

by the single intraperitoneal administration of streptozotocin (40 mg/kg) and nicotinic acid (1 mg/kg). The wound was formed by cutting out a piece of skin in the interscapular region. The studies were performed on the 7, 14 and 21 days after trauma. The sections were stained with hematoxylin-eosin. The light microscopy was performed using an Olympus BH-2 microscope (Japan), the planimetric analysis was performed using the morphometric program "Digimizer". The statistical analysis was performed using the SPSS-17 software package.

It has been found that the process of the skin regeneration of young rats with the chronic hyperglycemia is of the unfinished character and reveals as a violation of the epithelialization process, keratinization and reorganization of connective tissue into a full-fledged dermis. The main features of the process of post-traumatic skin regeneration of rats with chronic hyperglycemia are the prolongation of the reduction of wound area at the late study stages. On the 21 day of the experiment, the area of the non-healing wound in the young rats with the chronic hyperglycemia was equal to (50.43 ± 12.85) mm², which is 65.43 times more than the reference value ($p = 0,0001$). The wound healing rate in the rats with the chronic hyperglycemia was lower on the first days with the growth dynamics by the end of the study.

Key words: skin, wound, chronic hyperglycemia, planimetry.

*Рецензент – проф. Проніна О. М.
Стаття надійшла 12.10.2020 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2020-4-158-281-284

УДК 616-018+615.461+616.71-007.15+616-092.9

Пантус А. В., Рожко М. М., Ковальчук Н. Є., Пантус П. В.

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ОСТЕОКОНДУКТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВОЛОКНИСТОГО ПОЛІМЕРНОГО МАТРИКСУ ПРИ ЗАМІЩЕННІ КІСТКОВОГО ДЕФЕКТУ НА РІЗНИХ ТЕРМІНАХ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Івано-Франківський національний медичний університет (м. Івано-Франківськ)

kovalchuk-natalja@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Стаття є фрагментом НДР «Патогенетичне обґрунтування діагностики, лікування і реабілітації хворих на захворювання щелепно-лицевої ділянки запального та дистрофічного характеру з урахуванням стану кісткової тканини і вікового аспекту», № державної реєстрації 0114 U002666.

Вступ. Хірургічні стоматологічні втручання при таких патологіях, як кісти щелеп, хронічні остеомиєліти та парадонтити, часто передбачають застосування кістковопластичних матеріалів для відновлення кісткової тканини. Їхню роль виконує гранульований каркас на основі трикальцій-фосфату та гідроксиапатиту, проте все ж залишається істотною проблемою неможливість відновлення повноцінної по структурі кістки. У зв'язку з цим, у реконструктивній хірургії сформувався новий напрямок – тканинна інженерія, метою якої є відновлення біологічних функцій, тобто регенерація тканини, а не тільки заміщення її синтетичним матеріалом. Такий підхід дозволяє цілеспрямовано керувати структурно-функціональним станом клітин, які беруть участь в регенеративних процесах [1].

Одним із принципів створення тканинно-інженерного імплантату є розробка функціонального носія для клітин (матриці) на основі біосумісних біодеградуючих матеріалів. В якості перспективних матеріалів керованої регенерації тканин розглядаються як природні полімери (гіалуронова кислота, колаген, желатин, фібриноген, хітозан, пектини, агароза, альгінати, целюлоза, крохмаль, декстран, матрігель) так і синтетичні матеріали (полікапролактон, полілактид).

При створенні тканинно-інженерного імпланту важливе значення має надання матричному матеріалу складної тривимірної волокнистої каркасної структури (нетканний скаффолд) із високим відно-

шенням площі поверхні до загального об'єму, яка імітує міжклітинний тканинний матрикс. Існуючим на сьогодні перспективним методом синтезу волокнистого матриксу є електроспінінг [2].

В реконструктивній хірургії некротизуючих інфекційних процесів м'яких тканин тканинні імпланти використовуються одночасно і в якості локальних систем доставки протимікробних препаратів (антибіотиків, сульфадіазину срібла, нанооксидів металів) у зону пошкодження [3-10]. У практиці хірургічної стоматології подібні мікрволокнисті матеріали ще не знайшли широкого застосування. Сам електроспінінг як метод є дороговартісним та енергоємним. Крім того, в процесі синтезу мікро- та нановолокон таким методом, використовуються токсичні для живих клітин розчинники для полімерів. На даний час залишається актуальним більш дешевий та безпечний метод синтезу волокнистих матриксів та застосування імпрегнованих антибіотиками таких матриксних імплантів в хірургічній стоматології.

