

МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАМІЩЕННЯ КІСТКОВИХ ДЕФЕКТІВ ТКАНИННИМИ ЕКВІВАЛЕНТАМИ НА ОСНОВІ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН У СТОМАТОЛОГІЇ

А.В. Бамбуляк, С.В. Ткачик, О.Ю. Гаген, Я.В. Горицький

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м.Чернівці, Україна

Ключові слова:

мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини, кісткові балки, сполучна тканина, об'ємна частка судин.

Буковинський медичний вісник. Т.24, № 1 (93). С. 18-27.

DOI:

10.24061/2413-0737.XXIV.1.93.2020.3

E-mail:bambuljak.

andrij@bsmu.edu.ua

Резюме. Кісткова тканина є доволі динамічною тканиною, яка вирізняється здатністю до відновлення після травми без рубцювання. Диференціація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) в остеобласти при цьому відіграє вирішальну роль у регенерації і ремоделюванні кістки. Отримані з жирової тканини ММСК вважаються адекватним джерелом для тканинної інженерії кісток через їх здатність до остеогенної диференціації. Ефективність остеогенного диференціювання різних ММСК людини продемонстрована при заселенні ними біосумісних полімерних матриксів. При цьому виявлено, що ММСК, отримані з жирової тканини, продемонстрували велику ефективність диференціювання в остеобласти. Ці клітини зазвичай трансплантують у тривимірні пористі скаффолди, котрі забезпечують необхідне позаклітинне середовище, яке містить фізичні та хімічні сигнали для розвитку і регенерації тканини.

Мета дослідження — проаналізувати результати морфометричного дослідження задля визначення ефективності застосування тканинних еквівалентів кісткової тканини на основі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини в стоматологічній практиці.

Матеріал і методи. Експеримент проведений на щурах лінії Вістар, масою 200–250 грамів, які були розподілені на VI груп. Модель кісткового дефекту формували в тім'яній ділянці черепа щурів. В утворений дефект імплантували заготовлений матеріал. Морфометричні дослідження були проведені відповідно до принципів системного кількісного аналізу (Автандилов Г.Г., 2002). Для цього використовували автоматичну систему обробки зображень „Видеотест-Морфо 3.0” (Росія), яка містить бінокулярний дослідницький мікроскоп „Биолам”, аналого-цифровий перетворювач, комп'ютер із принтером високороздільної кольорової здатності і програмне забезпечення. У регенераті морфометрично з'ясовували об'ємні частки (Оч, мкм³/мкм³) сполучної тканини, судин і кісткових балок, а також чисельну щільність клітинних елементів (1/мкм³). Отримані результати опрацьовано методами статистичного аналізу.

Результати. Через три місяці експерименту спостерігали виразні кількісні позитивні зміни в будові регенератів у ділянці дефекту черепа експериментальних тварин. Так, у тварин IV і VI груп об'ємна частка кісткових балок у регенератах зросла до 43,90±1,68%, p1 — p2<0,01 та до 45,10±1,74%, p1, p2, p4<0,01, відповідно, та дорівнювала даним у щурів контрольної групи. Визначалося зменшення Оч сполучної тканини в регенератах кісткової тканини піддослідних щурів, при мінімальних значеннях цього параметра в IV та VI експериментальних групах: 12,45±2,20% та 10,00±2,15%, p1<0,05, p4<0,01, відповідно, p>0,05. На 90-ту добу спостережень спостерігалось суттєве зниження об'ємної частки судин, яка у IV та VI групах зі значеннями 7,44±0,82% та 6,15±0,90%, p2<0,01, відповідно, дорівнювала даним у щурів контрольної групи, p>0,05. У тварин VI групи, де для відновлення кісткового дефекту використовувалась комбінація ММСК-ЖТ + ЗТП +

„Колапан” визначали максимальне збільшення: кількості остеобластів та остеоцитів, кількості остеокластів на тлі зменшення фібробластів і фіброцитів. Досить суттєвою була нормалізація чисельної щільності клітинних елементів у щурів IV групи, де заміщення кісткового дефекту відбувалось за впливу комбінації ММСК-ЖТ + ЗТП. При цьому у тварин даної групи кількість остеокластів ($p1 < 0,05$), фібробластів і фіброцитів дорівнювала таким в інтактних тварин I групи ($p > 0,05$), при меншій чисельній кількості у 1,2 раза остеобластів та остеоцитів, $p < 0,05$, $p1 - p2 < 0,01$.

Висновки. На модельних дефектах кісткової тканини черепа щурів за результатами морфометричних досліджень доведена доцільність досліджуваних імплантів для використання, особливо при поєднанні ММСК-ЖТ + ЗТП та ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”, які забезпечували повне закриття дефекту за 90 діб.

Ключевые слова:

мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, костные балки, соединительная ткань, объемная доля сосудов.

