанесення експериментальної травми та імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін трабекули губчастої кістки коміркового відростка склалися переважно з пластинчастої тканини. В глибоких ділянках регенерату практично не зустрічалися осередки грубоволокнистої кісткової тканини, кількість остеогенних клітин та активованих остеокластів була мінімальною, залишків імплантованого матеріалу не виявляли. У периферичних ділянках регенерату, поблизу неушкодженої травмою материнської губчастої кістки, мікрорельєф поверхні більшості трабекул був чіткий, гладкий, без ознак новоутворення остеоїду. Отже, остеокитарна лакуно-каналцева система, що утворювалася після імплантації матеріалу, демонструвала ознаки типової будови. Осередки незавершеного остеогенезу не візуалізувалися. У порівнянні з контрольною групою тварин, у зоні зовнішньої кісткової пластинки після застосування матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін остеони регенерату за своєю структурою та геометрією відповідали нормі кістки коміркового відростка нижньої щелепи.

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

Морфометричний аналіз показав, що за умов використання матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін відбувається активне збільшення відносного об'єму кісткової тканини в регенераті, яке за напрямком динаміки було схожим на таку в контрольній групі, проте за інтенсивністю змін значно перевершувало та випереджало контроль. Зокрема, вже через 1 тиждень після імплантації значення параметра в 2,5 рази ($p < 0,05$) перевищувало його контрольний рівень і в 2,9 рази ($p < 0,05$) зросло відносно показника першої доби. Через 2 тижні після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін різке зростання параметра більш ніж удвічі перевершувало ступінь його підвищення в контрольній групі; через 3 тижні – на 93,1% ($p < 0,05$); через 4 тижні – на 45,5% ($p < 0,05$); через 5 тижнів – на 37,0%

($p < 0,05$). У період від 5-го до 8-го тижня після імплантації матеріалу відносний об'єм кісткової тканини стабілізувався на рівні 75-79% від загального об'єму кістково-керамічного регенерату і

наприкінці експерименту не відрізнявся у статистично значущому ступені від показників контрольної групи.

Таблиця 1
Динаміка змін відносного об'єму кісткової тканини, остеопластичного матеріалу та сполучної тканини в регенераті (%), $M \pm m$

Термін	Кісткова тканина		Матеріал	Сполучна тканина	
	Контроль	Експеримент		Контроль	Експеримент
1 доба	3,7 $\pm$ 0,6	4,9 $\pm$ 0,8	78,1 $\pm$ 8,0	6,9 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,6
7 діб	5,6 $\pm$ 0,8#	14,2 $\pm$ 1,4*#	57,2 $\pm$ 6,1#	14,7 $\pm$ 1,1#	17,4 $\pm$ 1,8#
14 діб	15,4 $\pm$ 1,2#	32,8 $\pm$ 3,4*#	23,1 $\pm$ 2,6#	30,5 $\pm$ 2,4#	43,1 $\pm$ 3,8*#
21 доба	24,7 $\pm$ 1,8#	47,7 $\pm$ 4,2*#	15,8 $\pm$ 1,8#	56,1 $\pm$ 3,5#	34,8 $\pm$ 3,6*#
28 діб	41,5 $\pm$ 3,4#	60,4 $\pm$ 5,7*#	10,2 $\pm$ 0,8#	41,8 $\pm$ 3,1#	27,4 $\pm$ 2,7*#
35 діб	54,8 $\pm$ 3,7#	75,1 $\pm$ 6,5*#	7,6 $\pm$ 0,6#	34,2 $\pm$ 2,3#	17,4 $\pm$ 2,1*#
56 діб	68,2 $\pm$ 4,5#	77,4 $\pm$ 7,6	5,3 $\pm$ 0,8	20,7 $\pm$ 1,7#	14,6 $\pm$ 1,6*
84 доби	70,3 $\pm$ 4,8	78,1 $\pm$ 6,8	1,5 $\pm$ 0,6#	24,5 $\pm$ 2,0	15,8 $\pm$ 1,5*