Мета дослідження. Експериментально оцінити характер регенерації дефекту кісткової тканини при імплантації біополімерного нетканного мікрволокнистого матриксу.

Об'єкт і методи дослідження. Для проведення досліджень було використано розроблений за нашою методикою волокнистий матрикс із гранул 100% чистого полікапролактону. Матрикс виготовляли методом фазового розділення полімеру. Діаметр волокон становив від 0,7 мкм до 10 мкм. Дані матрикси піддавались гамма стерилізації. Герметично запаковані в подвійну упаковку для стерилізації «Medicom» стандартизований EN 868-5, ISO 11140-1, ISO 11607-1 волокна рівномірно вкладались під електронний пучок з енергією частинок 4 мега електрон вольт (MeV) і протяжністю імпульсів 4,5 мікросекунд (мкс). Доза опромінення об'єкта згідно норм ста-

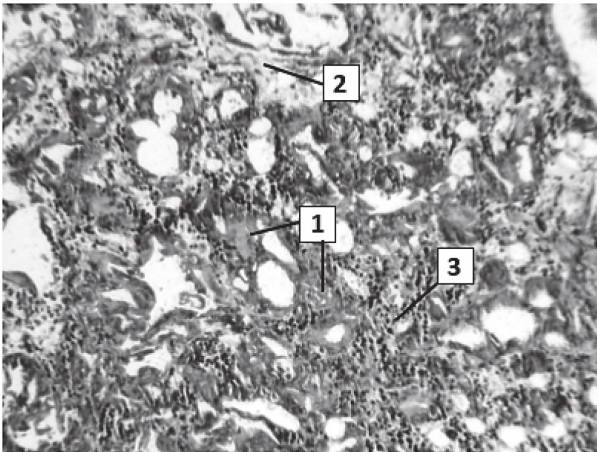


Рисунок 1 – Позитивно виражена експресія остеокальцину у вигляді ділянок коричневого кольору в зонах остеоїду (1), сполучнотканинні елементи (2), клітини сполучної тканини (3) на 1-й місяць після імплантації полімерного матриксу. Імуногістохімічне дослідження: антитіла до остеокальцину. Зб.: ок.10, об.20.

новила до 50 кґр. Обробка електронами з енергією менше 10 МеВ не викликає ядерних трансмутацій, тобто не призводить до виникнення радіоактивних ізотопів і не створювала залишкового радіаційного фону об'єкту.

Після стерилізації біополімерні матрикси хірургічним шляхом імплантувались в ділянку дефекту кісткової тканини лабораторних тварин. Дослідження проводилось на 50-ти кролях, які були поділені на 2 групи. Першій групі порівняння (25-тьом тваринам) проводилось оперативне втручання, яке включало формування дефекту в кістковій тканині. Другій групі (25-тьом тваринам) формувался дефект із наступною імплантацією в нього біополімерного матриксу. Для експерименту вибрана ділянка проксимальних виростків великогомілкових кісток. Забір матеріалу проводили на 1-й, 2-й, 3-й, 4-й та 5-й місяці. Фрагмент кістки відпилювали диском, відступаючи від країв дефекту із обох сторін по 3-4 мм. Всі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили з дотриманням правил відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей»

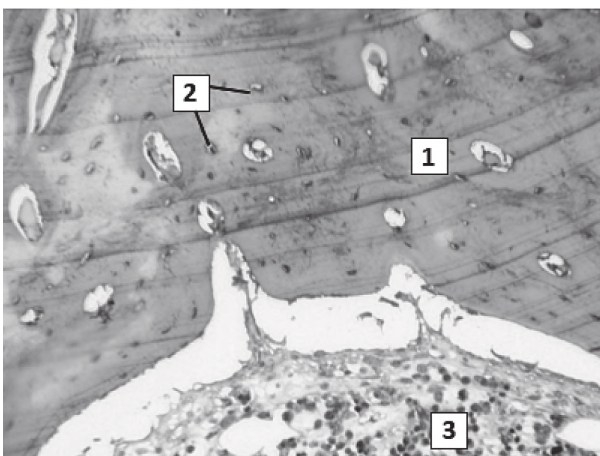


Рисунок 2 – Позитивна експресія остеопонтину в кістковому матриксі (1), остеобластах (2) та клітинних елементах кісткового мозку (3) на 3-й місяць після імплантації полімерного матриксу. Імуногістохімічне дослідження: антитіла до остеопонтину. Зб.: ок.10, об.40.

