

Визначення імуногенності біоматеріалу Нанографт (NanoGraft) із зони аугментації верхньощелепних синусів

О. С. Косінов¹, О. М. Міщенко²

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Мета роботи – визначити імуногенність біоматеріалу Нанографт (NanoGraft) у складі біоптатів із зони аугментації верхньощелепних синусів шляхом морфологічного та імуногістохімічного оцінювання клітинної відповіді.

Матеріали і методи. У дослідженні взяли участь 22 пацієнти з частковою вторинною адентією, яким здійснили відкритий синус-ліфтинг, використали біоматеріал NanoGraft. Отримані під час імплантації біоптати фіксували, декальцинували та досліджували гістологічно й імуногістохімічно, застосовуючи маркери: CD8 (Т-цитотоксичні лімфоцити), FOXP3 (Т-регуляторні клітини), CD68 (макрофаги/остеокласти), CD163 (M2-макрофаги), SATB2 (остеогенні клітини), CD34 (ендотеліальні клітини). Запалення оцінювали за напівкількісною шкалою.

Результати. Гістологічно виявлено помірну кількість волокнистої сполучної тканини з фібробластами та судинами, ознаки формування остеонів і ремоделювання. Імуногістохімічно встановлено слабку лімфогістіоцитарну інфільтрацію з незначною кількістю CD8⁺ клітин, FOXP3⁺ Т-регулятори не виявлено. Біоматеріал не асоціювався з вираженою імунною реакцією. Визначено інтенсивне накопичення CD163⁺ M2-макрофагів, що свідчить про поляризацію макрофагів у регенеративний фенотип. Активна експресія SATB2 підтверджує остеоіндукцію, а значна кількість CD34⁺ клітин – ангиогенну активність.

Висновки. Біоматеріал NanoGraft характеризувався низькою імуногенністю, що підтверджено слабкою реакцією CD8⁺ лімфоцитів, відсутністю FOXP3⁺ клітин і переважанням протизапальних M2-макрофагів. Визначено остеоіндуквальну дію біоматеріалу, що сприяє формуванню кістки без розвитку хронічного запалення. Результати дослідження підтвердили біосумісність та ефективність матеріалу NanoGraft для аугментації синусів.

Ключові слова: кістковий композит, імуногенність, субантральна аугментація, макрофаги, остеогенез, ангиогенез.

Запорізький медичний журнал. 2025. Т. 27, № 6(153). С. 487-494

Evaluation of the NanoGraft biomaterial immunogenicity in maxillary sinus augmentation

O. S. Kosinov, O. M. Mishchenko

Aim. This study aimed to evaluate the immunogenicity of the Nano Graft biomaterial in biopsies obtained from the maxillary sinus augmentation zone using morphological and immunohistochemical assessment of the cellular response.

Materials and methods. The study included 22 patients with partial posterior edentulism who underwent open maxillary sinus floor elevation using the Nano Graft biomaterial. Biopsy samples collected at the time of implant placement were fixed, decalcified, and processed for histological and immunohistochemical analysis with the following markers: CD8 (cytotoxic T lymphocytes), FOXP3 (regulatory T cells), CD68 (macrophages/osteoclasts), CD163 (M2 macrophages), SATB2 (osteogenic cells), and CD34 (endothelial cells). Inflammatory activity was assessed using a semi-quantitative scale.

Results. Histological examination revealed fibrous connective tissue containing fibroblasts, microvascular structures, and signs of osteon formation and bone remodeling. Immunohistochemistry demonstrated a low-grade lymphohistiocytic infiltrate with scarce CD8⁺ cells and no detectable FOXP3⁺ regulatory T cells, indicating the absence of a pronounced immune response. An abundant presence of CD163⁺ M2 macrophages suggested polarization toward a regenerative phenotype. Strong SATB2 expression confirmed osteoinductive activity, while numerous CD34⁺ endothelial cells indicated active angiogenesis.

Conclusions. The Nano Graft biomaterial exhibited low immunogenicity, characterized by a mild CD8⁺ T-cell response, absence of FOXP3⁺ regulatory T cells, and predominance of anti-inflammatory M2 macrophages. Its osteogenic potential and pro-angiogenic effects support its biocompatibility and clinical applicability for maxillary sinus augmentation.

Keywords: bone composite, immunogenicity, subantral augmentation, macrophages, osteogenesis, angiogenesis.

Zaporozhye Medical Journal. 2025;27(6):487-494

Формування нової кістки під впливом трансплантатів – ключова мета синус-ліфтингу, що реалізується внаслідок остеогенезу, остеоіндукції та остеокондукції.

Остеогенез відбувається в аутотрансплантатах шляхом формування каркасу, факторів росту для остеогенезу та клітин, які виробляють матрикс кістки. Механізм остеоіндукції характерний для аутогенної кістки, алогенної кістки та ксенотрансплантатів, передбачає диференціювання остеогенних клітин у відповідь на остеоіндуктори – морфогенетичні білки кістки (BMP) або інші фактори росту. В основі механізму остеокондукції (остеопровідності), що передбачає використання тривимірних біологічних скафолдів, – утворення нової кістки поверх трансплантату. При цьому графт може зазнавати ревааскуляризації та інкорпорації у нову кісткову тканину [1,2].

Особливий науковий інтерес привертають питання щодо імуногенності біоматеріалів. Незалежно від специфіки використаних для аугментації кісткових трансплантатів, їх імплементація супроводжується імунологічною відповіддю на чужорідні субстанції. Показано, що, незважаючи на ретельну обробку, алогенна кістка зберігає потенційну антигенність, що індукує опосередковану Т-клітинами імунну відповідь проти алотрансплантату [3,4]. Це пов'язано з наявністю молекул основного комплексу гістосумісності (МНС) в алогенних кісткових блоках.