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

При аналізі відносного об'єму остеопластичного матеріалу в регенераті на етапах аугментації експериментального дефекту в групі з імплантацією матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін найбільша активність біорезорбції спостерігалась у перші два тижні експерименту. Зокрема, протягом першого тижня після імплантації досліджуваній параметр зменшувався на 26,8% ($p < 0,05$) відносно значення через 1 добу. Протягом другого тижня зниження відносного вмісту матеріалу було найінтенсивнішим серед всіх досліджуваних термінів – у 3,4 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з показником першого тижня, досягаючи величини (23,1 $\pm$ 2,6)%. У наступні терміни експерименту відбувалось уповільнення темпів біорезорбції. Через 3 і 4 тижні після імплантації величина параметра зменшувалась на 31,6% ($p < 0,05$) і 35,4% відповідно у порівнянні з попереднім терміном. Після 5-го тижня експерименту відносний об'єм залишків матеріалу у тварин групи ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін поступово зменшувався до мінімального значення через 12 тижнів (1,5 $\pm$ 0,6)%.

Морфометричне вивчення відносного об'єму сполучної тканини в регенераті експериментального дефекту в контрольній групі дозволило встановити фазовий характер динаміки змін параметра. У перші три тижні експерименту спостерігалось активне зростання вмісту сполучнотканинного компонента у складі регенерату. Зокрема, через 1 тиждень після нанесення травми параметр зростав у 2,1 рази ($p < 0,05$) відносно значення через 1 добу; через 2 тижні експерименту – на 107,5% ($p < 0,05$) у порівнянні з величиною 1-го тижня; через 3 тижні параметр підвищувався на 83,9% ($p < 0,05$) відносно рівня попереднього терміну та сягав найвищого значення

(56,1 $\pm$ 3,5)%. У подальшій динаміці змін вмісту сполучної тканини спостерігалось поступове зниження показника: через 4 тижні – на 25,5% ($p < 0,05$) відносно пікового значення 3-го тижня; через 5 і 8 тижнів – на 18,2% ($p < 0,05$) і 39,5% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з попереднім терміном дослідження. У період від 8-го до 12-го тижня відносний об'єм сполучної тканини в регенераті, що формувався під кров'яним згустком, не змінювався у статистично вагомому ступені та стабілізувався на рівні (24,5 $\pm$ 2,0)%.

За результатами визначення відносного об'єму сполучної тканини в регенераті, через 1 тиждень після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін спостерігалось дворазове зростання параметра у порівнянні з рівнем першої доби експерименту. Протягом другого тижня відбувалось найбільш інтенсивне накопичення сполучнотканинного компонента регенерату – у 2,5 рази ($p < 0,05$) відносно попереднього терміну; показник експериментальної групи досягав найвищого за весь період спостережень рівня (43,1 $\pm$ 3,6)%, що на 41,3% ($p < 0,05$) перевищувало контрольну величину. Через три тижні після імплантації матеріалу, на відміну від контрольної групи, вміст сполучної тканини в кістково-керамічному регенераті на 19,3% ($p < 0,05$) зменшувався відносно попереднього терміну, поступаючи значенню групи контролю на 38,0% ($p < 0,05$). Протягом 4-8-го тижнів експерименту спостерігалась інтенсивна редукція сполучнотканинного компонента регенерату. Зокрема, через 4 тижні після імплантації матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін параметр поступався контролю на 34,4% ($p < 0,05$), через 5 тижнів – на 49,1% ($p < 0,05$), через 8 тижнів – на 29,5% ($p < 0,05$). Через 12 тижнів дослідження величина параметра

експериментальної групи не відрізнялась істотно від значення попереднього терміну, проте поступався контрольному рівню на 35,5% ($p < 0,05$).

Обговорення

Відновлення кісткової тканини залишається складним та актуальним завданням для сучасної медицини [2]. Кісткову пластику широко використовують у різних клінічних сценаріях. Зокрема, в пародонтальній хірургії, імплантації зубів, синус-ліфтингу, збереженні комірок та багатьох інших процедурах. Традиційні методи пересадки кісткової тканини мають ряд недоліків, включаючи ризик інфекції та пошкодження донорського ділянки [17]. Нові матеріали повинні бути біосумісними, мати відповідну міцність, хімічний склад та пористу структуру, яка сприяє проростанню нової кісткової тканини. [18, 19].

