

Біохімічні показники сироватки крові щурів різного віку після заповнення дефекту в метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами, насиченими мезенхімальними стовбуровими клітинами

П. М. Воронцов¹*, А. Ф., М. О. Корж¹*, А. Ф., Ф. С. Леонтьєва¹*, Е., В. О. Туляков¹*, В. С. D

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М. І. Ситенка НАМН України», м. Харків

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 – на основі аналізу біохімічних показників метаболізму сполучної тканини в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг метаболічних процесів після заповнення дефекту в метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами, що насичені алогенними мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК).

Матеріали та методи. Використали модель створення транскортикального дефекту критичного розміру в метафізі стегнової кістки білих щурів. Дослідили вміст глікопротеїнів, загальних хондроїтинсульфатів, загального білка кальцію, активності лужної та кислої фосфатази у сироватці крові.

Результати. Порівнюючи з показниками щурів без МСК, на 28 добу в 3-місячних тварин із МСК зафіксували виразні ознаки формування сполучної тканини й активність кісткової резорбції. Про це свідчили перевищення в сироватці крові вмісту хондроїтинсульфатів та активність кислої фосфатази. На 90 добу в цієї групи щурів під впливом МСК виявили ознаки зниження формування кісткової тканини з меншою активністю лужної фосфатази в сироватці крові. На 90 добу експерименту в 3-місячних щурів із МСК зафіксовано ознаки хронізації запального процесу з більшим вмістом глікопротеїнів у сироватці крові порівняно з даними тварин без МСК. У 12-місячних щурів із МСК на 14 добу виявили ознаки резорбції кісткової тканини, зокрема в сироватці крові визначили більшу активність кислої фосфатази при меншому формуванні сполучної тканини, а також нижчий вміст хондроїтинсульфатів. На 28 добу вплив МСК у 12-місячних тварин виявили за уповільненням формування кістки зі зниженням активності лужної фосфатази. На 90 добу в цих тварин зафіксовано активацію формування сполучної тканини з більшим вмістом хондроїтинсульфатів.

Висновки. У 3-місячних тварин біохімічні показники, що вивчали, характеризувалися більшою лабільністю. Перебіг фаз регенерації відбувався швидше у 3-місячних тварин, а також у тварин з алоімплантатами без МСК. Введення алогенних МСК разом з алотрансплантатом відразу після ушкодження кістки незалежно від віку спричиняє уповільнення кісткоутворення та надлишкове формування сполучної тканини, тому комбінацію алогенних МСК з алогенним кістковим імплантатом недоцільно використовувати при «свіжих» переломах.

Ключові слова:

алоімплантат, мезенхімальні стовбурові клітини, дефект, моделювання, регенерація, біохімія, сполучна тканина.

Запорізький медичний журнал. 2023. Т. 25, № 5(140). С. 421-427

*E-mail: vorontsov1963@ukr.net

Serum biochemical indicators in rats of different ages after replacing femoral metaphysis defects with allogeneic bone implants saturated with mesenchymal stem cells

P. M. Vorontsov, M. O. Korzh, F. S. Leontieva, V. O. Tuliakov

The aim of the study: to evaluate the course of metabolic processes after replacing femoral metaphysis defects with allogeneic bone implants saturated with allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) based on the analysis of serum biochemical indicators of connective tissue metabolism in laboratory rats.

Material and methods. A critical-sized transcortical femoral defect model in the femur metaphysis of white rats was used. Blood serum concentrations of glycoproteins, total chondroitin sulfates, total protein and calcium, alkaline and acid phosphatase activity were measured.

Results. On the 28th day, in 3-month-old animals with MSC, in comparison with the data of rats without MSC, clear signs of connective tissue formation and bone resorption activity were observed, as evidenced by an increase in serum chondroitin sulfates and acid phosphatase activity. On the 90th day, this group of rats under the influence of MSCs showed signs of decreased bone tissue formation with lower serum activity of alkaline phosphatase. In 3-month-old rats with MSC, signs of the inflammatory process chronization with higher serum concentrations of glycoproteins were detected on the 90th day of the experiment in comparison with data from animals without MSC. In 12-month-old rats with MSCs, signs of bone resorption were documented on the 14th day, which were manifested by a higher serum activity of acid phosphatase with less formation of connective tissue and lower concentrations of chondroitin sulfates. On the 28th day, the effect of MSCs in 12-month-old animals was manifested in the form of a slowdown in bone formation with a decrease in alkaline phosphatase activity. On the 90th day, the connective tissue formation was activated with higher concentrations of chondroitin sulfates in these animals.