Зауважимо, що реакція імунної системи на кісткові трансплантати є комплексною, передбачає участь клітин і вродженого, і специфічного (адаптивного) імунітету. Активация імунної реакції зумовлена детекцією імунологічно чужорідного матеріалу дендритними клітинами. Вони відіграють важливу роль у розпізнаванні чужорідного матеріалу, запуску адаптивної імунної відповіді й формуванні толерантності до біоматеріалів [5].

Ці спеціалізовані антигенпрезентувальні клітини модулюють взаємодію між біоматеріалом та організмом людини. Активовані під час виконання маніпуляцій дендритні клітини залучаються до розпізнавання та процесингу антигенів чужорідного біоматеріалу з наступною активацією CD4⁺ та CD8⁺ Т клітин, стимуляцією їхньої проліферації та диференціювання в реактивні ефektorні клітини [6]. Втім, аналіз участі дендритних клітин у реалізації імунної відповіді на біоматеріал обмежений та ускладнений варіабельністю субтипів зрілих і незрілих дендритних клітин. Ба більше, оцінювання ефektorної ланки імунної відповіді, наприклад Т-цитотоксичних лімфоцитів, дає змогу отримати інформацію щодо вираженості імунної реакції.

Зауважимо, що імунні клітини забезпечують не тільки запальну відповідь на чужорідний матеріал. Виявлено зв'язок між метаболізмом кісткової тканини та імунною системою. Активовані Т-клітини можуть впливати на резорбцію кісткової тканини й остеогенез через дію інтерферону- γ (IFN- γ) або інтерлейкіну 17 (IL-17) [7]. Важливу роль відіграє і RANKL, який зв'язується з рецептором активатора ядерного фактору каппа- β (RANK) на попередниках остеокластів та індукує остеокластогенез з наступною резорбцією кісткової тканини [8].

Крім Т-лімфоцитів, важливу роль відіграють макрофаги, що мають визначальну роль у кістковому метаболізмі та ремоделюванні кісткової тканини [8]. Макрофаги – численна популяція імунних клітин, що

представлені у різних тканинах та органах. Традиційно макрофаги швидко надходять до пошкоджених ділянок або зон інфікування, де вони відіграють важливу роль як чинники вродженого імунітету [9]. Крім того, макрофаги регулюють гомеостаз тканин і реалізацію різних патофізіологічних процесів, включаючи вроджений та адаптивний імунітет, регенерацію, ангіогенез і канцерогенез [10]. При цьому макрофаги не тільки ініціюють запалення тканин, але й сприяють репарації та ремоделюванню тканин [11]. У кістковій тканині макрофаги – невід'ємний компонент процесу ремоделювання кістки, оскільки координують зв'язок між остеокластами й остеобластами, стимулюють анаболічні процеси, вкрай важливі для формування кісток [12].

Підтверджено, що макрофаги належать до спектра активованих фенотипів, а не дискретних стабільних субпопуляцій. Так, у багатьох дослідженнях показано гнучкість їхнього програмування, коли макрофаги переключаються з одного функціонального фенотипу на інший у відповідь на змінні сигнали мікросередовища. Схематично макрофаги класифікують на два підтипи: класично активовані прозапальні (M1-макрофаги) й альтернативно активовані протизапальні / регенеративні (M2-макрофаги) [9,10,13].

За фізіологічних умов більшість макрофагів мають фенотип M2, що допомагає підтримувати тканинний гомеостаз [14,15]. І резидентні M2, й запальні M1-макрофаги можуть впливати на формування кісток. Остеокласти зазвичай визначають як резидентні макрофаги в кістці. У результаті найновіших досліджень ідентифіковано велику популяцію макрофагів, що постійно містяться в кістках. Ці макрофаги називають остеомаками, вони можуть забезпечувати проанаболічну підтримку остеобластів і сприяти формуванню кістки [7,16].

У контексті імплантаційних процедур макрофаги опосередковують і репаративні процеси, і запальну відповідь на імплантовані біоматеріали [17]. Імплантати з біоматеріалів індукують поляризацію макрофагів M1, що призводить до запальної реакції на стороннє тіло, утворення гранульом [7]. Як і резидентні макрофаги, запальні макрофаги також можуть впливати на формування кісток [18]. Класично активовані макрофаги M1 можуть продукувати онкостатин M, що сприяє остеогенезу та мінералізації мезенхімальних стовбурових клітин (MSC) *in vitro* [18]. У результаті дослідження, що здійснили T. J. Fernandes et al., показано роль і M2-макрофагів у цьому процесі [19]. У наступних дослідженнях підтверджено, що альтернативно активовані макрофаги залишаються потужними індукторами утворення остеобластів [20].

З іншого боку, M1-макрофаги сприяють очищенню від клітинного детриту в зоні ушкодження та продукують низку цитокінів, включаючи TNF- α , IL-1 β , IL-6 і C-С хемокін-ліганд 2. TNF- α бере участь у рекрутуванні клітин та індукції вторинної запальної сигналізації [21]. IL-1 β , що синтезується макрофагами, може сприяти ангіогенезу та індукувати продукцію IL-6, що залучений до рекрутування мезенхімальних стовбурових клітин до місця пошкодження, стимуляції ангіогенезу й диференціювання остеобластів та остеокластів [7]. Макрофаги можуть також посилювати остеогенез шляхом продукування цитокінів: BMP-2, кісткового морфогенетичного білка 4, онкостатину та TGF- β 1 [9].

Онкостатин – цитокін сімейства IL-6, що індукуює остеогенну диференціацію мезенхімальних стовбурових клітин *in vitro* [7]. На початковій стадії запалення макрофаги продукують велику кількість онкостатину М, що сприяє прямому остеогенезу, а виснаження макрофагів спричиняє зниження онкостатину М, колагену типу 1 та сповільнення мінералізації кісток [9,10,22].