Буковинский медицинский вестник. Т.24, № 1 (93). С. 18-27.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ ТКАНЕВЫМИ ЭКВИВАЛЕНТАМИ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СТОМАТОЛОГИИ

А.В. Бамбуляк, С.В. Ткачик, Е.Ю. Гаген, Я.В. Горицкий

Резюме. Костная ткань является довольно динамичной тканью, которая отличается способностью к восстановлению после травмы без рубцевания. Дифференциация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в остеобласты при этом играет решающую роль в регенерации и ремоделировании кости. Полученные из жировой ткани ММСК считаются адекватным источником для тканевой инженерии костей из-за их способности к остеогенной дифференциации. Эффективность остеогенной дифференцировки различных ММСК человека была продемонстрирована при заселении ими биосовместимых полимерных матриц. При этом было обнаружено, что ММСК, полученные из жировой ткани, продемонстрировали большую эффективность дифференцировки в остеобласты. Эти клетки обычно трансплантируют в трехмерные пористые скаффолды, которые обеспечивают необходимое внеклеточную среду, которое содержит физические и химические сигналы для развития и регенерации ткани. **Цель исследования** — проанализировать результаты морфометрического исследования для определения эффективности применения тканевых эквивалентов костной ткани на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани в стоматологической практике.

Материал и методы. Эксперимент был проведен на крысах линии Вистар, массой 200–250 грамм, которые были разделены на VI групп. Модель костного дефекта формировали в теменной области черепа крыс. В образованный дефект имплантировали заготовленный материал. Морфометрические исследования были проведены в соответствии с принципами системного количественного анализа (Автандилов Г.Г., 2002). Для этого использовали автоматическую систему обработки изображений „Видеотест-Морфо 3.0” (Россия), которая содержит бинокулярный исследовательский микроскоп „Биолам”, аналого-цифровой преобразователь, компьютер с принтером высокораздельной цветной способности и программное обеспечение. В регенерате, с помощью морфометрических методов выясняли объемные доли (Од, мкм³/мкм³) соединительной ткани, сосудов и костных балок, а также численность плотность клеточных элементов (1/мкм³). Полученные результаты обработаны статистически.

Оригінальні дослідження

Результаты. Через три месяца наблюдений наблюдали выразительные количественные положительные изменения в строении регенератов в области дефекта черепа экспериментальных животных. Так, у животных IV и VI групп объемная доля костных балок в регенератах выросла до $43,90 \pm 1,68\%$, $p_1 - p_2 < 0,01$ и в $45,10 \pm 1,74\%$, $p_1, p_2, p_4 < 0,01$, а соответственно и равнялась данным у крыс контрольной группы. Определялось уменьшение ОД соединительной ткани в регенератах костной ткани подопытных крыс, при минимальных значениях этого параметра в IV и VI экспериментальных группах: $12,45 \pm 2,20\%$ и $10,00 \pm 2,15\%$, $p_1 < 0,05$, $p_4 < 0,01$, соответственно, $p > 0,05$. На 90-е сутки наблюдений наблюдалось существенное снижение объемной доли сосудов, которая в IV и VI группах со значениями $7,44 \pm 0,82\%$ и $6,15 \pm 0,90\%$, $p_2 < 0,01$, соответственно, равна данным у крыс контрольной группы, $p > 0,05$. У животных VI группы, где для восстановления костного дефекта использовалась комбинация ММСК-ЖТ + ОТП + „Колапан” определяли максимальное увеличение: количества остеобластов и остеоцитов, количества остеокластов на фоне уменьшения фибробластов и фиброцитов. Весьма существенной была нормализация численной плотности клеточных элементов у крыс IV группы, где замещения костного дефекта происходило за влияния комбинации ММСК-ЖТ + ОТП. При этом, у животных данной группы количество остеокластов, $p_1 < 0,05$ и фибробластов и фиброцитов равна данным в интактных животных I группы, $p > 0,05$, в 1,2 раза меньше в численном количестве остеобластов и остеоцитов, $p < 0,05$ $p_1 - p_2 < 0,01$.

Выводы. На модельных дефектах костной ткани черепа крыс по результатам морфометрических исследований доказана пригодность исследуемых имплантов для использования, особенно при сочетании ММСК-ЖТ + ОТП и ММСК-ЖТ + ОТП + „Колапан”, которые обеспечивали полное закрытие дефекта за 90 суток.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, bone beams, connective tissue, volume fraction of vessels.

Bukovinian Medical Herald. V.24, № 1 (93). P. 18-27.

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF BONE DEFECT SUBSTITUTION WITH FABRIC EQUIVALENTS OF BONE TISSUE ON THE BASIS OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN DENTISTRY

A.V. Bambuliak, S.V. Tkachyk, O.Y. Gagen, Y.V. Goritsky

Abstract. Bone tissue is a rather dynamic tissue that has the ability to recover from injury without scarring. The differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) into osteoblasts plays a crucial role in bone regeneration and remodeling. MMSC derived from adipose tissue are considered to be an adequate source for bone tissue engineering because of their capacity for osteogenic differentiation. The effectiveness of osteogenic differentiation of different human MMSC has been demonstrated in the settlement of biocompatible polymer matrices. It was found that MMSC derived from adipose tissue showed a high efficiency of differentiation into osteoblasts. These cells are typically transplanted into three-dimensional porous scaffolds that provide the necessary extracellular environment that contains physical and chemical signals for tissue development and regeneration.

