

*А.В. Паитус, М.М. Рожко, М.М. Багрій, Н.Є. Ковальчук,
І.Р. Ярмошук, В.В. Грекуляк*

Вивчення морфометричних характеристик колагенових волокон на ранніх термінах субкутанної імплантації пористого волокнистого матриксу

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», м. Івано-Франківськ, Україна

Актуальність. Проблема, що стоїть перед тканинною інженерією полягає в тому, щоб оптимізувати виділення, розмноження і диференціацію клітин, сконструювати матрикс або системи доставки, сприяючи підтримці й координації регенерації тканин у трьох вимірах.

Мета дослідження – експериментально оцінити характер розвитку колагенової підложки на ранніх строках субкутанної імплантації біополімерного волокнистого матриксу.

Матеріали і методи. Дослідження проводилось на 20 лабораторних тваринах (кролі), які були поділені на дві групи. У першій групі порівняння в 10-ти тварин проводилось оперативне втручання, яке включало формування «кишені» в підшкірній клітковині та накладання швів. У другій групі в 10-ти тварин проводилась підшкірна імплантація біополімерного матриксу в ділянку спини між лопатками. Для дослідження брали 9 сегментів: один центрально розташований і по 4 сегменти з парацентральної та периферичної зон. Статистичний аналіз результатів здійснено за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel та Statistica 5.5 (Multiple Regression) з використанням методів варіаційної статистики, кореляції.

Результати свідчать про відсутність як гострої, так і хронічної реактивної запальної інфільтрації, а також як гострої, так і хронічної реакції відторгнення імплантата як чужорідної субстанції в імплантованій ділянці тіла тварини.

Висновки. Отриманий волокнистий матрикс завдяки своїй гігроскопічності та пористості створює своєрідний місток для проростання тканин і формування колагенового матриксу у трьохвимірному просторі.

Ключові слова: біополімер, біоімплантат, колагенові волокна.

Актуальність

На даний час у медицині та біоінженерії з кожним роком зростає інтерес до біополімерів. Матеріали у тканинній інженерії для створення біоімплантатів повинні володіти спектром спеціальних властивостей і надавати інженерним або мікроінженерним конструкціям характеристики, властиві живим тканинам, а саме: здатність до самовідновлення, здатність змінювати будову і властивості у відповідь на фактори навколишнього середовища [1, 2]. Проблема, що стоїть перед тканинною інженерією, полягає в тому, щоб оптимізувати виділення, розмноження й диференціацію клітин, сконструювати каркаси або системи доставки, сприяючи підтримці та координації регенерації тканин у трьох вимірах [3–5].

Мета дослідження – експериментально оцінити характер розвитку колагенових волокон на ранніх строках субкутанної імплантації біополімерного волокнистого матриксу.

Матеріали та методи дослідження

Для проведення досліджень було використано розроблений нами волокнистий матрикс із гранул 100 % чистого полілактиду. Матрикс розробляли методом фазового розділення полімеру. Товщина волокнистого матриксу в середньому становила 30 мкм. Діаметр волокон становив від 0,7 до 10 мкм.

Вищевказаний матрикс піддавали гамма-стерилізації. Герметично запаковані в подвійну упаковку для стерилізації скафолди рівномірно вкладали під електронний пучок з енергією частинок 4 Мега-електронВольт (MeV) і протяжністю імпульсів 4,5 мікросекунди (мкс). Кожний пакет «Medicom» стандартизований EN 868-5,

