

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

## **Вивчення морфометричних характеристик колагенових волокон після двохмісячної 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 й диференціацію клітин, сконструювати матрикси або системи доставки, сприяючи підтримці та координації регенерації тканин у трьох вимірах. Одним з важливих критеріїв, який повинен ураховуватися при конструюванні матриксу, – його здатність утворювати оптимальну підложку для підсадки клітинних субстратів.

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

**Матеріали та 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» у 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 периферичної та центральної зон.

Статистичний аналіз результатів здійснено за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel і Statistica 5.5 (Multiple Regression) з використанням методів варіаційної статистики та 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 тварини.

**Висновок.** Отриманий волокнистий матрикс завдяки своїй гігроскопічності та пористості створює своєрідний місток для проростання тканин при формуванні 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]. 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 [2, 3]. Одним з важливих критеріїв, який повинен ураховуватися при конструюванні матриксу, – його здатність утворювати оптимальну підложку для підсадки клітинних субстратів у поєднанні з оптимальною гемодинамікою всередині скафолда [4, 5].

**Мета** дослідження – експериментально оцінити характер розвитку колагенових волокон після двохмісячної субкутанної імплантації біополімерного волокнистого матриксу.

### **Матеріали та методи дослідження**

Для проведення досліджень було використано розроблений 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 гама-стерилізації. Герметично запаковані в подвійну упаковку для стерилізації скафолди рівномірно клали під електронний пучок з енергією частинок 4 Мелектрон-вольт (MeV) і протяжністю імпульсів 4,5 мікросекунди (мкс). Кожний пакет «Medicom» стандартизований EN 868-5, ISO 11140-1, ISO 11607-1, в які був запакований полімер товщиною 0,6 мм. При опроміненні кількість імпульсів змінювалась від 4 до 70. Стерилізація відбувалась за такими параметрами: частота роботи прискорювача складала 250 Гц, максимальна енергія електронів становила 5 MeV, максимальна потужність пучка – 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, максимальна 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 два місяці 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].

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 периферичної зон. Отримані ділянки імплантата фіксували в 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, суміші 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 мікромомі. Забарвлення препаратів здійснювалось 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 P5100») та 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 Excel і Statistica 5.5 (Multiple Regression) з використанням методів варіаційної статистики та кореляції.

### Результати дослідження

При патоморфологічному дослідженні периферичних зон імплантатів 2-місячного строку відзначається щільне обростання груп волокон імплантата сполучною тканиною.

Групи волокон полімерного матриксу в більшості полів зору оточені тонкою сполучнотканинною капсулою товщиною  $83,72 \pm 1,966$  мкм, яка представлена здебільшого щільно розташованими сполучнотканинними волокнами, що мають радіальний напрямок (рис. 1). Між колагеновими волокнами відзначаються поодинокі фіброцити у вигляді веретеноподібних клітин з витягнутими по довжині ядрами з гомогенним хроматином.

У кількох полях зору вдається візуалізувати поодинокі гігантські клітини сторонніх тіл (рис. 2). Клітини розташовані поодинокі або по дві. Клітини значно збільшені в розмірах, містять значну кількість ядер, розташовані здебільшого дифузно, цитоплазма світла, еозинофільна, не вакуолізована. Поряд з даними клітинами не відзначається супутньої макрофагальної, лімфоцитарної інфільтрації.

Волокна імплантата в інших ділянках оточені сполучнотканинною капсулою, в якій над сполучнотканинними волокнами переважають фіброцити та фібробласти (рис. 3). Поміж фіброцитами візуалізуються поодинокі макрофаги.