Conclusions. The studied biochemical indicators in 3-month-old animals showed greater lability. The regeneration phases were faster in 3-month-old animals as well as in animals with alloimplants without MSCs. Injections of allogeneic MSCs together with an allograft immediately after a bone damage, regardless of age, caused signs of bone formation slowing and excessive formation of connective tissue, therefore, the combination of allogeneic MSCs with an allogeneic bone implant is not advisable to use in fresh fractures.

Key words:

alloimplant, mesenchymal stem cells, defect, modeling, regeneration, biochemistry, connective tissue.

Zaporozhye medical journal, 2023. 25(5), 421-427

Для видалення жирів кістку витримували в розчині 96 % етилового спирту та 100 % діетилового ефіру (1:1) протягом 2 годин. Для зниження його антигенних властивостей, отриманих від залишкового неколагенового білка, кістки зберігали в розчині солей (0,45 М хлориду натрію, 0,1 М динатрію гідрофосфату) при -40°C протягом ночі. Потім стегнові кістки виймали та сушили за допомогою конвекційного нагрівача протягом 4–5 днів. Алотрансплантати (діаметр – 3 мм, висота – 3 мм) виготовляли з дистального метафіза стегнової кістки та стерилізували дозами опромінення 15–25 кГр за допомогою лінійного прискорювача ЛУ-10 (10 MeV; 10 кВт) [20]. Після стерилізації чотири зразки з кожної партії імплантатів перевіряли на стерильність, використовуючи рідке тіогліколатне середовище для бактеріального культивування. Алотрансплантати вважали стерильними, якщо в живильному середовищі не було проростання колоній мікроорганізмів.

Методика отримання алогенних МСК. Жирову тканину одержували із сальника щурів, переносили до стерильної пробірки типу Falcon 15 мл з середовищем DMEM (Biowest, Lo102-500, Франція) у співвідношенні об'єму тканини та ферментів 1:5. Надалі переносили у стерильну чашку Петрі, де за допомогою ножиць жирову тканину подрібнювали на шматочки діаметром близько 2 мм. Фрагменти піддавали дезагрегації в суміші ферменту колагенази I типу (Worthington, 49P19751, США) у концентрації 0,075 мг/мл і розбавленого до необхідної концентрації буферного розчину Dulbecco's без кальцію та магнію (Biowest, LO615-500, Франція), співвідношення об'єму тканини та ферментів – 1:10; інкубували в термостаті (ТС–1/80 СПУ: ТУ 9452-002 – 00141798-97) при 37°C упродовж 60 хв. Після ферментативної обробки фрагменти жирової тканини центрифугували (центрифуга Nuve NF800R, Туреччина, кат. № 04-0891) при 1200 g протягом 5 хвилин. Центрифугування первинної суспензії призводить до поділу на дві фракції: у верхньому світлому шарі – адипоцити, в осаді – клітини стромальної васкулярної фракції з домішкою гемопоетичних.

Надосадкову рідину відбирали за допомогою стерильної серологічної піпетки, а осад ресуспендували у 20 мл середовища DMEM (Biowest Lo102-500, Франція). Після цього клітини по $3,0 \times 10^5$ розсіяли в культуральні флакони 25 см² (TPP, 20200482, Швейцарія) з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (Biowest, SOOCT100R, Франція), двічі фільтрованої через фільтри шприцеві 0,22 мкм (Millex, SLGP033RB), та 0,01 % гентаміцину сульфату. Культуральні флакони з клітинами поміщали в CO₂-інкубатор EC 160 (Туреччина), температура – 37°C , вміст CO₂ у повітрі – 5 %, вологість – 95 %.

Через 24 години після виділення клітин культуральне середовище з неприкріпленими клітинами злили, флакон із прикріпленими клітинами промили середовищем DMEM. Після цього додали свіже середовище DMEM із 10 % фетальної бичачої сироватки та 0,01 % гентаміцину сульфату. Середовище змінювали кожні 3 доби, культивування тривало 9 діб.