М2-макрофаги також можуть регулювати репаративні процеси через продукцію матриксних металопротеїназ і тканинних інгібіторів металопротеїназ, що контролюють динаміку позаклітинного матриксу [23]. Крім того, макрофаги виділяють специфічні хемокини, що рекрутують фібробласти, ТН2 клітини та регуляторні Т (Treg) клітини [24].

Отже, в разі стимуляції макрофаги диференціюються залежно від контексту у різні фенотипи, що можуть і спричиняти, і пригнічувати запалення та репаративні процеси.

Механізми впливу різних біоматеріалів на інтеграцію, ремоделювання та імунологічну реакцію після процедури аугментації залишаються предметом сучасних досліджень. У доволі обмеженій кількості праць наведено фактичну інформацію щодо реакції тканин пародонта та специфіки структурного складу в зоні аугментації синусів за допомогою алогенних біоматеріалів [25].

Гістологічне оцінювання відповіді на загоєння кістки після трансплантації різних видів кісткового біоматеріалу в організм людини полегшить використання хірургом матеріалу кісткового трансплантату й дасть змогу визначити час, необхідний для загоєння в зоні встановлення імплантату, відповідно до клінічної ситуації пацієнта. Вивчення реакції імунних, ангіогенних та остеогенних клітин на застосований біоматеріал Нанографт (NanoGraft) сприятиме поглибленню розуміння механізмів морфогенетичних ефектів кісткового біоматеріалу.

Отже, актуальними є дослідження для отримання клінічно релевантних даних, що інтегрують остеоімунологічні механізми з фактичною морфологією зони аугментації. Дослідження, що передбачає системну гістологічну й імуногістохімічну характеристику тканин після синус-ліфтингу з використанням алогенного біоматеріалу NanoGraft у різні терміни загоєння, кількісну морфометрію частки новоутвореної кістки, залишкового графту та фіброзної тканини, верифікацію ключових клітинних популяцій (дендритних клітин, М1/М2-макрофагів, остеобластів і остеокластів) і молекулярних сигналів остеогенезу, ангіогенезу та резорбції (наприклад, BMP-2, VEGF, RANKL/OPG) дасть змогу суттєво поглибити сучасні уявлення. Очікуваним практичним результатом є визначення предикторів сприятливої інтеграції графту й оптимальних строків встановлення імплантатів, підвищення відтворюваності клінічних результатів, зниження ризику ускладнень і формування доказових, персоналізованих протоколів вибору та застосування кісткових замінників у хірургічній стоматології.

Мета роботи

Визначити імуногенність біоматеріалу Нанографт (NanoGraft) у складі біопатів із зони аугментації верхньощелепних синусів шляхом морфологічного та імуногістохімічного оцінювання клітинної відповіді.

Матеріали і методи дослідження

Для оцінювання морфогенетичних ефектів та імуногенності біоматеріалу NanoGraft, використаного для синус-ліфтингу, здійснили гістологічне дослідження біопатів із зон інтересу.

Дослідження здійснили на клінічних базах кафедри стоматології післядипломної освіти Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (КНП «Міська лікарня екстреної та швидкої медичної допомоги № 5» ЗМР і стоматологія «Ексіма»). У дослідженні взяли участь 22 пацієнти, які перебували на реабілітації з приводу вторинної часткової адентії шляхом дентальної імплантації. Пацієнтам виконано субантральну аугментацію в ділянці верхньощелепної пазухи.

Пацієнти, яких залучили до дослідження, були віком від 39 до 75 років, не мали загальносоматичних захворювань, не отримували системні антибіотики протягом щонайменше 3 місяців до початку лікування.

Комісія з питань біоетики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету здійснила експертизу матеріалів, що наведені у статті, порушень біоетичних норм, викладених у чинних міжнародних і українських установчих документах щодо медичних досліджень, не виявлено (протокол від 19 червня 2025 року № 8). Усі пацієнти надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні та обробку, публікацію анонімізованих даних у межах наукової роботи.

Доступ до аугментації отримано під час встановлення імплантатів. Біопсійний матеріал зафіксовано у 10 % розчині забуференого нейтрального формаліну протягом 48–72 годин. Декальцинацію матеріалу здійснили, застосувавши швидкий декальцифікатор Kaltek (Італія). Після декальцинації проводку біоматеріалу (дегідратація, просочування парафіном) здійснили автоматизовано за стандартним протоколом у гістопроекторі (Milestone LOGOS Microwave Hybrid Tissue Processor, Milestone, Італія). Після цього матеріал залито в парафін (Paraplast), парафінові блоки отримано на станціях заливки та виготовлення Thermo Scientific HistoStar (Thermo Fisher Scientific, США). Гістологічні зрізи завтовшки 4 мкм одержали, застосувавши напівавтоматизований ротаційний мікромом Thermo Scientific HM 340E.

Різні види імунних клітин візуалізовано імуногістохімічним методом. Для дослідження виготовлено зрізи завтовшки 4 мкм, які надалі депарафінізували, інкубуючи по 5 хвилин у двох змінах ксилолу, етанолу й промиваючи після цього в проточній воді. Для демаскування використано прилад PT-Link (DAKO). Антигени демаскували за температури 98 °C протягом 30 хв. Після цього зрізи охолоджували до 60 °C. Для блокування ендогенної пероксидази зрізи 5 хв інкубували з peroxidase blocking reagent (DAKO, EnVision FLEX) – 0,03 % перекис водню. Після промивання (pH 7.2, DAKO EnVision FLEX, Agilent, Santa Clara, CA, США) зрізи інкубували з первинними антитілами. Інкубацію здійснили за кімнатної температури протягом 30 хв. Після цього зрізи знову промивали в TRIS-HCL буфері. Для візуалізації імуногістохімічної реакції застосували полімерну систему детекції EnVision FLEX (DAKO, Agilent, Santa Clara, CA, США). Зрізи інкубували безпосередньо з полімером, кон'югованим із пероксидазою хрому (HRP, horseradish

Таблиця 1. Характеристика біомаркерів, використаних під час імуногістохімічного дослідження