The aim of the study: to analyze the results of morphometric studies to determine the effectiveness of the use of tissue equivalents of bone tissue based on multipotent mesenchymal stromal fat cells in dental practice.

Material and methods. The experiment was conducted on the Wistar line rats, weighing 200–250 grams, which were divided into VI groups. A bone defect model was formed in the parietal section of the skull of rats. The formed defect implanted the harvested material. Morphometric studies were performed in

accordance with the principles of systematic quantitative analysis (Avtandilov GG, 2002). To do this, we used the automatic image processing system „Videotest-Morpho 3.0” (Russia), which contains a binocular research microscope „Biolam”, an analog-to-digital converter, a computer with a high-resolution color printer and software. In the regenerate, the volume particles (V_p , $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) of connective tissue, vessels and bone beams, as well as the numerical density of cellular elements ($1/\mu\text{m}^3$) were determined using morphometric methods. The obtained results are processed statistically.

Results. After 3 months of observations, clear quantitative positive changes in the structure of the regenerates were observed in the skull defect area of the experimental animals. Thus, in animals of groups IV and VI the volume fraction of bone beams in regenerates increased to $43,90 \pm 1,68\%$, $p_1 - p_2 < 0,01$ and to $45,10 \pm 1,74\%$, $p_1, p_2, p_4 < 0,01$, respectively, was equal to that in control rats. A decrease in the connective tissue volume fraction was observed in the bone tissue regenerators of the experimental rats, with the minimum values of this parameter in the IV and VI experimental groups: $12,45 \pm 2,20\%$ and $10,00 \pm 2,15\%$, $p_1 < 0,05$, $p_4 < 0,01$, respectively, $p > 0,05$. On the 90th day of observation there was a significant decrease in the volume fraction of vessels, which in the IV and VI groups with values $7,44 \pm 0,82\%$ and $6,15 \pm 0,90\%$, $p_2 < 0,01$, respectively, was equal to the data in rats of the control group, $p > 0,05$. In animals of group VI, where the combination of MMSC-AT + PRP + Kolapan was used to repair the bone defect, the maximum increase was determined: the number of osteoblasts and osteocytes, the number of osteoclasts against the background of reduction of fibroblasts and fibrocytes. The normalization of cellular element cell density in group IV rats, where bone defect replacement occurred due to the combination of MMSC-AT + PRP, was quite significant. At the same time, in the animals of this group the number of osteoclasts, $p_1 < 0,05$ and fibroblasts and fibrocytes was equal to the data in intact animals of the first group, $p > 0,05$, with 1,2 times smaller number of osteoblasts and osteocytes, $p > 0,05$ $p_1 - p_2 > 0,01$.

Conclusions. Therefore, by the results of morphometric studies on the model defects of the skull bone of rats proved the suitability of the investigated implants for use, especially with the combination of MMSC-AT + PRP and MMSC-AT + PRP + Kolapan, which provided complete closure of the defect in 90 days.

Вступ. Кісткова тканина є доволі динамічною тканиною, яка відрізняється здатністю до відновлення після травми без рубцювання [1]. Диференціація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) в остеобласти відіграє вирішальну роль у регенерації і ремоделюванні кістки. Отримані з жирової тканини ММСК вважаються адекватним джерелом для тканинної інженерії кісток завдяки здатності до остеогенної диференціації [2]. Ефективність остеогенного диференціювання різних ММСК людини продемонстрована при заселенні ними біосумісних полімерних матриксів. При цьому виявлено, що ММСК, отримані з жирової тканини, продемонстрували високу ефективність диференціювання в остеобласти [3]. Ці клітини зазвичай трансплантують у тривимірні пористі скаффолди, котрі забезпечують необхідне позаклітинне середовище, яке містить фізичні та хімічні сигнали для розвитку і регенерації тканини [4]. Незважаючи на те, що протягом багатьох років розроблялися стратегії, засновані на різних типах біоматеріалів і стовбурових клітин,

сучасна тканинна інженерія не знайшла широкого застосування в клінічних умовах [5, 6]. Для досягнення цієї мети потрібне глибоке розуміння нормальних фізіологічних процесів розвитку тканин і механізмів, що лежать в основі взаємодії між ММСК і біоматеріалами під час тканиноутворення [7]. Біоматеріали відіграють вирішальну роль при створенні тканинної інженерної конструкції [8]. Матеріал повинен мати можливість зберігати свою структуру і цілісність протягом передбачуваних періодів часу для забезпечення нового формування та дозрівання тканин навіть в умовах навантаження [9, 10]. Отже, ММСК відіграють важливу роль у процесі регенерації кістки як шляхом регулювання утворення остеокластів, так і негативного впливу на ефектори запалення і остекластогенез [11]. ММСК мають здатність регенерувати мезенхімальні тканини, регулювати метаболізм кісток і модулювати запалення, що робить їх привабливими кандидатами для клітинних технологій у регенеративній медицині [12].