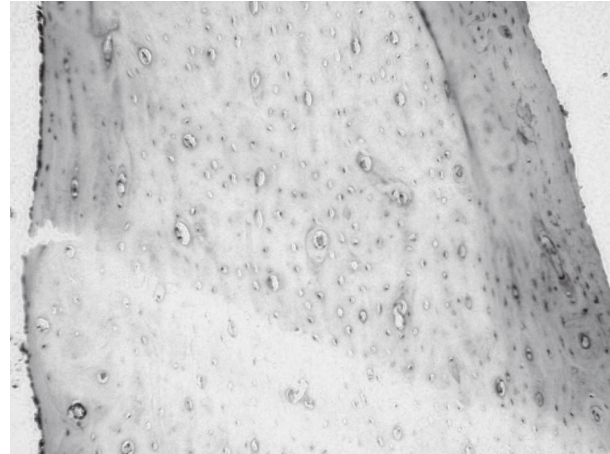


Рисунок 3 – Позитивна незначна експресія остеокальцину у кістковому матриксі мінералізованої кісткової тканини на 5-й місяць після імплантації полімерного матриксу. Імуногістохімічне дослідження: антитіла до остеокальцину. Зб.: ок.10, об.20.

[11]. Зрізи були інкубовані з первинними антитілами впродовж 12 годин при температурі 4°C з титром 1:800 для остеокальцину та 1:400 для остеопонтину.

Результати дослідження та їх обговорення. Свідченням активно перебігаючої репаративної регенерації кісткової тканини є вміст у ній остеокальцину та остеопонтину. Через 1 місяць після хірургічного втручання оптична щільність остеокальцину у зонах остеоїду була в середньому $132,73 \pm 11,43$ ум. Од (контроль – $151,32 \pm 11,06$ ум. Од) (рис. 1).

Експресія остеопонтину відзначалась у остеоїді, остеобластах, а також дифузно у фібробластах сполучної тканини та клітинах кісткового мозку, оптична щільність якого становила у середньому $157,79 \pm 6,08$ ум. Од (група контролю – $148,0 \pm 2,83$ ум. Од).

Денситометричне дослідження через 2 місяці після операції показало наростання експресії як остеопонтину, так і остеокальцину, оптична щільність яких відповідно становила $135,27 \pm 13,29$ ум. Од та $117,09 \pm 15,0$ ум. Од, що на 14,3% і 11,8% перевищує вміст даних маркерів у попередній групі та на 3,5% і 15,6% є більшим від контрольної групи відповідно $140,11 \pm 4,7$ ум. Од та $138,83 \pm 4,58$ ум. Од.

На 3 місяці також відмічалась позитивна дифузна рівномірна експресія остеокальцину у кістковому матриксі, що становила $150,56 \pm 3,21$ ум. Од оптичної щільності. Проте, у порівнянні із попереднім етапом експерименту, експресія даного маркера на 28,6% є меншою, але більшою на 7,6%, ніж у групі контролю ($162,9 \pm 4,25$ ум. Од). Так само як і остеокальцин, зменшилась на 17,1% експресія і остеопонтину, показник якого становив $158,46 \pm 8,5$ ум. Од. У порівнянні із контрольним показником $166,0 \pm 8,66$ ум. Од концентрація остеопонтину теж була більшою на 4,5% (рис. 2).