Назва	Характеристика	Виробник	Клон
CD8	Маркер Т-цитотоксичних лімфоцитів	DAKO	C8/144B
FOXP3	Маркер Т-регуляторних клітин	Cell Marque	EP340
CD68	Лізосомальний глікопротеїн, маркер макрофагів, що також експресується в остеокластах (J. W. Ashley et al., 2011) [26]	DAKO	KP1
CD163	Маркер альтернативно активованих або протизапальних макрофагів	Cell Marque	MRQ-26
CD34	Маркер ангіогенних клітин (ендотеліоцити судин)	DAKO	QBEnd 10
SATB2	Маркер остеогенного диференціювання, визначається в остеогенних клітинах-попередниках (пре-остеобластах) та остеобластах (T. Dowrey et al., 2019) [27]	Cell Marque	EP281

peroxidase). Для виявлення імунокомплексів використано діамінобензидин (DAB, 3,3'-diaminobenzidine) як хромоген, який після окиснення під дією HRP має коричневе забарвлення. Після візуалізації препарати промивали у проточній воді. Ядра контрастували гематоксиліном Маєра протягом 1 хвилини, надалі промивали. Після висушування зрізи монтували під покривне скло, застосовуючи монтувальне середовище Richard-Allan Scientific Mounting Medium (Thermo Fisher, Waltham, MA, США).

Для оцінювання потенційного імуногенного ефекту біоматеріалу, використаного для аугментації, виявляли й кількісно визначали клітини вродженого та адаптивного імунітету. Для цього оцінювали реакцію макрофагів (CD68⁺). Крім того, проаналізовано реакцію імунореактивних (CD8⁺) та імносупресивних (FOXP3⁺) Т-лімфоцитів. Для дослідження ангіогенезу проаналізували кількість і розподіл судин, визначили кількість клітин, позитивних за маркером ангіогенних клітин CD34.

Для оцінювання ремоделювання кістки та реакції остеогенних прогеніторів застосовано маркер макрофагів / остеокластів CD68 і маркер остеогенного диференціювання SATB2, що активується при індукції остеогенного диференціювання та активно експресується зі стадії преостеобластів. Для візуалізації різних типів клітин використано маркери: CD8, FOXP3, CD68, CD163, SATB, CD34 (табл. 1).

Крім візуалізації клітин різних ліній, враховували щільність їх розташування, використовуючи напівкількісний метод: 0 – негативна реакція; 1 – мала кількість імунопозитивних клітин; 2 – помірна кількість імунопозитивних клітин; 3 – велика кількість імунопозитивних клітин [28]. Оцінюючи імунні клітини (CD8, CD68, FOXP3), не враховували клітини в межах судин.

Цифрові фотографії імуногістохімічних препаратів одержано з використанням цифрової камери (Leica Microsystems), інтегрованої зі світловим мікроскопом Leica (Leica Microsystems).

Під час гістоморфометричного аналізу використано програмне забезпечення Leica Application Suite (LAS) (Leica Microsystems GmbH). Всі вимірювання здійснили, застосовували відповідні інструменти, результати зберігали в LAS, експортували в Excel для виконання статистичного аналізу.

Результати

Сполучна тканина у складі біопатів із зони аугментації представлена прошарками пухкої волокнистої сполучної тканини з численними клітинами фібробластичного ряду, що мали світлі овальні ядра та були оточені матриксом,

багатим на основну аморфну речовину та тонкі пучки колагенових волокон. Крім того, в окремих ділянках визначено формування товстих пучків колагенових волокон, проте зони фіброзу виявляли рідко, в окремих ділянках. У результаті аналізу клітинного складу у сполучній тканині визначено макрофаги та дифузно розташовані лімфоцити, що мали кулясті щільні ядра з переважанням гетерохроматину.

Важливий компонент сполучної тканини між кістковими трабекулами – численні кровоносні судини. Оскільки ангіогенез є вкрай важливим фактором для сталого остеогенезу, стан мікроциркуляторного русла у біоптатах зон синус-ліфтингу набуває особливого значення. У зоні поблизу трабекул визначено юкстатрабекулярне розташування тонкостінних кровоносних судин, що відіграють ключову роль у забезпеченні умов для остеогенного диференціювання клітин та утворення кісткового матриксу.

У результаті імуногістохімічного дослідження, що здійснене з використанням маркера клітин ангіо-скульної лінії CD34, виявлено: крім ендотеліальної вистилки численних судин, дрібні групи CD34⁺ визначали як дрібні скупчення, що формували стінку новоутворених судин із вузьким (не завжди візуалізованим) просвітом (рис. 1).

Оцінивши інтенсивність запальної інфільтрації біопатів, визначили переважання слабкої дифузійної лімфогістіоцитарної інфільтрації, що за напівкількісною шкалою відповідала слабкому ступеню інфільтрації та включала незначну кількість CD8⁺ клітин (рис. 2).

Дифузно розташовані пухкі скупчення лімфоцитів і макрофагів визначали переважно периваскулярно. При цьому не виявлено зв'язок між вираженістю інфільтрації та залишками біоматеріалу NanoGraft. У результаті аналізу клітинного складу інфільтратів під час імуногістохімічного дослідження встановлено, що їхнім основним компонентом є CD8⁺ лімфоцити (рис. 3). Зауважимо, що у складі сполучної тканини не виявлено FOXP3⁺ Т-регуляторні клітини.

Аналіз клітинного складу біопатів дав змогу встановити імунологічну інертність нового композитного матеріалу ГАП-ТКФ, використання якого асоційоване зі слабкою реакцією CD8⁺лімфоцитів і M2-поляризацією макрофагів. Зазначимо, що сполучна тканина багата на макрофаги, серед них – чимало CD163⁺-клітин, що за фенотипом належать до M2-протизапальних макрофагів. CD163⁺-клітини формували щільну сітку, що пронизувала ділянки навколо трабекул і кровоносних судин (рис. 4).