ISO 11140-1, ISO 11607-1, в який був запакований полімер товщиною 0,6 мм. При опроміненні кількість імпульсів змінювалась від 4–70. Стерилізація відбувалась за такими параметрами: частота роботи прискорювача складала 250 Гц, максимальна енергія електронів становила 5 MeV, максимальна потужність пучка становила 5 кВт, тривалість імпульсів 4,5 мкс, імпульсний струм до 1,5 А, потужність гальмуючого випромінювання на відстані 1 м від мішені становила 104 Р/сек. Доза опромінення об'єкта становила до 50 кГр з розрахунку об'єму та щільності матеріалу. Згідно з нормами, максимально припустима доза 50 кГр, при максимальній енергії електронів 5 MeV. Обробка електронами з енергією менше 10 MeV не викликала ядерних трансмутацій, тобто не призводила до виникнення радіоактивних ізотопів і не створювала залишкового радіаційного тла об'єкта. Після стерилізації біополімерний матрикс хірургічним шляхом імплантували під шкіру лабораторної тварини. Дослідження проводилось на 20 лабораторних тваринах (кролі), які були поділені на дві групи. У першій групі порівняння в 10-ти тварин проводилось оперативне втручання, яке включало формування «кишені» в підшкірній клітковині та накладання швів. У другій групі в 10-ти тварин проводилась підшкірна імплантація біополімерного матриксу в ділянку спини між лопатками. Через місяць хірургічним шляхом матрикс разом із прилеглими тканинами видалявся з тіла тварини.

Усі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили з дотриманням правил відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» [6].

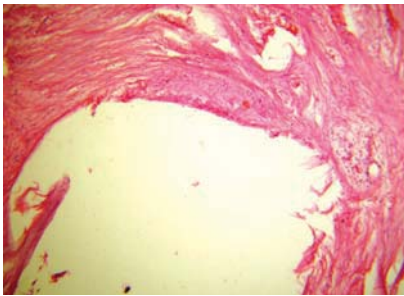


Рис. 1. Сполучна тканина периферичної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

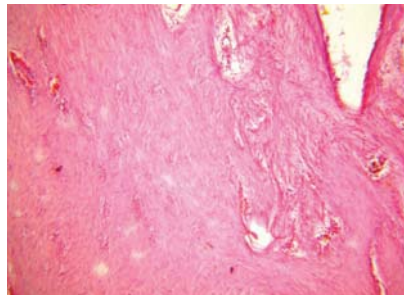


Рис. 2. Сполучна тканина з циркулярним розташуванням периферичної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

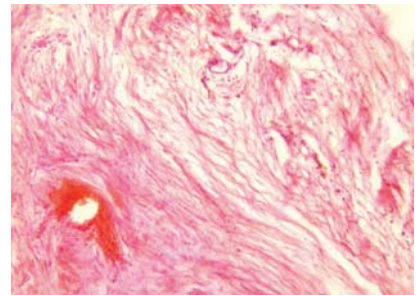


Рис. 3. Пухка сполучна тканина периферичної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

Для здійснення загального гістологічного дослідження матрикс з оточуючими тканинами розсікали взаємоперпендикулярними розрізами на 25 однакових сегментів. Для дослідження брали 9 сегментів: один центрально розташований і по 4 сегменти з парацентральної та з периферичної зон. Отримані ділянки імпланту фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну (Ph = 7,0). Час фіксації складав 24 години. У подальшому шматочки досліджуваних органів поміщали у висхідну батарею спиртів для дегідратації, далі у хлороформ, суміш хлороформ-парафін (1:1), парафін (при температурі 37°C). Після парафінової передпідготовки шматочки заливали парафіном. Виготовлення серійних парафінових зрізів товщиною 4–6 мкм проводилось на санному мікроскопі. Забарвлення препаратів здійснювалося гематоксиліном та еозином [7].

Гістологічні препарати світлооптично досліджувались на мікроскопі «Leica DME» під різними збільшеннями об'єктива й окуляра. Морфометричні показники визначали за допомогою системи для отримання мікроскопічних зображень гістологічних мікропрепаратів (мікроскоп «Leica DME» та цифрова фотокамера «Nikon P 5100») і програми аналізу зображень Image Tool 2.0 for Windows на кафедрі патоморфології та судової медицини Івано-Франківського національного медичного університету. Статистичний аналіз результатів здійснено за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Exel та Statistica 5.5 (Multiple Regression) з використанням методів варіаційної статистики й кореляції.