Дослідження в галузі регенеративної медицини схвалюють використання хітозану як пористої основи для використання у регенеративній кістковій інженерії через його позитивні властивості, такі як біосумісність, здатність до біодеградації та остеокондуктивність. Використання матриці на основі хітозану для реконструкції дефектів носової кістки, продемонструвало покращення остеогенезу та щільність кісткової тканини [20]. Окрім цього, сучасні технології демонструють ще більшу ефективність у підтримці процесів фізіологічної регенерації. Зокрема, наномедицина досягла значного прогресу в галузі тканинної інженерії. Комбінація нових біоматеріалів, таких як хітозанові матеріали, з нанотехнологіями на основі вуглецевих нанотрубок може стати перспективним рішенням для подолання проблеми великих дефектів кісток [21]. Сіль хітозану (гідрохлорид хітозану) була схвалена Фармакопеею у 2002 році. Хітозан був вперше представлений як допоміжна речовина в Європейській Фармакопеї 6.0 та 29-му виданні Фармакопеї США (USP) 34-NF майже через десять років. Ці монографії містять аналізи та встановлюють межі, яких необхідно дотримуватися при використанні полімеру як фармацевтичної допоміжної речовини [22, 23]. Зростання кількості публікацій, щодо використання цього полімеру для доставки ліків показує постійне зростання інтересу до клінічного застосування хітозану і є дуже перспективним напрямком у багатьох галузях медицини. Поєднання хітозану з іншими біоматеріалами або біоактивними молекулами для підвищення їхнього регенераційного потенціалу є перспективним і актуальним питанням сьогодення. Так, ми використали комбінацію остеотропного матеріалу з октакальційфосфатом з водорозчинною сіллю хітозан-ацетат з ампіциліном, що є комплексом для стимуляції загоєння ран. Ампіцилін в даному комплексі складає 1/10 від маси хітозану, а при додаванні оцтової кислоти знижується РН та підвищується розчинність. Ампіцилін – ампіциліну тригідрат має ши-

рокий спектр антимікробної дії. Активний щодо грампозитивних мікроорганізмів і ряду грамнегативних мікроорганізмів, що має значення з урахуванням широкого спектру мікрофлори ротової порожнини. Хітозан є носієм фармакологічних препаратів, отже забезпечує спрямовану доставку Ампіциліну безпосередньо у ділянку патологічного вогнища. ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін – комбінація даних компонентів сприяє диференціюванню та проліферації клітин, формуванню кісткової тканини, що є аналогічною до структури природної кістки з характерною протимікробною та протизапальною дією, що досягається зменшенням міграції нейтрофільних гранулоцитів та росту мікрофлори у післяопераційній ділянці.

Висновки

1. В експериментальній групі тварин, у яких пластику дефекту проводили з використанням матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін, спостігалось закономірне зростання відносного об'єму кісткової тканини в регенераті, яке за напрямком динаміки було схожим на таку в контрольній групі, проте за інтенсивністю змін значно перевершувало та випереджало контроль.

2. У глибоких зонах дефекту через 4 і 5 тижнів експерименту в регенераті виявлялися великі за площею маси грубоволокнистої кісткової тканини з посиленими явищами неоваскулогенезу, декомпактизовані залишки резорбованого матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін та скупчення поліморфних остеобластів у проміжках між остеогенними острівцями та гемокапілярами, що свідчить про ефективну регенерацію кісткової тканини в зоні дефекту на даному терміні у порівнянні з контролем.

3. На межі регенерату із зовнішньою кістковою пластинкою материнської кістки новоутворені остеони виявляли ознаки формування лакуно-каналцевих структур, а структура регенерату наближалася до нормальної будови кістки коміркового відростка через 8 тижнів після імплантації.

4. При використанні матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін відбувалось достовірне зростання відносного об'єму кісткової тканини в регенераті, що за інтенсивністю змін значно перевищувало контроль, а найбільша активність біорезорбції спостігалась у перші два тижні експерименту.