Макрофаги цього типу є протизапальними та можуть продукувати широкий спектр факторів росту, і тому,

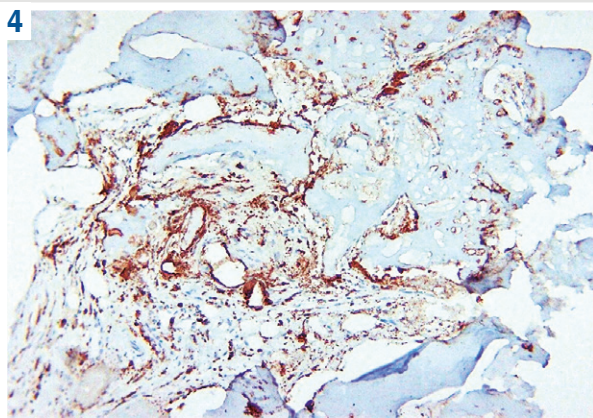
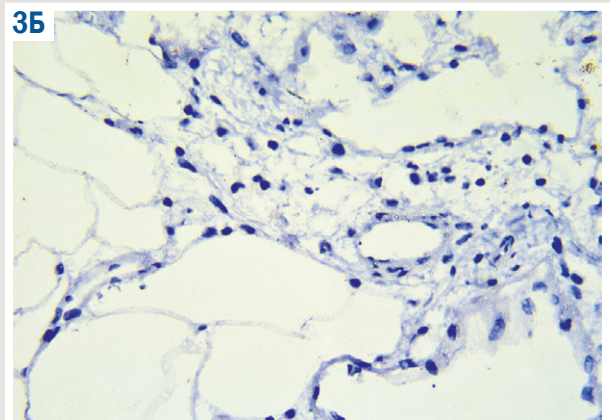
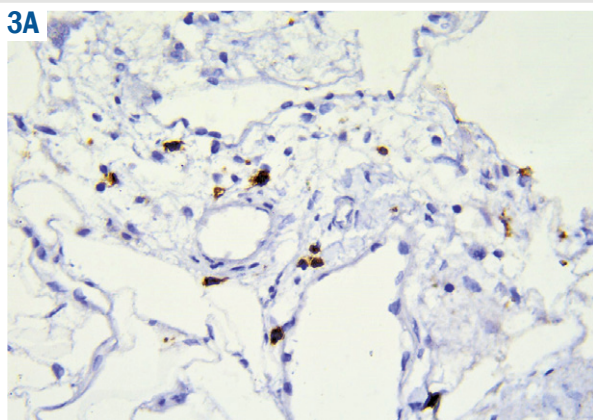
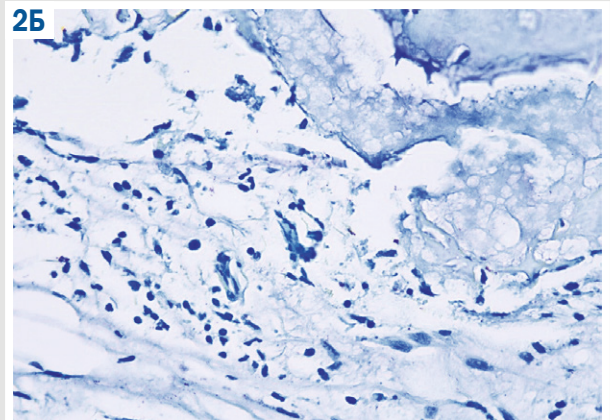
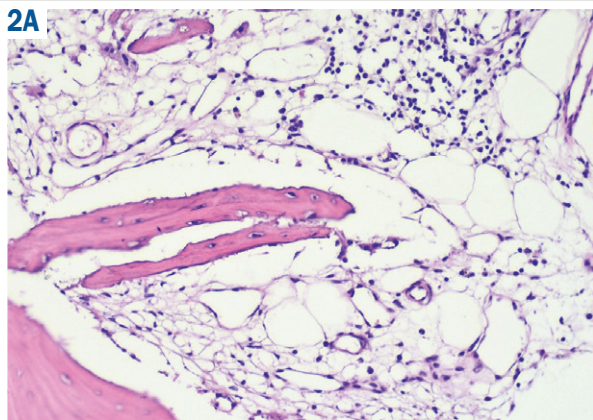
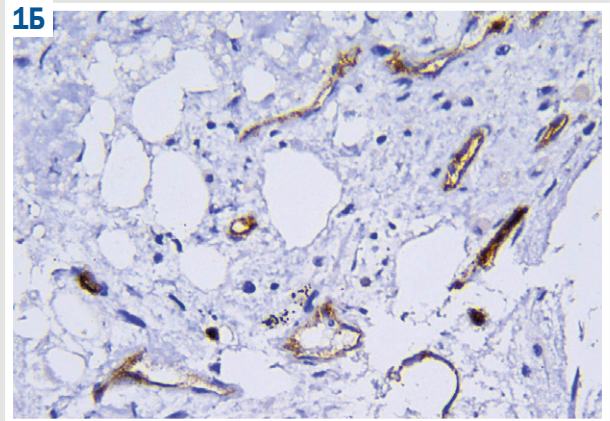
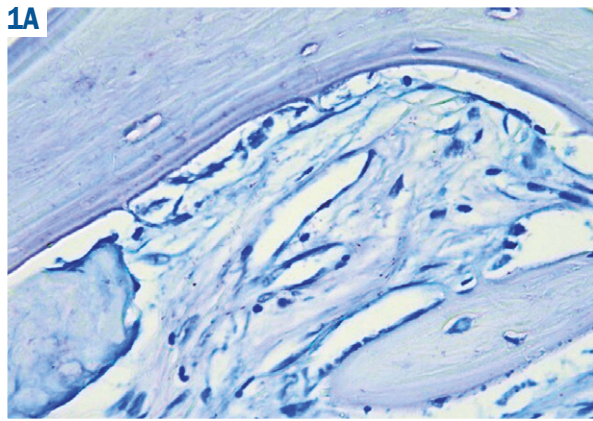


Рис. 1. Перитрабекулярна сполучна тканина з численними кровоносними судинами мікроциркуляторного русла (А), що вистелені CD34⁺ клітинами (Б). А: забарвлення толуїдиновим синім, Б: імуногістохімічне забарвлення з використанням моноклональних антитіл до CD34. 36. ×400.