Відзначається також, що частина полімерних волокон оточена зоною фібробластів (рис. 4). Останні представлені клітинами з помірною кількістю еозинофільної цитоплазми та округлими ядрами. Хроматин ядер переважно гомогенний, місцями дрібнодисперсний, ядерця не візуалізуються. Фібробласти розташовані компактно. Поміж фібробластами виявляються поодинокі фіброцити й макрофаги. Навколо окремих груп полімерних

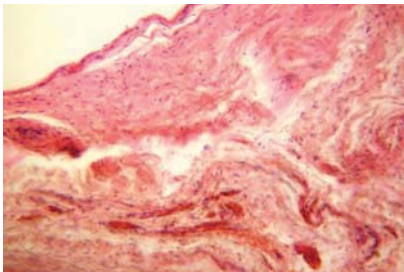


Рис. 1. Сполучна тканина периферичної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

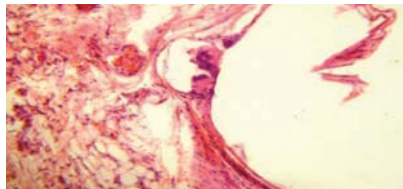


Рис. 2. Сполучна тканина з гігантськими клітинами сторонніх тіл периферичної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

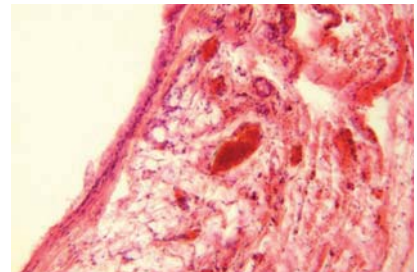


Рис. 3. Сполучна тканина з фібробластами та фіброцитами периферичної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

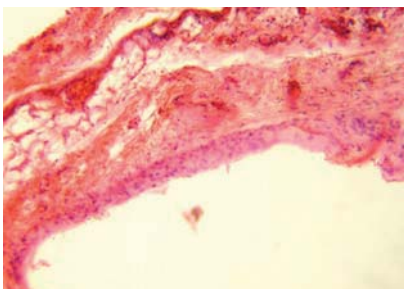


Рис. 4. Сполучна тканина з ділянкою компактно розташованих фібробластів периферичної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

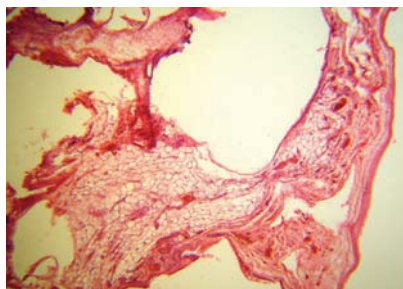


Рис. 5. Сполучна тканина з ділянками жирової тканини периферичної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

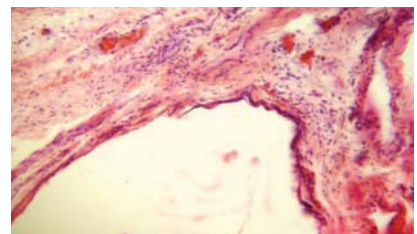


Рис. 6. Сполучна тканина з ділянками лімфоцитарно-макрофагальної інфільтрації парацентральної зони волокнистого матриксу. Забарвлення: гематоксилін та еозин. Об. 10, ок. 10.

волокон поміж фібробластами візуалізуються нейтрофільні лейкоцити в невеликій кількості. Слід відмітити відсутність лімфоцитарної інфільтрації в зонах периволокнистого розвитку сполучної тканини.

Навколо сполучнотканинної капсули, яка в різних зонах представлена сполучною тканиною різного ступеня зрілості, у просторах між групами полімерних волокон виявляється розростання щільної волокнистої неоформленої сполучної тканини. В останній здебільшого простежується домінування сполучнотканинних волокон з невеликою кількістю фіброцитів, поодинокі фібробласти, у кількох полях зору – поодинокі лімфоцити й макрофаги. У випадках, коли капсула навколо волокон імплантата представлена здебільшого фіброцитами, а особливо при домінуванні сполучнотканинних волокон, судини розташовані на певній віддалі – у середньому  $329,60 \pm 3,124$  мкм від капсули.