Згідно результатів імуногістохімічного дослідження, на 4 місяці експресія остеокальцину продовжувала зменшуватись до $163,56 \pm 3,4$ ум. Од, та є нижчою на 8,6% у порівнянні з 3 місяцем експерименту, але водночас незначно вищою на 1,2%, як у групі контролю $165,62 \pm 1,85$ ум. Од. Остеопонтин верифікувався у кістковому матриксі кальцинованої зрілої пластинчастої кісткової тканини, у острівцях остеоїду, а також у клітинних елементах кісткового мозку, та становив

в середньому $165,23 \pm 4,99$ ум. Од оптичної щільності, що є дещо меншим, ніж у експериментальній групі наприкінці 3 місяця досліджу. Так само, як і остеокальцин, остеопонтин незначно перевищував відповідний показник групи контролю $172,0 \pm 12,89$ ум. Од.

На 5 місяці у тварин експериментальної групи відзначається максимально виражена мінералізація та компактизація кісткової тканини при незначній оптичній щільності експресії остеокальцину й остеопонтину, які демонструють незначну диференціацію щодо контрольної групи тварин (рис. 3).

Це підтверджується денситометричними показниками, які вказують на незначну експресію у кістковому матриксі як остеокальцину ($172,0 \pm 12,89$ ум. Од), так і остеопонтину ($175,13 \pm 2,3$ ум. Од) (рис. 3). При цьому оптична щільність була дещо меншою при порівнянні з 4-м місяцем експерименту (5,1% та 5,9% відповідно для остеокальцину й остеопонтину) та практично не відрізнялась від показників групи контролю ($174,22 \pm 2,28$ та $175,64 \pm 3,41$ ум. Од відповідно).

На основі проведених імуногістохімічних досліджень встановлено посилення репаративного остеогенезу уже на ранніх стадіях (2-3 місяці) формування кісткової тканини, про що свідчили збільшення денситометричної оптичної щільності остеоіндуктивних маркерів, причому показники експериментальної

групи перевищують контрольні дані, що супроводжується збільшенням міцності (ймовірної міцності) репаративної тканини в зоні дефекту та прискорюють процеси наступної її компактизації.

Це, в свою чергу, свідчить про виражену каркасну функцію синтезованого нами полімерного мікрволокнистого матриксу. Тобто, група полімерних волокон створює своєрідну підложку для побудови на ній кісткової тканини.

Висновки

1. На всіх етапах формування кісткової тканини не відмічається негативного впливу полімерного мікрволокнистого матриксу на репаративний остеогенез.

2. Створений нами волокнистий матрикс завдяки своїй гігроскопічності та пористості створює своєрідний каркас для проростання тканин та формування кістки у місці дефекту у всіх напрямках.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження можуть бути спрямовані на вивчення клінічної ефективності імплантів з розроблених нами матриксних матеріалів, імпрегнованих антибіотиками. Потребує уточнення тривалість елюції імпрегнованих антибіотиків з різних матриксних матеріалів. Питанням далекої перспективи може бути розробка і вивчення нових матриксних матеріалів, здатних забезпечувати пролонговане вивільнення антибіотиків в тканини у ділянці їх інфекційного ураження.

Література

1. Sharma A, Faubion WA, Dietz AB. Regenerative Materials for Surgical Reconstruction: Current Spectrum of Materials and a Proposed Method for Classification. Mayo Clin. Proc. 2019;10(94):2099-116.
2. Conway J, Jacquemet G. Cell matrix adhesion in cell migration. Essays in Biochemistry. 2019;5(63):2012-9.
3. EUCAST Clinical breakpoints – bacteria (v 9.0) (1 Jan, 2019). Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
4. Markakis K, Faris AR, Sharaf H, Barzo Faris, Rees S, Bowling FL. Local Antibiotic Delivery Systems: Current and Future Applications for Diabetic Foot Infections. Int. J. Lower Extremity Wounds. 2018;1(17):14-21.
5. Marson BA, Deshmukh SR, Grindlay DJC, Ollivere BJ, Scammell BE. A systematic review of local antibiotic devices used to improve wound healing following the surgical management of foot infections in diabetics. Bone Joint Journal. 2008;11(100):1409-15.
6. Garvin K, Feschuk C. Polylactide-polyglycolide antibiotic implants. Clin. Orthop. Relat. Res. 2005;437:105-10.
7. Suchý T, Šupová M, Klápková E. The release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility of differently prepared collagen/hydroxyapatite/vancomycin layers: Microstructure vs. Nanostructure. Eur. J. Pharm. Sci. 2017;100:219-29.
8. Nishimura J, Nakajima K, Souma Y. The possibility of using fibrin-based collagen as an antibiotic delivery system. Surg. Today. 2013;2(43):185-90.
9. Costa Almeida CE, Reis L, Carvalho L, Costa Almeida CM. Collagen implant with gentamicin sulphate reduces surgical site infection in vascular surgery: A prospective cohort study. Int. J. Surg. 2014;10(12):1100-4.
10. Rapetto F, Bruno VD, Guida G, Marsico R, Chivasso P, Zebebe C. Gentamicin-Impregnated Collagen Sponge: Effectiveness in Preventing Sternal Wound Infection in High-Risk Cardiac Surgery. Drug Target Insights. 2016;1(10):9-13.
11. Poriadok provedennia naukovyvy ustanovamy doslidiv, eksperymentiv na tvarynakh. Ofitsiinyi visnyk Ukrainy. Ofits. vyd. 2012;24:82. [in Ukrainian].