Рис. 2. Слабка лімфогістіоцитарна інфільтрація сполучної тканини у просторах між кістковими трабекулами. А: забарвлення гематоксилином та еозином, зб. ×100; Б: забарвлення толуїдиновим синім, зб. ×400.

Рис. 3. Незначна кількість CD8⁺ лімфоцитів у складі сполучної тканини біопатів із зон синус-ліфтингу, FOXP3⁺ Т-регуляторні клітини не виявлено. Імуногістохімічне забарвлення з використанням моноклональних антитіл до CD8 і FOXP3, зб. ×400.

Рис. 4. Значна кількість M2-макрофагів у складі сполучної тканини біопатів із зон аугментації синусів. Імуногістохімічне забарвлення з використанням моноклональних антитіл до CD163. 36. ×100.

імовірно, їхня велика кількість сприяла переважанню процесів остеогенезу та толерантності до біоматеріалу, що використаний для відкритого синус-ліфтингу.

Дослідження будови фрагментів із зон аугментації дало змогу встановити ознаки ефективного остеогенезу. Використаний для синус-ліфтингу біоматеріал характеризувався біостимулювальним (остеоіндукувальним) ефектом. Аугментація синусів новим композитним матеріалом ГАП-ТКФ сприяла стимуляції остеогенного диференціювання клітин та активному остеогенезу з ознаками ремоделювання та заміщення грубоволокнистої фіброзної кістки пластинчастою кістковою тканиною з утворенням остеонів.

Отже, у результаті оцінювання структури та клітинного складу сполучної тканини встановлено слабку імунну інфільтрацію, що свідчить про низьку імуногенність NanoGraft – біоматеріалу, що використаний для аугментації синусів.

Обговорення

За результатами гістологічного й імуногістохімічного дослідження, використання NanoGraft асоційоване з ознаками незначної запальної реакції. У межах біоптатів визначено невеликі дифузійні лімфогістіоцитарні інфільтрати, що, на думку різних авторів, можуть бути наслідком транзитornoї слабкої імунної реакції як відповідь на uszkodження в зоні аугментації та нормального процесу ремоделювання кістки [29]. При цьому визначено незначну кількість CD8⁺ Т-клітин, роль яких в остеогенезі й ремоделюванні кісток також підтверджено [30]. Зіставні результати одержано під час дослідження, яке здійснили Ö. Solakoglu et al. Автори виявили незначну кількість інфільтратів, а також CD3, CD4⁺ та CD8⁺ лімфоцити у їхньому складі за умов використання різних варіантів кісткових алографтів [2].

Зауважимо, що під час дослідження біоптатів тканин із зон аугментації не виявлено Т-регуляторних клітин, що регулюють за механізми імунної толерантності. Результати дослідження можуть свідчити про первинну низьку імуногенність використаного кісткового матеріалу NanoGraft. Не можна виключити і роль інших механізмів протизапальної дії, що пов'язані з активністю різних підтипів макрофагів.

Згідно з результатами нашого дослідження, в біоптатах із зони аугментації визначено численні макрофаги – і CD68⁺, і CD163⁺. Особливий науковий інтерес викликала щільна мережа CD163⁺ M2-макрофагів. У дослідженні Z. Xia et al. показано: макрофаги – тип клітин, що домінує у складі інфільтрації та формується у відповідь на імплантацію біоматеріалу й у м'які, й у тверді тканини [31]. Активація макрофагів, що є невід'ємною частиною імунної системи, відбувається при будь-яких інтервенціях з використанням біологічних матеріалів як складова запальної відповіді і реакції на чужорідний матеріал. Крім того, макрофаги відіграють важливу роль у біодеградації біоматеріалів, що використовують під час імплантації, через ініціацію механізмів фагоцитозу та позаклітинної деградації.

Зазвичай активовані макрофаги (макрофаги M1) належать до прозапального підтипу. Ці клітини мають виразну міграційну та фагоцитарну активність, чис-

ленні лізосоми, високу активність iNOS і секретують прозапальні цитокіни (IL-1b, TNF α , IL-8) [11]. Крім того, M1-макрофаги пов'язані з іншими клітинами. Наприклад, продукування інтерферону γ (IFN γ) Т-лімфоцитами супроводжується активацією макрофагів у прозапальний тип [20]. Альтернативно активовані макрофаги (M2-тип) мають протизапальну функцію та регулюють процеси репарації та ремоделювання тканин. Поляризація диференціювання макрофагів у бік M2-типу, як правило, спричинена дією цитокінів IL-13 і IL-4. При цьому активовані M2-макрофаги продукують широкий спектр протизапальних цитокінів і факторів росту [7].

Після пошкодження тканин альвеолярних відростків, що відбувається під час процедури синус-ліфтингу, макрофаги одразу відповідають на інтервенцію. Їхня активація при цьому супроводжується трансформацією в запальний фенотип і секрецією прозапальних медіаторів, як-от фактора некрозу пухлин (TNF), оксиду азоту (NO) та IL-1, що беруть участь не тільки в активації різних антимікробних механізмів, але й у стимуляції окисних процесів, які можуть стимулювати вторинну альтерацію [7]. Інші медіатори, що продукують активовані макрофаги, включають IL-12 і IL-23, які впливають на поляризацію клітин TH1 і TH17; це може призводити до розвитку хронічного запалення й аутоімунних процесів. Зазначимо, що наявність у зоні інтервенції чужорідного матеріалу кісткового трансплантату може підтримувати тривалу активацію M1-макрофагів. Враховуючи продукцію широкого спектра ферментів та активних радикалів кисню, виразна активація M1-типу макрофагів може призводити до uszkodження кістки, розвитку хронічного запалення й остеолітичних процесів [7].