У поодиноких випадках міжволокнисті простори полімерного матриксу заповнені сполучною та жировою тканиною (рис. 5). Остання представлена зрілими адипоцитами із прозорою цитоплазмою полігональною округлої форми, ядро з гомогенним хроматином, зміщене до цитоплазматичної мембрани. Проте поміж адипоцитами відзначається ріст сполучнотканинних волокон з невеликою кількістю фіброцитів, поодинокими фібробластами й макрофагами.

При патоморфологічному дослідженні парацентральної зони імплантатів 2-місячного строку відзначається заповнення волокон імплантата сполучною та жировою тканиною.

Міжволокнисті простори полімерного матриксу заповнені жировою тканиною зі зрілими адипоцитами округло-полігональної форми. У товщі жирової тканини візуалізуються різного калібру судини. Сполучна тканина, яка поряд із жировою заповнює міжволокнисті простори скафолда, здебільшого представлена сполучнотканинними волокнами з незначною часткою фіброцитів. Вогнищево по периметру груп волокон імплантата візуалізуються осередки проліферації фібробластів з округлими гомогенними ядрами, поміж якими відзначається незначна, а місцями помірна кількість нейтрофільних лейкоцитів із сегментованими ядрами.

Вогнищево навколо окремих груп волокон імплантата виявляються поодинокі гігантські багатоядерні клітини химерної форми зі значною кількістю світлої еозинофільної цитоплазми, вони містять велику кількість ядер, які локалізуються під плазмолемою та в центральній частині клітини. Поряд із гігантськими багатоядерними клітинами сторонніх тіл не відзначається перифокальної макрофагальної, лімфоцитарної та гранулоцитарної інфільтрації.

Вогнищево у сполучній тканині між окремими групами волокон імплантата візуалізується лімфоцитарно-макрофагальна інфільтрація помірної інтенсивності (рис. 6). Поміж клітинами візуалізуються судини, про світлі яких заповнені еритроцитами, проте лейкоцитів і пристінкового розташування інтраваскулярних лейкоцитів не виявлено.

При патоморфологічному дослідженні центральних зон імплантатів 2-місячного строку відзначається розвиток як сполучної, так і жирової тканини в міжволокнистих просторах полімерного скафолда. Групи волокон здебільшого оточені тонкими сполучнотканинними капсулами середньою товщиною  $73,49 \pm 1,567$  мкм, в яких простежуються сполучнотканинні волокна, фіброцити, фібробласти, що розташовуються циркулярно навколо полімерних волокон. Навколо окремих груп полімерних волокон візуалізуються гігантські клітини сторонніх тіл з великою кількістю ядер у них; епітеліоідно-клітинна реакція відсутня. У товщі капсул навколо

частини полімерного волокнистого матриксу відзначаються макрофаги, у невеликій кількості нейтрофільні лейкоцити.

Сполучна тканина, яка заповнює поряд із жировою тканиною міжволокнисті простори полімерного матриксу, містить сполучнотканинні волокна, проте волокна розташовані трохи пухко. Поміж волокнами відзначаються фіброцити з овально-втягнутими ядрами, невелика кількість фібробластів з округло-овальними ядрами, невелика кількість макрофагів, лімфоцитів, вогнищево – невелика кількість нейтрофільних лейкоцитів (клітинна інфільтрація становить  $528,42 \pm 3,105$  мкм<sup>2</sup> площі, яка припадає на одну клітину). Жирова тканина міжволокнистих просторів полімерного матриксу співіснує поряд і взаємно зі сполучною тканиною. Представлена зрілими адипоцитами. У товщі жирової тканини відзначаються аналогічні судини дрібного калібру, заповнені еритроцитами. Навколо окремих судин виявляється незначно виражена лімфоцитарна інфільтрація, яка не поширюється значно за периваскулярні зони і має вогнищевий характер.

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 не було. Різниця була в лейкоцитарній інфільтрації, яка була відсутня в тварин контрольної групи. Не відмічалась також макрофагальна реакція тканин і відсутні гігантські клітини сторонніх тіл.