Мета дослідження. Проаналізувати результати

Оригінальні дослідження

морфометричного дослідження задля визначення ефективності застосування тканинних еквівалентів кісткової тканини на основі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини в стоматологічній практиці.

Матеріал і методи. Експеримент проведений на щурах лінії Вістар, масою 200–250, які були розподілені на VI груп: I група (контрольна) — 15 інтактних тварин; II група (порівняльна) — 22 щури, у яких відновлення дефекту проходило під кров'яним згустком; III група (25 тварин) — відновлення кісткового дефекту при застосуванні ММСК-ЖТ, що пройшли остеогенне диференціювання (ОД); IV група (28 тварин) — відновлення кісткового дефекту за допомогою ММСК-ЖТ з

ОД + збагачена тромбоцитами плазма (ЗТП); V група (27 тварин) — відновлення кісткового дефекту за допомогою ММСК-ЖТ з ОД + „Колапан”; VI група (28 тварин) — відновлення кісткового дефекту за допомогою тканинного еквіваленту кісткової тканини (ТЕК), що містив ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”. Модель кісткового дефекту формували в тім'яній ділянці черепа щурів. У подальшому, в утворений дефект імплантували заготовлений матеріал (5 x 5 мм). З експерименту щурів виводили передозуванням наркозу нембуталу в дозах 30–50 мг/кг маси у такі терміни: 1, 2, 3 місяці.

Морфометричні дослідження [13] були проведені відповідно до принципів системного кількісного аналізу (Автанділов Г. Г., 2002). Для цього використовували ав-

Таблиця 1
Кількісні показники будови регенератів у ділянці дефекту черепа в експериментальних тварин на 30-ту добу експерименту

Показники	I група (контроль)	II група (порівняльна)	III група (ММСК-ЖТ з ОД)	IV група (ММСК-ЖТ + ЗТП)	V група (ММСК-ЖТ+ „Колапан”)	VI група (ММСК-ЖТ+ЗТП+ „Колапан”)
Об'ємна частка, %						
Кісткові балки	46,2± ±2,50	7,70± ±1,15°	13,40± ±1,20°, *	16,90± ±1,30°, *	9,20± ±1,15 °, ■, Δ	18,5± ±1,40 °, *, ■, Δ, ◇
Сполучна тканина	9,20± ±0,80	55,20± ±4,10°	42,10± ±2,80 °, **	34,80± ±2,25 °, *	40,50± ±2,75 °, **	27,30± ±2,20 °, *, ■, Δ, ◇
Судини	5,7± ±0,50	15,20± ±1,15°	19,15± ±1,15 °, **	20,50± ±1,10 °, *	17,45± ±1,10 °, ΔΔ	22,40± ±1,00 °, *, ■, Δ, ◇
Чисельна щільність клітинних елементів (на 1/мкм ³)						
Остеобласти і остеоцити	5523± ±301,0	295,0± ±29,00°	524,0± ±42,00 °, *, ■	645,0± ±54,00 °, *	426,0± ±38,00 °, **, ΔΔ	728,0± ±82,00 °, *, ■, Δ, ◇
Остеокласти	325,0± ±24,0	84,0± ±19,0°	128,0± ±28,0°	190,0± ±32,00 °, **	142,0± ±34,00°	225,0± ±25,00 °, *, ■
Фібробласти і фіброцити	670,0± ±75,0	3,240± ±93,0°	2820± ±83,0°, *	1.250± ±62,00 °, *, ■	2.400± ±72,0 °, *, ■, Δ	892,0± ±59,00 °, *, ■, Δ, ◇

Примітки:

1. °p<0,01; °°p<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних контрольної (I) групи
2. *p1<0,01; **p1<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних II групи
3. ■p2<0,01; ■■p2<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних III групи
4. Δp3<0,01; ΔΔp3<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних IV групи
5. ◇p4<0,01; ◇◇p4<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних V групи

томатичну систему обробки зображень „Видеотест-Морфо 3.0” (Росія), яка містить бінокулярний дослідницький мікроскоп „Биолам”, аналого-цифровий перетворювач, комп’ютер із принтером високороздільної кольорової здатності і програмне забезпечення. У регенерації за допомогою морфометричних методів з’ясовували об’ємні частки (Оч, мкм³/мкм³) сполучної тканини, судин і кісткових балок, а також чисельну щільність клітинних елементів (1/мкм³).

Статистичне обчислення цифрових значень здійснювали на комп’ютері за стандартними статистичними методами, на основі яких були опрацьовані алгоритми обчислення введених у таблиці значень (операційна система Linux, база даних MySQL, мова програмування Perl).