Результати дослідження та їх обговорення

При патоморфологічному дослідженні периферичних зон імплантатів одного місячного строку відзначається розвиток сполучної тканини в міжволокнистих просторах імплантованого каркасу (рис. 1).

Сполучна тканина представлена сполучнотканинними волокнами та клітинами. Волокна витягнуті, розміщу-

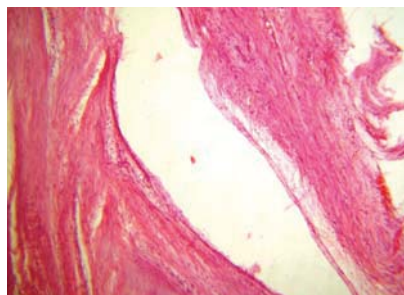


Рис. 4. Сполучна тканина з циркулярним розташуванням парацентральної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

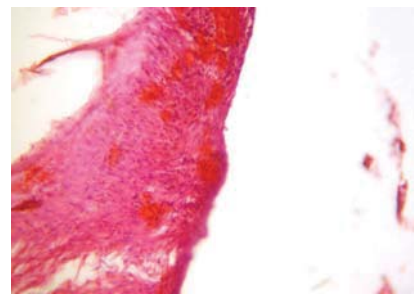


Рис. 5. Сполучна тканина з ознаками ангіоматозу парацентральної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

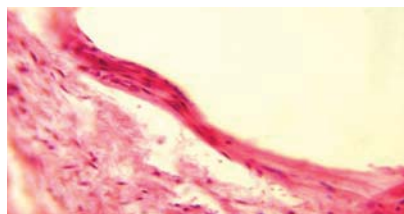


Рис. 6. Сполучна тканина зі щільним розташуванням колагенових волокон центральної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

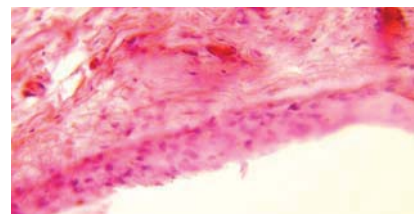


Рис. 7. Сполучна тканина з циркулярною проліферацією фібробластів центральної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

ються трохи пухко із проміжками основної речовини між ними. В основній речовині візуалізуються фіброцити, фібробласти, макрофаги, судини. Серед досліджених клітин сполучної тканини домінують фіброцити, ядра яких витягнуті по довжині, менша кількість фібробластів. У ділянках, які контактують зі щільним волокнистим шаром полімерного імплантату, відзначається циркулярне компакте розташування сполучнотканинних волокон товщиною $56,18 \pm 0,638$ мкм (рис. 2).

В окремих ділянках виявляється досить пухке розташування сполучнотканинних волокон (рис. 3), між якими осередково візуалізуються макрофаги з округлими ядрами та помірною кількістю світлої цитоплазми. Поміж макрофагами відслідковуються поодинокі

лімфоцити. Морфометрично встановлено, що на одну клітину із захисною функцією (макрофаг, лімфоцит) припадає $618,44 \pm 2,256$ мкм² площі сполучної тканини.

При патоморфологічному дослідженні парацентральної зони імплантів одномісячного строку відзначається розвиток сполучної тканини по периферії імплантованого матриксу та в міжволокнистих просторах імплантата. Сполучна тканина представлена щільною волокнистою неоформленою, яка місцями з дещо пухким розташуванням сполучнотканинних волокон. Місцями навколо груп полімерних волокон імплантата простежується більш компактно розташування сполучнотканинних волокон, які набувають циркулярної орієнтації та формують сполучнотканинну капсулу середньою товщиною $42,55 \pm 0,897$ мкм (рис.4).

На окремих ділянках на межі з полімерними волокнами виявляються групи лейкоцитів, які відзначаються у сполучній тканині. Навколо частини полілактидних волокон, особливо з більш компактно розташуванням, у сполучній тканині, яка безпосередньо контактує з імплантатом, відзначаються осередки ангіоматозу у вигляді поперечних перерізів судин (рис. 5).