5. У динаміці змін відносного об'єму сполучної тканини протягом другого тижня відбувалось найбільш інтенсивне накопичення сполучнотканинного компонента регенерату – у 2,5 рази ($p < 0,05$) у порівнянні зі значенням першого тижня. Протягом 4-8-го тижнів експерименту спостігалась інтенсивна редукція сполучнотканинного компонента регенерату, виразність якої перевершувала контрольну динаміку.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження ультраструктурних особливостей процесу загоєння експериментальних дефектів кісткової тканини з використанням різних остеопластичних матеріалів дозволить розробити інноваційні методи лікування, які оптимізують регенерацію кісткової тканини в щелепно-лицевій ділянці та покращать її результати.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публі-

кації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках ініціативної НДР кафедри гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького: «Морфофункціональні та імуногістохімічні особливості тканин і органів в нормі та при патологічних станах» (номер державної реєстрації 0122U000168).

Літературні джерела

References

1. Xue N, Ding X, Huang R, Jiang R, Huang H, Pan X, et al. Bone tissue engineering in the treatment of bone defects. *Pharmaceuticals*. 2022;15:879. <https://doi.org/10.3390/ph15070879>
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 Suppl 2:S72-S77. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.07.040>
3. Aguilar A, Zein N, Harmouch E, Hafdi B, Bornert F, Offner D, et al. Application of chitosan in bone and dental engineering. *Molecules*. 2019;24(16):3009. <https://doi.org/10.3390/molecules24163009>
4. Dodero A, Scarfi S, Mirata S, Sionkowska A, Vicini S, Alloisio M, et al. Effect of crosslinking type on the physical-chemical properties and biocompatibility of chitosan-based electrospun membranes. *Polymers (Basel)*. 2021;13(5):831. <https://doi.org/10.3390/polym13050831>
5. Roffi A, Kon E, Perdiss F, Fini M, Di Martino A, Parrilli A, et al. A composite chitosan-reinforced scaffold fails to provide osteochondral regeneration. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2227. <https://doi.org/10.3390/ijms20092227>
6. Migliorini F, Cuzzo F, Torsiello E, Spiezia F, Oliva F, Maffulli N. Autologous bone grafting in trauma and orthopaedic surgery: an evidence-based narrative review. *J Clin Med*. 2021;10:4347. <https://doi.org/10.3390/jcm10194347>
7. Gillman CE, Jayasuriya AC. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2021;130:112466. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>
8. Hamada S, Mori Y, Shiwa Y, Hamai R, Tsuchiya K, Baba K, et al. Octacalcium phosphate/gelatin composite (OCP/Gel) enhances bone repair in a critical-sized transcortical femoral defect rat model. *Clin Orthop Relat Res*. 2022;480:2043–55. <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000002257>
9. Jeong C-H, Kim J, Kim HS, Lim S-Y, Han D, Huser AJ, et al. Acceleration of bone formation by octacalcium phosphate composite in a rat tibia critical-sized defect. *J Orthop Transl*. 2022;37:100–12. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2022.09.007>
10. Maliki S, Sharma G, Kumar A, Moral-Zamorano M, Moradi O, Baselga J, et al. Chitosan as a tool for sustainable development: A mini review. *Polymers (Basel)*. 2022;14(7):1475. <https://doi.org/10.3390/polym14071475>
11. Ke CL, Deng FS, Chuang CY, Lin CH. Antimicrobial actions and applications of chitosan. *Polymers (Basel)*. 2021;13(6):904. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>
12. Shah FA, Ruscsák K, Palmquist A. 50 years of scanning electron microscopy of bone – a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. *Bone Res*. 2019;7:15. <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0053-z>
13. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR, Ritchie NWM, Scott JHJ, Joy DC. Scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis. New York, NY: Springer New York; 2017. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>
14. Aesch E, Büchl-Zimmermann S, Burmester A, Dänhardt-Pfeiffer S, Desel C, Hamers C, et al. Romeis mikroskopische technik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2254-5>
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.
17. Paramita P, Ramachandran M, Narashiman S, et al. Sol-gel based synthesis and biological properties of zinc integrated nano bioglass ceramics for bone tissue regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(1):5. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06478-3>
18. Gómez-Barrena E, Padilla-Eguiluz N,

Rosset P, Gebhard F, Hernigou P, Baldini N, et al. Early efficacy evaluation of mesenchymal stromal cells (MSC) combined to biomaterials to treat long bone non-unions. *Injury*. 2020;51(1):S63-S73. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.02.070>