Після утворення моношару (на 9 добу) клітини знімали з дна флакону шляхом інкубації впродовж 5 хвилин у підігрійтій до 37°C суміші 0,25 % розчину трипсину (Boiwest, X0915-100, Франція) з 0,02 % розчином Версену (Vetline) у співвідношенні 1:9; ресуспен-

дували в культуральному середовищі й осаджували центрифугуванням при 1000 об./хв протягом 10 хвилин. Оцінили концентрацію клітин стромати жирової тканини в камері Горяєва за допомогою мікроскопа MC-100X MICROS і знову розсіяли по $3,0 \times 10^5$ клітин у кожен культуральний флакон.

Через 7–9 діб культивування клітини знімали, переносили в стерильні мікропробірки по $1,0 \times 10^6$ клітин на 0,5 мл культурального середовища (DMEM із додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки) для введення в дефекти кістки щурів.

Життєздатність клітин оцінювали на кожному етапі після зняття з культурального флакону за допомогою забарвлення трипановим синім (Roth, C.I. 23850, Німеччина).

Біохімічні дослідження. Зібрану кров після природного зсідання звільняли від формених елементів шляхом 15-хвилинного центрифугування при 3000 об./хв. Надосадкову рідину відокремлювали, у ній визначали необхідні параметри.

Показники біохімічного аналізу обирали так, щоб оцінити перебіг запалення та метаболізму кісткової тканини, а також загальний соматичний стан експериментальних тварин. Зокрема, дослідили:

- вміст глікопротеїнів за реакцією з молібдатом амонію в сірчаноокислотному середовищі [21];
- вміст хондроїтинсульфатів за методом Nemeth–Csoka в модифікації Л. І. Слущкого (реакція з риванолом) [22];
- активність лужної та кислої фосфатази за реакцією з діетаноламіном кінетичними методами (за інструкціями «Лужна фосфатаза-кін. СпЛ» та «Кисла фосфатаза-кін. СпЛ»);
- вміст кальцію потенціометричним методом з використанням аналізатора електродів АЕК-01.

– вміст загального білка біуретовим методом [21].

Статистичний аналіз. Результати проаналізували в середовищі MS Windows, № ліцензійного пакету 439108-251. Нормальність розподілу перевіряли методом Колмогорова–Смирнова. Результати вимірювань наведені як медіана та квартилі (Me [25 %, 75 %]). Для порівняння двох груп використовували аналіз Манна–Вітні. Різницю вважали статистично значущою, якщо $p < 0,05$ [23].

Результати

У щурів віком 3 місяці після імплантації алогенного кісткового імплантата з МСК рівень глікопротеїнів у сироватці крові на 14 добу виявився нижчим в 1,30 раза ($p = 0,008$), а на 90 добу – вищим в 1,20 раза ($p = 0,016$) порівняно з таким у щурів цього віку без використання МСК (табл. 1). Протягом експерименту рівень глікопротеїнів у сироватці крові підвищився на 90 добу в 1,40 раза ($p = 0,008$) порівняно з параметром на 14 добу, в 1,30 раза ($p = 0,008$) – на 28 добу; результати, одержані на 14 і 28 добу, не відрізнялися. Це характеризує хронізацію запального процесу з перебудовою сполучної тканини.

Рівні загального білка та кальцію в сироватці крові лабораторних щурів віком 3 місяці не відрізнялися від показників групи цього віку без використання МСК у всі терміни спостереження. Втім, встановили їх підви-

Таблиця 1. Біохімічні показники сироватки крові щурів різного віку після моделювання дефекту в метафізі стегнової кістки з використанням алогенних кісткових імплантатів і мезенхімальних стовбурових клітин, Me [25 %; 75 %]