### Аналіз та обговорення результатів

Дослідження імплантації волокнистого матриксу 2-місячного строку показало, що ріст і формування колагенового волокна відбувався 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. Аналіз двохмісячного строку також показав початок гідролізу полімерного матриксу, що підтверджується наявністю поодиноких гігантських клітин сторонніх тіл і макрофагів, які розташовуються як у периферичних відділах імплантата, так і в його центральних відділах, чого не спостерігалось у тварин контрольної групи. Циркулярна структура колагенових волокон спостерігалась і на 2-місячному строку імплантації, що свідчило про їх щільний контакт з полімером.

### 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. Створений волокнистий матрикс завдяки своїй гігроскопічності та пористості створює своєрідний місток для проростання тканин і формування колагенового матриксу у трьохвимірному просторі.
3. Установлена біологічна рівновага між гідролізом полімерного матеріалу та синтезом нової тканини.

### Перспективи подальших досліджень

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

## ЛІТЕРАТУРА

1. Preimuschestva vremennyh nesymnyh frezerovannyh i polimerizovannyh plastmassovyh protezov na implantatah (2013) / Olesova VN, Dovbnev VA, Evstratov OV, Zveryaev AG, Zuev MD, Lesnyak AV i dr. // Klinicheskie issledovaniya, 1: 25–26 [in Russian].
2. Andryushechkina TN, Berchenko GN, Gioeva YuA, Zoryan EV, Atrushkevich VG. Vliyaniye kompleksnyh antigomotoksicheskikh preparatov na tkani parodonta v aktivnom periode ortodonticheskogo lecheniya: eksperimentalno-morfologicheskoe i klinicheskoe issledovanie // Klinicheskaya stomatologiya, 2015, 4: 42–49 [in Russian].
3. Balin VN, Balin DV, Iordanishvili AK, Muzykin MI. Osteostimuliruyushee deystvie ksenogenogo kostnogo materiala na reparativnyy osteogenez (eksperimentalno-morfologicheskoe issledovanie) // 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. Porjadok provedennia naukovykh ustanovamy doslidiv, eksperymentiv na tvarynakh // Ofitsiyni visnyk Ukrainy. – Ofits. vyd. (2012). – 24: 82 [in Ukrainian].
7. Bahrii MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. Metodyky morfologichnykh doslidzhen: monohrafiia. – Vinnytsia: Novaknyha (2016): 328 [in Ukrainian].

### Изучение морфометрических характеристик коллагеновых волокон после двух месяцев 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 посадки клеточных субстратов.

**Цель исследования** – экспериментально оценить характер развития коллагеновой подложки после двух месяцев 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 осуществлено с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и Statistica 5.5 (Multiple Regression) с использованием методов вариационной статистики и 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 имплантированных участки животного. Полученный волокнистый матрикс благодаря своей гигроскопичности и пористости создает своеобразный мостик для прорастания ткани и формирования коллагенового матрикса в трехмерном пространстве.

**Ключевые слова:** биополимер, биоимплантат, коллагеновые волокна.

### Study of morphometric characteristics of collagen fibers after 2 month 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. One of the important criteria that must be taken in to account when constructing substrate a matrix is its ability to form an optimal substrate for substrate.

**The purpose** of the study is to experimentally evaluate the nature of the collagen substrate development after 2 month of subcutaneous implantation of a biopolymer fibrous matrix. The study was conducted on 20 laboratory animals (rabbits), which were divided in to 2 groups. The first group of comparison: 10 animals were given an operative intervention, which included the formation of «pockets» in the subcutaneous tissue and suturing. In the second group: 10 animals were subcutaneously implanted biopolymer matrix in the back area between the shoulder blades. To study 9 segments were taken: one centrally located and 4 segments from paracentral and peripheral zones.

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.

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, collagen fibers.

**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 Миколайович** – 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. Тел.: (066) 36-50-516. 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: bezvuzekin23@gmail.com.