Результати дослідження та їх обговорення. При проведенні морфометричних досліджень на 30-ту добу експерименту встановлено, що загоєння кісткових дефектів у щурів характеризується певною стадійністю, яка об’єктивізувалась при аналізі об’ємних частин основних компонентів регенерату і щільності його клітинних елементів (табл. 1).

У результаті проведених досліджень встановлено, що на 30-ту добу досліджень об’ємна частка (ОЧ) кісткових балок у регенератах кісткової тканини тварин груп дослідження була невеликою. При цьому найменша ОЧ кісткових балок реєструвалась у тварин II та V груп (7,70±1,15% та 9,20±1,15%, відповідно, p<0,01), що на 83,3% та на 80,0% менше, відповідно, даних у інтактних тварин I групи. У той же час, у представників інших піддослідних груп ОЧ кісткових балок була дещо вище, однак залишалась вірогідно нижчою стосовно даних у інтактних тварин I групи: у III групі — на 71%, p, p1<0,01, у IV групі — на 63,42%, у VI групі — на 60,0%, p, p1, p4<0,01, p2<0,05.

Привертало увагу те, що в даний термін спостережень у регенератах кісткової тканини експериментальних тварин превалювала сполучна тканина, об’ємна частка якої була досить високою у тварин II групи — у 6,0 раза, p<0,01, у III групі — у 4,6 раза, p, p1<0,01 та в V групі — у 4,4 раза, p<0,01, p1<0,01, стосовно даних у щурів I групи. Найнижчі значення цього параметра, які були в 3,8 раза та в 3,0 раза нижче даних у контрольній групі, реєструвались у щурів IV, p, p1<0,01, та VI дослідних груп, p, p1, p2, p4<0,01, p3<0,05.

Об’ємна частка судин у регенератах кісткової тканини була вірогідно вище у тварин усіх груп дослідження стосовно даних у щурів I групи, p<0,01 і характеризувалась максимальними значеннями у VI групі — 22,40±1,15%, p, p1, p4<0,01, p2<0,05 та у IV групі — 20,50±1,10%, p, p1<0,01. Водночас, найменша ОЧ судин визначалась у щурів V групи — 17,15±1,10%, p<0,01, p3<0,05 та у II групі — 15,20±1,00%, p<0,01.

Через 30 діб спостережень у кісткових регенератах визначали порушення кісткової регенерації, що підкреслювалось зниженням кількості остеобластів і остеокластів у зразках, котрі вивчались. Особливо ця тенденція виражена у тварин II групи, де загоєння

кісткового дефекту відбувалось під кров’яним згустком та у V групі, при імплантації у кістковий дефект ММСК-ЖТ + „Колапан”. При цьому у даних групах визначали в 1 мкм³ до 295,00±29,0, (p<0,01) та 426,00±38,0 остеобластів (p<0,01, p1, p3<0,05) та 84,0±19,0 (p<0,01) та 142,0±34,0 остеокластів, (p<0,01), відповідно. Значно більше візуалізували остеобластів та остеокластів 1 мкм³ у кісткових регенератів тварин інших груп: 524,0±42,0, p, p1<0,01 та 128,0±28,0, p<0,01, відповідно, у III групі; 645,0±54,0, p, p1<0,01, відповідно, у IV групі; 728,0±82,0, p, p1, p4<0,01, p2<0,05 та 225,0±25,0, p, p2<0,05, p1<0,01 у VI піддослідній групі. У даний термін досліджень привертало увагу наявність великої кількості в 1 мкм³ кісткового регенерату піддослідних тварин фібробластів і фіброцитів, з найбільшими значеннями у тварин II групи — 3,240±93,0, p<0,01, III групи — 2,820±83,0, p, p1<0,01 та V групи — 2,400±72,0, p–p3<0,01. При цьому у піддослідних щурів IV та VI груп вміст фібробластів і фіброцитів у кістковому регенераті був у 1,9 раза, (p–p2<0,05) та 1,3 раза, (p1–p4<0,01, p<0,05), більше стосовно даних у інтактних щурів I групи.

За даними морфометричних досліджень встановлено, що на 60-ту добу спостережень у регенератах кісткової тканини черепа піддослідних тварин визначалось збільшення ОЧ кісткових балок (таблиця 2). При цьому найменше зростання ОЧ кісткових балок спостерігали у регенератах кістки черепа тварин II та V піддослідних груп, яке було у 3,0 раза та у 2,5 раза, (p2, p3<0,01), відповідно, менше стосовно даних у інтактних щурів I групи, (p<0,01). У щурів III, IV та VI експериментальних груп ОЧ кісткових балок була в 1,7 раза (p1<0,01), у 1,4 раза (p, p2, p3<0,01), та в 1,2 раза, (p, p1, p2, p4<0,01), відповідно, менше стосовно даних у інтактних тварин I групи. Привертало увагу те, що досить високою була об’ємна частка сполучної тканини у тварин II групи — 39,14±4,04% та V групи — 34,56±2,62%. При цьому найбільше зменшення ОЧ сполучної тканини визначали у регенератах кістки у щурів IV групи — 18,74±2,19% (p1<0,01, p2<0,05) та VI групи — 17,30±2,14% (p1, p4<0,01, p2<0,05), яке, однак, залишалось у 2,0 раза та в 1,9 раза, відповідно, вище даних у інтактних тварин I групи.