При патоморфологічному дослідженні центральної зони імплантів одномісячного строку встановлено, що міжволокнисті простори імплантата заповнюються сполучною тканиною, такою ж, як і в парацентральної зони периферичній зоні. Сполучна тканина характеризується домінуванням у ній колагенових волокон. В одних ділянках волокна щільно розташовані одне з одними, зливаючись у суцільну масу, в інших між ними простежується основна речовина сполучної тканини. У першому випадку кількість фіброцитів і фібробластів є меншою, у другому випадку навпаки – кількість даних клітин більша. Протилежний зв'язок відмічено при присутності та кількості макрофагів і лімфоцитів. У випадках пухкого розташування волокон в основній речовині візуалізуються осередки, здебільшого в периваскулярній зоні, макрофагів і невеликої кількості лімфоцитів. Навколо частини полілактидних волокон імплантата спостерігається або більш щільніше розташування сполучнотканинних волокон з фіброцитами між ними товщиною $42,95 \pm 0,958$ мкм (рис. 6) або циркулярна проліферація фібробластів у невеликій кількості середньою товщиною $64,66 \pm 1,471$ мкм (рис. 7), що в подальшому призводить до формування сполучнотканинних капсул навколо окремих груп полімерних волокон середньою товщиною $20,41 \pm 0,882$ мкм, забезпечуючи його більш міцну фіксацію у сполучній тканині. Відзначаються ділянки, в яких присутня сегментарна лейкоцитарна, незначно виражена інфільтрація довкола полімерних волокон у сполучній тканині.

У тварин контрольної групи ознак циркулярного розташування волокон з чіткою системною геометричною орієнтацією не виявлено. Що стосується товщини

колагенових волокон, то тут суттєвої різниці в порівнянні з основною групою виявлено не було. Різниця була в лейкоцитарній інфільтрації, яка була відсутня у тварин контрольної групи.

Аналіз та обговорення результатів

На основі проведених досліджень встановлено, що ріст і формування колагенового волокна відбувалися крізь усю товщину волокнистого полімерного матриксу у трьох взаємоперпендикулярних напрямках. Даний факт підтверджує каркасну функцію синтезованої полімерної сітки. Тобто група полімерних волокон створює своєрідну підложку для побудови на ній тканини. В інших випадках імплантований матеріал інкапсулюється товстою сполучнотканинною капсулою з ознаками хронічного запального процесу та без ознак проростання всередину, чого тут не спостерігалось. Одна з особливостей формування колагенових волокон на волокнистому матриксі – це їхнє циркулярне розташування навколо групи полімерних волокон, що свідчить про їх щільний контакт з полімером. Ангіоматоз у товщі полімерного матриксу може свідчити про проліферативну активність капілярів у глибині полімерного матриксу, що, з однієї сторони, покращує гемодинаміку тканин вглибині матриксу, а з іншої – забезпечує виведення продуктів гідролізу матеріалу із тканин. Крім того, розвиток капілярів свідчить також про активний синтез тканин у глибині полімерного матриксу. Присутність фібробластів, особливо в центральній частині матриксу, свідчить про активний синтез колагену на даній ділянці.

Висновки

1. Відсутність значної кількості нейтрофільних лейкоцитів, збільшеної кількості макрофагів і лімфоцитів свідчить про відсутність як гострої, так і хронічної реактивної запальної інфільтрації, а також як гострої, так і хронічної реакції відторгнення імплантата як чужорідної субстанції в імплантованій ділянці тварини.
2. Отриманий волокнистий матрикс завдяки своїй гігроскопічності та пористості створює своєрідний місток для проростання тканин і формування колагенового матриксу у трьохвимірному просторі.

Перспективи подальших досліджень

З метою оптимізації надання стоматологічної допомоги населенню у практичній стоматології у випадках виконання процедури енуклації застосування волокнистого матриксу та полімерних мембран, не провокуючи виникнення значних порушень у процесі фізіологічної регенерації кістки після її кисти, дозволяє аргументувати їх імплантацію.