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ОСТЕОІНДУКТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВОЛОКНИСТОГО ПОЛІМЕРНОГО МАТРИКСУ ПРИ ЗАМІЩЕННІ КІСТКОВОГО ДЕФЕКТУ НА РІЗНИХ ТЕРМІНАХ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Пантус А. В., Рожко М. М., Ковальчук Н. Є., Пантус П. В.

Резюме. Завданням реконструктивної хірургії та тканинної інженерії є виділення, проліферація та диференціація клітин, побудова матриць або систем доставки, підтримка, координація, регенерація тканин у трьох вимірах. На сьогодні в хірургічній стоматологічній практиці роль матриксів виконують гранульовані каркаси на основі трикальцій-фосфату та гідроксиапатиту, проте все ж залишається істотною проблемою відновлення повноцінної структури кісткової тканини. Одним із перспективних напрямків є застосування мікрволокнистих каркасів як підложки для регенерації кісткової тканини. *Мета дослідження* – експериментально оцінити характер регенерації дефекту кісткової тканини при імплантації біополімерного нетканного мікрволокнистого матриксу. Для проведення досліджень було використано розроблений за нашою методикою волокнистий матрикс із гранул 100% чистого полікапролактону. Діаметр волокон становив від 0,7 мкм до 10 мкм. Дані матрикси піддавались гамма стерилізації. Дослідження проводилось на 50-ти кролях, які були поділені на 2 групи. Першій групі порівняння (25-тьом тваринам) проводилось оперативне втручання, яке включало формування дефекту в кістковій тканині. Другій групі (25-тьом тваринам) формувался дефект із наступною імплантацією в нього біополімерного матриксу. Збір матеріалу проводили на 1-й, 2-й, 3-й, 4-й та 5-й місяці. Зрізи були інкубовані з первинними антитілами впродовж 12 годин при температурі 4°C з титром 1:800 для остеокальцину та 1:400 для остеопонтину. На основі імуногістохімічних досліджень встановлено посилення репаративного остеогенезу уже на ранніх стадіях (2-3 місяці) формування кісткової тканини, про що свідчило збільшення денситометричної оптичної щільності остеоіндуктивних маркерів. Показники

експериментальної групи перевищували контрольні дані, що вказувало на збільшення міцності репаративної тканини в зоні дефекту та на прискорення процесів компактизації кістки. Це, в свою чергу, свідчить про виражену каркасну функцію синтезованого нами полімерного мікрОВОЛОКНИСТОГО МАТРИКСУ. Таким чином, група полімерних волокон створює своєрідний субстрат для побудови на ньому тканин, зокрема кісткової тканини.

Ключові слова: біополімер, матрикс, остеокальцин, остеопонтин.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОСТЕОКОНДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВОЛОКНИСТОГО ПОЛИМЕРНО-ГО МАТРИКСА ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ КОСТНОГО ДЕФЕКТА НА РАЗНЫХ СРОКАХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Пантус А. В., Рожко Н. Н., Ковальчук Н. Е., Пантус П. В.