На відміну від прозапальних M1-макрофагів, M2-тип характеризується протизапальною активністю, відіграє важливу роль у репаративних процесах. Вони також є антагоністами M1-макрофагів і «перемикачами» з фази запалення до репарації та відновлення гомеостазу тканин. Показано, що макрофаги M1 можуть самі «перетворюватися» на протизапальні макрофаги та стимулювати регенеративні процеси [32]. Макрофаги M2 продукують фактори росту, що стимулюють проліферацію та диференціювання клітин різних ліній, включаючи фібробласти, кератиноцити, ендотеліоцити та навіть остеогенні клітини. Трансформувальний фактор росту- β 1 (TGF β 1) і фактор росту тромбоцитарного походження (PDGF) сприяють диференціації фібробластів у міофібробласти, посилюючи експресію тканинних інгібіторів металопротеїназ, що блокують деградацію позаклітинного матриксу, та безпосередньо стимулюючи синтез інтерстиціальних фібрилярних колагенів. VEGF, що продукують M2-макрофаги, є стимулятором проліферації ангіогенних клітин та ангіогенезу [7,9].

Макрофаги відіграють вирішальну роль у формуванні та мінералізації кісток. Зменшення кількості макрофагів у первинних культурах кісткових остеобластів *in vitro* затримує остеогенну диференціацію та мінералізацію [33,34]. У трансгенній мишачій моделі Mafia (індукованого fas апоптозу), короточасне виснаження макрофагів при обробці синтетичним лігандом *in vivo* призводило до кількісного зменшення ділянок остеогенезу [35]. Тривале виснаження макрофагів *in vivo* у молодих (3–21 день) і дорослих (16–22 місяців) мишей спричиняло форму-

вання остеопенічного фенотипу з низькими рівнями сироваткових маркерів обміну кісткової тканини [36]. У кістках зафіксовано помітне зниження анаболічної дії паратиреоїдного гормону, що свідчить про критичну роль кісткових макрофагів в анаболізмі кісткової тканини. Це дослідження підтвердило гіпотезу щодо участі макрофагів у підтримці остеогенезу.

Незалежне дослідження на мишах із дефіцитом лізоциму М також дало змогу встановити, що внутрішньоутробне виснаження макрофагів призводить до затримки росту скелета та розвитку остеопорозу [24].

Висновки

1. У результаті гістологічного аналізу біоптатів із ділянки аугментації не виявлено вираженої імунної відповіді, що підтверджує біосумісність композитного матеріалу.

2. Використання ГАП-ТКФ (NanoGraft) асоційоване з низькою імунною активністю з боку CD8⁺ Т-лімфоцитів і переважанням M2-поляризації макрофагів. На підставі цих даних зробили висновок про його імунологічну інертність.

3. Домінування M2-макрофагів із продукуванням регенеративних факторів створює умови для активації остеогенезу та формування толерантності до імплантованого біоматеріалу. Це визначає доцільність його застосування під час відкритого синус-ліфтингу.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні та підтвердженні біостимулювального й остеоіндукувального ефекту матеріалу NanoGraft під час операції з синус-ліфтингу.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медико-фармацевтичного університету «Вдосконалення діагностики, терапевтичного, ортопедичного і хірургічного лікування найбільш поширених стоматологічних захворювань та їх ускладнень у населення, постраждалого від воєнних дій», державний реєстраційний № 0124U004521 (2024–2029 рр.).

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 07.07.2025

Після доопрацювання / Revised: 03.09.2025

Схвалено до друку / Accepted: 09.09.2025

Відомості про авторів:

Косінов О. С., PhD аспірант каф. стоматології післядипломної освіти, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-0283-5047

Мищенко О. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. стоматології післядипломної освіти, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6378-7061

Information about the authors:

Kosinov O. S., MD, PhD student at the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Mishchenko O. M., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Dentistry of Postgraduate Education, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.