На 60-ту добу експерименту визначали зменшення ОЧ судин у регенератах кістки піддослідних тварин усіх груп дослідження, однак отримані дані були вірогідно вище стосовно значень у контрольній групі (p<0,01). При цьому максимальні значення ОЧ судин у регенератах кістки визначались у тварин III та VI груп дослідження — 16,12±1,14% та 16,21±0,94% (p, p1<0,01). Найнижчі значення цього параметра були у щурів II групи — 12,22±1,13%, (p<0,01), де загоєння кісткового дефекту відбувалось під кров’яним згустком та у V групі — 14,48±0,96%, p<0,01, де імплантувався комплекс ММСК-ЖТ + „Колапан”.

Зростання кількості остеокластів у регенератах кісткової тканини піддослідних тварин свідчило про нормалізацію процесів ремоделювання кісткової тка-

Оригінальні дослідження

Таблиця 2

Кількісні показники будови регенератів у ділянці дефекту черепа в експериментальних тварин на 60-ту добу експерименту

Показники	I група (контроль)	II група (порівняльна)	III група (ММСК-ЖТ з ОД)	IV група (ММСК-ЖТ + 3ТП)	V група (ММСК-ЖТ+ „Колапан”)	VI група (ММСК-ЖТ+3-ТП+ „Колапан”)
Об’ємна частина, %						
Кісткові балки	46,20± ±2,50	15,40± ±1,30°	26,80± ±1,40°,*	33,80± ±1,60 °,*,■	18,40± ±1,30 °,■,Δ	37,0± ±1,60 °,*,■,◇
Сполучна тканина	9,20± ±0,80	9,14± ±4,04°	26,0± ±2,74 °,**	18,74± ±2,19 °,*,■■	34,56± ±2,62 °,■■,Δ	17,30± ±2,14 °,*,■■,◇
Судини	5,70± ±0,50	12,22± ±1,13°	16,12± ±1,14 °,**	15,21± ±0,99°	14,48± ±0,96°	16,21± ±0,94 °,**
Чисельна щільність клітинних елементів (на 1/мкм ³)						
Остеобласти і остеоцити	5523± ±310,0	1.506± ±42,0°	2.128± ±48,0 °,*	2943± ±53,0 °,*,■	1947± ±50,0 °,*,■■,Δ	3.050± ±89,0 °,*,■,◇
Остеокласти	325,0± ±24,0	94,0± ±21,0°	139,0± ±37,0°	200,0± ±43,0 °,**	242,0± ±46,0*	274,0± ±35,0 *,■■
Фібробласти і фіброцити	670,0± ±75,0	2.750± ±82,0°	1738± ±74,0 °,*	975,0± ±62,0 °,*,■	1344± ±63,0 °,*,■,Δ	718,0± ±48,0 *,■,Δ,◇

Примітки:

1. °p<0,01; °°p<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних I групи
2. *p1<0,01; **p1<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних II групи
3. ■p2<0,01; ■■p2<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних III групи
4. Δp3<0,01; ΔΔp3<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних IV групи
5. ◇p4<0,01; ◇◇p4<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних V групи

нини. Однак отримані дані залишались вірогідно нижче порівняно зі значеннями в інтактних щурів I групи: у II групі — у 3,5 раза, p<0,01, у III групі — у 2,3 раза, p<0,01, p1>0,05, у IV групі — у 1,6 раза, p, p1<0,05, p2>0,05. При цьому, у щурів V та VI експериментальних груп чисельна щільність остеокластів зі значеннями 242,0±46,0 1/мкм³, p1>0,01 та 274,0±35,0 1/мкм³, p1<0,01, p2<0,05, дорівнювала даним у тварин I контрольної групи, p>0,05. У даний термін досліджень досліджували зменшення чисельної щільності фібробластів і фіброцитів порівняно з даними попереднього терміну спостереження (30 діб), однак отримані значення були вірогідно вище даних у щурів контрольної групи, p<0,01. Водночас, максимальне зниження даних цього параметра визначали у тварин IV та VI дослідних

груп: до 975,0±62,0 1/мкм³ та до 718,0±48,0 1/мкм³, відповідно, що було в 1,5 раза, p– p2<0,01, та в 1,1 раза, p>0,05, p1 — p4<0,05, відповідно.