ПОСИЛАННЯ

1. Preimuschestva vremennyh nesymnykh freezerovannykh i polimerizovannykh plastmassovykh protezov na implantatah (2013). Olesova VN, Dovbnov VA, Evstratov OV, Zveryaev AG, Zuev MD, Lesnyak AV [i dr.]. Klinicheskoe issledovaniya 1: 25–26 [in Russian]
2. Andryushechkina TN, Berchenko GN, Gioeva YUA, Zoryan EV, Artrushkevich VG. Vliyaniye kompleksnykh antigomotskikh preparatov na tkani paradonta v aktivnom periode ortodonticheskogo lecheniya: eksperimentalno-morfologicheskoe i klinicheskoe issledovaniye. Klinicheskaya stomatologiya 2015, 4: 42–49 [in Russian]
3. Balin VN, Balin DV, Iordaniushvili AK, Muzykin MI. Osteostimuliruyushchee deystviye ksenogenogo kostnogo materiala na reparativnyy osteogenez (eksperimentalno-morfologicheskoe issledovaniye). Stomatologiya, 2015 94 (2): 5–9 [in Russian]

4. Hayashi CH, Gudino CV, Gibson FC, Genco CA (2010). Review: pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cells specific innate immune inflammatory pathways. Mol. Oral. Microbiol. 5 (25): 305–316
5. Deev RV, Isaev AA, Kochish AYU, Tihilov RM (2016). Kletochnyye tehnologii v travmatologii i ortopedii: putirazvitiya. Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya injeneriya 3 (6): 22–33 [in Russian]
6. Poriadok provedenniia naukovymy ustanovamy doslidiv, eksperymentiv na tvarynakh. Ofitsiinyi visnyk Ukrainy. Ofits. vyd. (2012) 24: 82 [in Ukrainian]
7. Bahrii MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. Metodyky morfolohichnykh doslidzhen: monohrafiia. – Vinnytsia: Novaknyha (2016): 328 [in Ukrainian]

Изучение морфометрических характеристик коллагеновых волокон на ранних сроках субкутанной имплантации пористого волокнистого матрикса

А.В. Пантус, Н.М. Рожко, Н.Н. Багрий, Н.Е. Ковальчук, И.Р. Ярмошук, В.В. Грекуляк

Резюме. Проблема, стоящая перед тканевой инженерией, заключается в том, чтобы оптимизировать выделение, размножение и дифференциацию клеток, сконструировать матрикс или системы доставки, способствуя поддержанию и координации регенерации тканей в трех измерениях. Один из важных критериев, который должен учитываться при конструировании матрикса, – его способность образовывать оптимальную подложку для подсадки клеточных субстратов.

Цель исследования – экспериментально оценить характер развития коллагеновой подложки на ранних сроках субкутанной имплантации биополимерного волокнистого матрикса.

Исследование проводилось на 20 лабораторных животных (кролики), которые были разделены на две группы. В первой группе сравнения у 10-ти животных проводилось оперативное вмешательство, которое включало формирования «кармана» в подкожной клетчатке и наложения швов. Во второй группе у 10-ти животных проводилась подкожная имплантация биополимерного матрикса в область спины между лопатками. Для исследования взяли 9 сегментов: один центрально расположенный и по 4 сегмента из парацентральной и периферической зон.

Статистический анализ результатов осуществлен с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и Statistica 5.5 (Multiple Regression) с использованием методов вариационной статистики, корреляции.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии как острой, так и хронической реактивной воспалительной инфильтрации, а также как острой, так и хронической реакции отторжения имплантата как чужеродной субстанции в имплантированном участке тела животного. Полученный волокнистый матрикс благодаря своей гигроскопичности и пористости создает своеобразный мостик для прорастания тканей и формирования коллагенового матрикса в трехмерном пространстве.