19. Yan Y, Cheng B, Chen K, Cui W, Qi J, Li X, Deng L. Enhanced osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by a functionalized silk fibroin hydrogel for bone defect repair. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(3):e1801043. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801043>

20. Pandini FE, Kubo FMM, Plepis AMdG, Martins VdCA, da Cunha MR, Silva VR, et al. In vivo study of nasal bone reconstruction with collagen, elastin and chitosan membranes in abstainer and alcoholic rats. *Polymers*. 2022;

14(1):188. <https://doi.org/10.3390/polym14010188>

21. Silva SK, Plepis AMG, Martins VDCA, Horn MM, Buchaim DV, Buchaim RL, et al. Suitability of chitosan scaffolds with carbon nanotubes for bone defects treated with photobiomodulation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12):6503. <https://doi.org/10.3390/ijms23126503>

22. European Pharmacopoeia. 10th ed. Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines Healthcare; Strasbourg, France: 2019.

23. The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia: The National Formulary. The United States Pharmacopeial Convention; Rockville, MD, USA: 2018.

Челпанова І.В. Ультроструктурне та морфометричне дослідження динаміки регенерації кісткової тканини при застосуванні комбінації октакальційфосфату з хітозаном і ампіциліном для остеопластики.

РЕФЕРАТ. Актуальність роботи полягає у дослідженні комплексного розуміння динаміки ремоделювання кісткової тканини після створення дефекту та подальшого заповнення остеопластичним матеріалом з використанням біоматеріалу хітозану- катіонного лінійного полісахариду. Незважаючи на вже відомі результати застосування остеопластичних матеріалів у клінічній практиці та унікальні властивості хітозану, його вплив на регенерацію кісток щелепно-лицевої ділянки, її механізми та динаміка залишаються не до кінця вивченими, потребують уточнення і деталізації. **Мета** – визначити динаміку гістоархітектурних перебудов кістково-керамічного регенерату після трансплантації октакальційфосфату у поєднанні з хітозаном та ампіциліном в експериментальний дефект нижньої щелепи кролика. **Методи.** Для дослідження використовували статевозрілих кроликів-самців віком 6-7 місяців, вагою 2,5-3 кг. 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 з октакальційфосфатом з додаванням хітозан-ацетату з ампіциліном (ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін). Контроль посттравматичного стану кісткової тканини в ділянці дефекту здійснювали впродовж 84 діб. Ультроструктурні зміни вивчали методом скануючої електронної мікроскопії. Для визначення змін складу регенерату використовували підрахунок трьох параметрів. Дані проаналізували за допомогою t-критерію Стьюдента, різницю при $p < 0,05$ визначили як статистично значущу. **Результати.** Дослідження особливостей рельєфу поверхні експериментального кісткового дефекту нижньої щелепи після імплантації матеріалу з октакальційфосфатом, хітозан-ацетатом та ампіциліном (ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін) дозволило виявити численні регенераційні зміни, що відбувалися після нанесення травми та корелювали з динамікою змін відносного об'єму кісткової тканини, остеопластичного матеріалу та сполучної тканини в регенераті. Морфометричне вивчення відносного об'єму складових компонентів регенерату експериментального дефекту дозволило встановити фазовий характер динаміки досліджуваних змін. Встановлено, що остеоцитарна лакуно-канальцева система, що утворювалась після імплантації матеріалу, демонструвала ознаки типової будови. Осередки незавершеного остеогенезу не візуалізувалися. У порівнянні з контрольною групою тварин, у зоні зовнішньої кісткової пластинки після застосування матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін остеони регенерату за своєю структурою та геометрією відповідали нормі кістки коміркового відростка нижньої щелепи. **Висновки.** Встановлено, що в експериментальній групі тварин, у яких пластику дефекту проводили з використанням матеріалу ОКФ-Н-Хітозан-Ампіцилін, спостерігалось активне збільшення відносного об'єму кісткової тканини в регенераті, яке за напрямком динаміки було схожим на таку в контрольній групі, проте за інтенсивністю змін значно перевершувало та випереджало контроль.

Ключові слова: кролики, нижня щелепа, зубощелепний апарат, кісткова тканина, регенерація, остеопластичні матеріали, хітозан, морфометрія, скануюча електронна мікроскопія.