Через три місяці спостережень спостерігали виразні кількісні позитивні зміни у будові регенератів у ділянці дефекту черепа експериментальних тварин (таблиця 3). Так, у тварин IV і VI груп об’ємна частка кісткових балок у регенератах зросла до 43,90±1,68%, p1 — p2<0,01 та до 45,10±1,74%, p1, p2, p4<0,01, відповідно, та дорівнювала даним у щурів контрольної групи. Однак у щурів II, III та V груп дослідження об’ємна частка кісткових балок залишалась в 1,8 раза, в 1,3 раза, p1<0,01 та в 1,6 раза, p1 — p2<0,01 меншою, відповідно, порівняно з даними в інтактних щурів I групи, p<0,01.

У даний термін дослідження визначали зменшення

Таблиця 3
Кількісні показники будови регенератів у ділянці дефекту черепа в експериментальних тварин на 90-ту добу спостережень

Показники	I група (контрольна)	II група (порівняльна)	III група (ММСК-ЖТ з ОД)	IV група (ММСК-ЖТ + ЗТП)	V група (ММСК-ЖТ+ „Колапан”)	VI група (ММСК-ЖТ+З-ТП+ „Колапан”)
Об’ємна частка, %						
Кісткові балки	46,20± ±2,50	25,50± ±1,70°	36,90± ±1,52°, *	43,90± ±1,68 *,■	28,50± ±1,43 °,■,Δ	45,10± ±1,74 *,■,◇
Сполучна тканина	9,20± ±0,80	19,05± ±2,80°	15,60± ±2,53°	12,45± ±2,20	24,53± ±2,52 °,■,■,Δ	10,00± ±2,15 **,◇
Судини	5,70± ±0,50	8,22± ±1,14°	12,12± ±1,10 °,**	7,44± ±0,82■	8,50± ±0,86 °,■,■	6,15± ±0,90■
Чисельна щільність клітинних елементів (на 1/мкм3)						
Остеобласти і остеоцити	5523± ±310,0	3600± ±45,0°	4.230± ±49,0 °,*	4.643± ±52,0 °,*,■	3000± ±51,0 °,*,■,Δ	5150± ±90,0 *,■,Δ,◇
Остеокласти	325,0± ±24,0	124,0± ±23,0°	169,0± ±40,0°	238,0± ±45,0 **	275,0± ±48,0**	304,0± ±35,0 *,■,■
Фібробласти і фіброцити	670,0± ±75,0	2050± ±80,0°	1.038± ±72,0 °,*	675,0± ±60,0 *,■	920,0± ±61,0 °,*,Δ	682,0± ±47,0 *,■,◇

Примітки:

1. °p<0,01; °°p<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних у I групі
2. *p1<0,01; **p1<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних у II групі
3. ■p2<0,01; ■■p2<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних у III групі
4. Δp3<0,01; ΔΔp3<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних у IV групі
5. ◇p4<0,01; ◇◇p4<0,05 – достовірна різниця значень стосовно даних у V групі

ОЧ сполучної тканини у регенератах кісткової тканини підслідних шурів, при мінімальних значеннях цього параметра у IV та VI експериментальних групах: 12,45±2,20% та 10,00±2,15%, p1<0,05, p4<0,01, відповідно, p>0,05. У той же час максимальна кількість сполучної тканини досліджувалась у регенератах кісткової тканини тварин II, III та V груп дослідження, об’ємна частка якої була у 2,0, у 1,7 раза та у 2,7 раза, p2<0,05, p3<0,01, відповідно, більшою ніж у шурів контрольної групи, p<0,01.

У досліджуваних регенератах на 90-ту добу спостережень визначали суттєве зниження об’ємної частки судин, яка у IV та VI групах зі значеннями 7,44±0,82% та 6,15±0,90%, p2<0,01, відповідно, дорівнювала даним у шурів контрольної групи, p>0,05. При цьому, у тварин

II, III та V груп ОЧ судин залишалась вірогідно вищою стосовно даних у інтактних тварин: в 1,4 раза, (p<0,01), у 2,1 раза, (p<0,01, p1<0,05), та в 1,5 раза (p, p2<0,05, відповідно).

У досліджуваний термін часу досліджували нормалізацію чисельної щільності клітинних елементів у кісткових регенератах кістки експериментальних тварин. Так, у тварин VI групи, де для відновлення кісткового дефекту використовувалась комбінація ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан” визначали максимальне збільшення: кількості остеобластів та остеоцитів (до 5150±90,0 1/мкм3, p1 — p4<0,01 проти 5523±310,0 1/мкм3 у тварин I групи, p>0,05), кількості остеокластів (до 304,0±35,0 1/мкм3, p1<0,01, p2<0,05 проти 325,0±24,0 1/мкм3 у тварин I групи, p>0,05) на тлі зменшення фібробластів і фіброцитів