Резюме. Задачей реконструктивной хирургии и тканевой инженерии является выделение, пролиферация и дифференциация клеток, построение матриц или систем доставки, поддержка, координация, регенерация тканей в трех измерениях. На сегодняшний день в хирургической стоматологической практике роль матрикса выполняют гранулированные каркасы на основе трикальций-фосфата и гидроксиапатита, но все же остается существенной проблемой восстановления полноценной структуры костной ткани. Одним из перспективных направлений является применение микроволоконистых каркасов как подложки для регенерации костной ткани. *Цель исследования* – экспериментально оценить характер регенерации дефекта костной ткани при имплантации биополимерного нетканого микроволоконистого матрикса. Для проведения исследований был использован и разработан по нашей методике волоконистый матрикс из гранул 100% чистого поликапролактона. Диаметр волокон составлял от 0,7 мкм до 10 мкм. Данные матриксы подвергались гамма стерилизации. Исследование проводилось на 50-ти кроликах, которые были разделены на 2 группы. Первой группе сравнения (25-ти животным) проводилось оперативное вмешательство, которое включало формирование дефекта в костной ткани. Второй группе (25-ти животным) формировался дефект с последующей имплантацией в него биополимерного матрикса. Забор материала проводили на 1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 5-й месяцы. Срезы были инкубированные с первичными антителами в течение 12 часов при температуре 4°C с титром 1:800 для остеокальцина и 1:400 для остеопонтина. На основании проведенных иммуногистохимических исследований установлено усиление репаративного остеогенеза уже на ранних стадиях (2-3 месяца) формирования костной ткани, о чем свидетельствовало увеличение денситометрической оптической плотности остеоиндуктивных маркеров. Показатели экспериментальной группы превышали контрольные данные, что указывало на увеличение прочности репаративной ткани в зоне дефекта и на ускорение процессов компактизации кости. Это, в свою очередь, свидетельствует о выраженной каркасной функции синтезированного нами полимерного микроволоконистого матрикса. Таким образом, группа полимерных волокон создает своеобразный субстрат для построения на нем тканей, в частности костной ткани.

Ключевые слова: биополимер, матрикс, остеокальцин, остеопонтин.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF OSTEOCONDUCTIVE PROPERTIES OF FIBER POLYMER MATRIX AT BONE DEFECT RECONSTRUCTION ON DIFFERENT TERMS IN EXPERIMENT

Pantus A. V., Rozhko M. M., Kovalchuk N. E., Pantus P. V.

Abstract. The challenge for reconstructive surgery and tissue engineering is to optimize cell isolation, proliferation, and differentiation, to construct matrices or delivery systems, and to support, coordinate, tissue regeneration in three dimensions. Today in surgical dental practice the role of matrices is performed by granular matrix based on tricalcium-phosphate and hydroxyapatite, but still the inability to restore a complete bone structure remains a significant problem. One of the promising ways are the use of microfiber frames for bone tissue regeneration. *The purpose of our study* is to experimentally evaluate the nature of bone regeneration of the defect during implantation of a biopolymer nonwoven microfiber matrix. The study was performed on 50 laboratory animals (rabbits), which were divided into 2 groups. The first comparison group: 25 animals underwent surgery, which included the formation of a defect in the bone tissue. The second group: 25 animals developed a bone defect with subsequent implantation of a biopolymer matrix. The fibrous matrix made of 100% pure polycaprolactone granules developed by our method, which was made by phase separation of the polymer, was used for the research. The fiber diameter ranged from 0.7 μm to 10 μm . These matrices were subjected to gamma sterilization. Material collection was performed on the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th months. The sections were incubated with primary antibodies for 12 hours at 4°C with a titer of 1:800 for osteocalcin and 1:400 for osteopontin. On the basis of immunohistochemical studies, increased reparative osteogenesis was established in the early stages (2-3 months) of the bone generation, which was confirmed by the increase in densitometric optical density of osteoinductive markers. The experimental group exceeds the control data, accompanied by increased strength (probable strength) of tissues in the area of defect and accelerate the processes of its subsequent compaction. This indicates a pronounced framework function of the polymeric microfiber matrix synthesized by us. Thus, a group of polymer fibers creates a kind of substrate for the construction of tissues on it, in particular bone tissue.

Key words: biopolymer, matrix, osteocalcin, osteopontin.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 28.09.2020 року*