Ключевые слова: биополимер, биоимплантат, коллагеновые волокна.

Study of morphometric characteristics of collagen fibers in early terms of subcutaneous implantation of porous fibrous matrix

A. Pantus, M. Rozhko, M. Bagrii, N. Kovalchuk, I. Yarmoshuk, V. Grekuliak

Resume. The problem facing tissue engineering is to optimize the selection, reproduction and differentiation of cells, to construct matrices or delivery systems, contributing to the maintenance, coordination of tissue regeneration in three dimensions. Currently the interest in biopolymers in bioengineering and medicine is increasing progressively. The materials used in tissue engineering are expected to have some special features and supply engineer and microengineer constructions with characteristics that living tissues have, as follows: the ability of self-repair; the ability of changing anatomy and properties in response to environmental factors.

The purpose of the study is to experimentally evaluate the nature of the collagen substrate development in the early terms of subcutaneous implantation of a biopolymer fibrous matrix.

The research was carried out on 20 lab animals (rabbits), which were divided into two groups. The first group: surgical intervention was performed to 10 animals, which included the creation of the pocket in the subcutaneous adipose tissue and suturing. The second group: the implantation of the biopolymer matrix into the area between the shoulder blades was performed to 10 animals.

The month after the matrix with the underlying tissues was removed. It was divided into 25 parts for histological examination. 9 segments were chosen for analysis: the one from centrally located area, four segments from precentral and four ones from peripheral zones.

The histological slides were examined lightoptically with the help of the microscope «Leica DME» with different magnifications. The morphometric features were analyzed using the system for taking microscopic pictures of histological samples (microscope «Leica DME» and digital camera «Nikon P 5100») and by using the program Image-Tool 2.0 for Windows. The research were conducted at the Department of Pathomorphology and Legal Medicine of Ivano-Frankivsk National Medical University.

Statistical analysis was performed with the aid of PC programs Microsoft Excel and Statistica 5.5 (Multiple Regression) using the methods of variation statistic and correlation. On the basis of the performed research it was established that the growth and formation of collagen fiber occurred through the entire thickness of the fibrous polymer matrix in three mutually perpendicular directions. This fact confirms the framework function of the polymer mesh we synthesized.

The obtained results indicate the absence of both acute and chronic reactive inflammatory infiltration, as well as acute and chronic rejection of the implant as a foreign substance in the implanted part of the animal. The fibrous matrix created by us because of its hygroscopicity and porosity creates a unique bridge for germination of tissues and the formation of a collagen matrix in a three-dimensional space.

Key words: biopolymer, bioimplant, collagenfibers.

Пантус Андрій Володимирович – канд. мед. наук,

доцент кафедри хірургічної стоматології ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».

Адреса: вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76018. Тел.: (066) 102-68-56. E-mail: kovalchuk-natalja@ukr.net.

Рожко Микола Михайлович – д-р мед. наук, професор, Заслужений діяч науки і техніки України,

ректор ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».

Адреса: вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76018. Тел.: 0-342 78-41-94. E-mail: rector@ifnmu.edu.ua.

Багрий Микола Миколаєвич – канд. мед. наук,

доцент кафедри патоморфології та судової медицини ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».

Адреса: вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76018. Тел.: (050) 733-48-72. E-mail: Pathomorfology@ifnmu.edu.ua.

Ковальчук Наталія Євгенівна – канд. мед. наук,

асистент кафедри клінічної фармакології і фармакотерапії ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».

Адреса: вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76018. Тел.: (066) 568-60-20. E-mail: kovalchuk-natalja@ukr.net.

Ярмошук Ірина Романівна – канд. мед. наук,

асистент кафедри стоматології ННІ ПО ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».

Адреса: вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76018. E-mail: zlatoslava2@ukr.net.

Грекуляк Василь Васильович – асистент кафедри хірургічної стоматології

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».

Адреса: вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, 76018. Тел.: (050) 966-47-39. E-mail: bezvuyekin23@gmail.com.