Оригінальні дослідження

(до $682,0 \pm 47,0$ 1/мкм³ проти $670,0 \pm 75,0$ 1/мкм³ у тварин I групи). Досить суттєвою була нормалізація чисельної щільності клітинних елементів у щурів IV групи, де заміщення кісткового дефекту відбувалось за впливу комбінації ММСК-ЖТ + ЗТП. При цьому, у тварин даної групи кількість остеокластів ($p < 0,05$) та фібробластів і фіброцитів дорівнювала даним у інтактних тварин I групи, $p > 0,05$, у 1,2 раза меншій чисельній кількості остеобластів та остеоцитів ($p < 0,05$, $p_1 - p_2 < 0,01$). У тварин II, III, V експериментальних груп значення чисельної кількості клітинних елементів регенератив хоча і носило тенденцію до покращення, однак отримані дані відрізнялись статистичною значущістю від значень у інтактних тварин I групи ($p < 0,01$, $p < 0,05$).

Висновки. На модельних дефектах кісткової тканини черепа щурів за результатами морфометричних досліджень доведена доцільність досліджуваних імплантів для використання, особливо при поєднанні ММСК-ЖТ + ЗТП та ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”, які забезпечували повне закриття дефекту за 90 діб.

Список літератури

1. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* 2010;19(6):667-79.
2. Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 2011;112(12):3491-3501.
3. Xue R, Qian Y, Li L, Yao G, Yang L, Sun Y. Polycaprolactone nanofiber scaffold enhances the osteogenic differentiation potency of various human tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):148.
4. Dawson JI, Oreffo RO. Bridging the regeneration gap: stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):124-31. DOI: 10.1016/j.abb.2008.03.024.
5. Fisher MB, Mauck RL. Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(1):1-13. DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0723.
6. Hanson S, D'Souza RN, Hematti P. Biomaterial-mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(15-16):2162-8. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0359.
7. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 2009;324(5935):1673-7. DOI: 10.1126/science.1171643.
8. Hanker JS, Giammara BL. Biomaterials and biomedical devices. *Science.* 1988;242(4880):885-92.
9. Guarino V, Causa F, Ambrosio L. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert Rev Med Devices.* 2007;4(3):405-18.
10. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:816460.
11. Chena FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci.* 2016;53:86-168.
12. Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Filomeno P, Wang XH, Davies JE, et al. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(6):1299-310. DOI: 10.1007/s00395-011-0221-9.
13. Lieberman JR, Friedlaender GE, editors. *Bone Regeneration and Repair. Biology and Clinical Applications.* Rosemont IL: Humana Press; 2005. 398 p.

References

1. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* 2010;19(6):667-79. doi: 10.3727/096368910X508762.
2. Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 2011;112(12):3491-3501. DOI: 10.1002/jcb.23287.
3. Xue R, Qian Y, Li L, Yao G, Yang L, Sun Y. Polycaprolactone nanofiber scaffold enhances the osteogenic differentiation potency of various human tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):148. DOI: 10.1186/s13287-017-0588-0.
4. Dawson JI, Oreffo RO. Bridging the regeneration gap: stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):124-31. DOI: 10.1016/j.abb.2008.03.024.
5. Fisher MB, Mauck RL. Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(1):1-13. DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0723.
6. Hanson S, D'Souza RN, Hematti P. Biomaterial-mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(15-16):2162-8. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0359.
7. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 2009;324(5935):1673-7. DOI: 10.1126/science.1171643.
8. Hanker JS, Giammara BL. Biomaterials and biomedical devices. *Science.* 1988;242(4880):885-92.
9. Guarino V, Causa F, Ambrosio L. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert Rev Med Devices.* 2007;4(3):405-18.
10. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:816460. DOI: 10.1155/2015/816460.
11. Chena FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci.* 2016;53:86-168.
12. Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Filomeno P, Wang XH, Davies JE, et al. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(6):1299-310. DOI: 10.1007/s00395-011-0221-9.
13. Lieberman JR, Friedlaender GE, editors. *Bone Regeneration and Repair. Biology and Clinical Applications.* Rosemont IL: Humana Press; 2005. 398 p.

Відомості про авторів

Бамбуляк Андрій Васильович — к. мед. наук, доцент кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Ткачик Степан Васильович — асистент кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Гаген Олена Юрїївна — асистент кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Горицький Ярослав Вікторович — асистент кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна.

Сведения об авторах

Бамбуляк Андрей Васильевич — к. мед. наук, доцент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Ткачик Степан Васильевич — ассистент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Гаген Елена Юриевна — ассистент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Горицкий Ярослав Викторович — ассистент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина.

Information about the authors

Bambuliak Andrii, Phd — Associate Professor of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.

Tkachyk Stepan — assistant of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.

Hahen Olena — assistant of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.

Horytskiy Yaroslav — assistant of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery, Higher State Educational Establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernivtsi, Ukraine.

Надійшла до редакції 14.01.2020

Рецензент — проф. Цигикало О.В.

© А.В. Бамбуляк, С.В. Ткачик, О.Ю. Гаген, Я.В. Горицкий, 2020