Олег Мищенко (Oleg Mishchenko)
dr.mishchenko@icloud.com

References

- Baj A, Trapella G, Lauritano D, Candotto V, Mancini GE, Gianni AB. An overview on bone reconstruction of atrophic maxilla: success parameters and critical issues. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2016 Apr-Jun;30(2 Suppl 1):209-15.
- Solakoglu Ö, Götz W, Heydecke G, Schwarzenbach H. Histological and immunohistochemical comparison of two different allogeneic bone grafting materials for alveolar ridge reconstruction: A prospective randomized trial in humans. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(5):1002-16. doi: 10.1111/cid.12824
- Fretwurst T, Gad LM, Steinberg T, Schmal H, Zeiser R, Amler AK, et al. Detection of major histocompatibility complex molecules in processed allogeneic bone blocks for use in alveolar ridge reconstruction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;S2212-4403(18)30054-3. doi: 10.1016/j.oooo.2018.01.018
- Yang F, Liu H, Wei Y, Xue R, Liu Z, Chu X, Tian X, Yin L, Tang H. Antibacterial brush polypeptide coatings with anionic backbones. *Acta Biomater*. 2023 Jan 1;155:359-369. doi: 10.1016/j.actbio.2022.11.020
- Yu H, Tian Y, Wang Y, Mineishi S, Zhang Y. Dendritic Cell Regulation of Graft-Vs.-Host Disease: Immunostimulation and Tolerance. *Front Immunol*. 2019;10:93. doi: 10.3389/fimmu.2019.00093
- Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, Rivera AJ, Emerson SG. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8⁺ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2002;109(10):1335-44. doi: 10.1172/JCI14989
- Gu Q, Yang H, Shi Q. Macrophages and bone inflammation. *J Orthop Translat*. 2017;10:86-93. doi: 10.1016/j.jot.2017.05.002
- Baht GS, Vi L, Alman BA. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(2):138-45. doi: 10.1007/s11914-018-0423-2
- Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. 2011;89(4):557-63. doi: 10.1189/jlb.0710409
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-37. doi: 10.1038/nri3073
- Chow SK, Wong CH, Cui C, Li MM, Wong RM, Cheung WH. Modulating macrophage polarization for the enhancement of fracture healing, a systematic review. *J Orthop Translat*. 2022;36:83-90. doi: 10.1016/j.jot.2022.05.004
- Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone*. 2018;106:78-89. doi: 10.1016/j.bone.2015.10.019
- Li J, Qu Y, Chu B, Wu T, Pan M, Mo D, et al. Research Progress on Biomaterials with Immunomodulatory Effects in Bone Regeneration. *Adv Sci (Weinh)*. 2025 Sep;12(33):e01209. doi: 10.1002/advs.202501209
- Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 2004;76(3):509-13. doi: 10.1189/jlb.0504272
- Jewell CM, Collier JH. Biomaterial interactions with the immune system. *Biomater Sci*. 2019 Feb 26;7(3):713-714. doi: 10.1039/c8bm90063a
- Batoon L, Millard SM, Raggatt LJ, Pettit AR. Osteomacs and Bone Regeneration. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(4):385-95. doi: 10.1007/s11914-017-0384-x
- Lampiasi N, Russo R, Zito F. The Alternative Faces of Macrophage Generate Osteoclasts. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9089610. doi: 10.1155/2016/9089610
- Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(8):706-18. doi: 10.1016/j.jcms.2012.01.002
- Fernandes TJ, Hodge JM, Singh PP, Eeles DG, Collier FM, Holten I, et al. Cord blood-derived macrophage-lineage cells rapidly stimulate osteoblastic maturation in mesenchymal stem cells in a glycoprotein-130 dependent manner. *PLoS One*. 2013;8(9):e73266. doi: 10.1371/journal.pone.0073266
- Horwood NJ. Macrophage Polarization and Bone Formation: A review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;51(1):79-86. doi: 10.1007/s12016-015-8519-2
- Ross EA, Devitt A, Johnson JR. Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front Immunol*. 2021;12:708186. doi: 10.3389/fimmu.2021.708186
- Guihard P, Boutet MA, Brounais-Le Royer B, Gamblin AL, Amiaud J, Renaud A, et al. Oncostatin m, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury. *Am J Pathol*. 2015;185(3):765-75. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.008

23. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69. doi: [10.1038/nri2448](https://doi.org/10.1038/nri2448). Erratum in: *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):460.
24. Vi L, Baht GS, Whetstone H, Ng A, Wei Q, Poon R, et al. Macrophages promote osteoblastic differentiation in-vivo: implications in fracture repair and bone homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2015;30(6):1090-102. doi: [10.1002/jbmr.2422](https://doi.org/10.1002/jbmr.2422)
25. Anwar Z, McLeod NM, Van den Bosch P, Cairns M. A review of the use of patient reported outcome measures (PROMS) in temporomandibular joint (TMJ) surgery. *J Craniomaxillofac Surg*. 2024;52(2):181-7. doi: [10.1016/j.jcms.2023.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jcms.2023.11.005)
26. Ashley JW, Shi Z, Zhao H, Li X, Kesterson RA, Feng X. Genetic ablation of CD68 results in mice with increased bone and dysfunctional osteoclasts. *PLoS One*. 2011;6(10):e25838. doi: [10.1371/journal.pone.0025838](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025838)
27. Dowrey T, Schwager EE, Duong J, Merkuri F, Zarate YA, Fish JL. Satb2 regulates proliferation and nuclear integrity of pre-osteoblasts. *Bone*. 2019;127:488-98. doi: [10.1016/j.bone.2019.07.017](https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.07.017)
28. Konermann A, Götz W, Le M, Dirk C, Lossdörfer S, Heinemann F. Histopathological Verification of Osteoimmunological Mediators in Peri-Implantitis and Correlation to Bone Loss and Implant Functional Period. *J Oral Implantol*. 2016;42(1):61-8. doi: [10.1563/aaid-joi-D-13-00355](https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-13-00355)
29. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res*. 2012;347(3):567-73. doi: [10.1007/s00441-011-1205-7](https://doi.org/10.1007/s00441-011-1205-7)
30. Kalyan S. It May Seem Inflammatory, but Some T Cells Are Innately Healing to the Bone. *J Bone Miner Res*. 2016;31(11):1997-2000. doi: [10.1002/jbmr.2875](https://doi.org/10.1002/jbmr.2875)
31. Xia Z, Triffitt JT. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed Mater*. 2006;1(1):R1-9. doi: [10.1088/1748-6041/1/1/R01](https://doi.org/10.1088/1748-6041/1/1/R01)
32. Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Müller R, Wu AC, et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res*. 2011;26(7):1517-32. doi: [10.1002/jbmr.354](https://doi.org/10.1002/jbmr.354)
33. Chang B, Ahuja N, Ma C, Liu X. Injectable scaffolds: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration. *Mater Sci Eng R Rep*. 2017;111:1-26. doi: [10.1016/j.mser.2016.11.001](https://doi.org/10.1016/j.mser.2016.11.001)
34. Croissant JG, Fatieiev Y, Khashab NM. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Adv Mater*. 2017;29(9). doi: [10.1002/adma.201604634](https://doi.org/10.1002/adma.201604634)
35. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2008;181(2):1232-44. doi: [10.4049/jimmunol.181.2.1232](https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1232)
36. Cho SW, Soki FN, Koh AJ, Eber MR, Entezami P, Park SI, et al. Osteal macrophages support physiologic skeletal remodeling and anabolic actions of parathyroid hormone in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(4):1545-50. doi: [10.1073/pnas.1315153111](https://doi.org/10.1073/pnas.1315153111)