Термін після втручання	Показники, одиниці вимірювання	Групи тварин			
		Алоімплантат		Алоімплантат + МСК	
		3-місячні щури, (n = 5)	12-місячні щури, (n = 5)	3-місячні щури, (n = 5)	12-місячні щури, (n = 5)
14 доба	Глікопротеїни, г/л	0,92 [0,88; 0,97]	0,81 [0,78; 0,84] p ₁ = 0,008	0,720 [0,680; 0,765] p ₂ = 0,008	0,73 [0,70; 35,40] p ₁ = 0,421; p ₂ = 0,222
	Загальний білок, г/л	56,7 [54,9; 63,4]	65,7 [60,4; 67,3] p ₁ = 0,151	66,8 [65,85; 68,70] p ₂ = 0,056	71,2 [69,5; 79,1] p ₁ = 0,016; p ₂ = 0,008
	Са, ммоль/л	2,02 [2,01; 2,13]	2,30 [2,23; 2,36] p ₁ = 0,151	2,33 [2,32; 2,37] p ₂ = 0,022	2,38 [2,31; 2,44] p ₁ = 0,032; p ₂ = 0,016
	Хондротинсульфати, г/л	0,300 [0,276; 0,340]	0,384 [0,364; 0,399] p ₁ = 0,008	0,420 [0,389; 0,442] p ₂ = 0,256	0,487 [0,451; 0,526] p ₁ = 0,008; p ₂ = 0,008
	Активність лужної фосфатази, Од/л	343,0 [296,0; 428,0]	295,0 [276,0; 316,0] p ₁ = 0,116	303,0 [273,0; 356,0] p ₂ = 0,456	200,0 [179,5; 245,5] p ₁ = 0,095; p ₂ = 0,151
	Активність кислої фосфатази, Од/л	33,5 [22,1; 35,2]	28,4 [23,0; 33,2] p ₁ = 0,015	37,8 [34,5; 40,9] p ₂ = 0,421	24,0 [22,4; 29,8] p ₁ = 0,032; p ₂ = 0,008
28 доба	Глікопротеїни, г/л	0,67 [0,64; 0,71]	0,95 [0,87; 1,07] p ₁ = 0,008	0,71 [0,67; 0,78] p ₂ = 0,222; p ₃ = 1,000	1,26 [0,84; 1,40] p ₁ = 0,008; p ₂ = 0,421; p ₃ = 0,151
	Загальний білок, г/л	64,1 [61,0; 70,1]	68,4 [60,8; 70,4] p ₁ = 0,841	65,0 [63,2; 82,1] p ₂ = 0,310; p ₃ = 0,690	85,8 [83,8; 87,2] p ₁ = 0,032; p ₂ = 0,008; p ₃ = 0,008
	Са, ммоль/л	2,27 [2,18; 2,34]	2,37 [2,16; 2,38] p ₁ = 0,841	2,3 [2,25; 2,49] p ₂ = 0,310; p ₃ = 0,690	2,53 [2,52; 2,57] p ₁ = 0,032; p ₂ = 0,008; p ₃ = 0,008
	Хондротинсульфати, г/л	0,249 [0,201; 0,287]	0,267 [0,214; 0,313] p ₁ = 0,151	0,364 [0,345; 0,437] p ₂ = 0,008; p ₃ = 0,310	0,427 [0,389; 0,456] p ₁ = 0,841; p ₂ = 0,008; p ₃ = 0,456
	Активність лужної фосфатази, Од/л	348,0 [329,5; 386,0]	302,0 [269,0; 344,5] p ₁ = 0,056	455,0 [396,0; 505,0] p ₂ = 0,310; p ₃ = 0,008	270,0 [146,0; 206,0] p ₁ = 0,008; p ₂ = 0,008; p ₃ = 0,222
	Активність кислої фосфатази, Од/л	36,1 [33,1; 38,5]	32,7 [27,1; 38,2] p ₁ = 0,013	50,5 [42,9; 55,6] p ₂ = 0,008; p ₃ = 0,056	35,9 [31,2; 38,8] p ₁ = 0,008; p ₂ = 0,310; p ₃ = 0,421
90 доба	Глікопротеїни, г/л	0,80 [0,77; 0,85]	0,93 [0,86; 1,10] p ₁ = 0,032	0,95 [0,87; 1,15] p ₂ = 0,016; p ₃ = 0,008; p ₄ = 0,008	0,95 [0,91; 1,16] p ₁ = 0,548; p ₂ = 0,690; p ₃ = 0,151; p ₄ = 0,548
	Загальний білок, г/л	76,7 [69,9; 84,0]	75,6 [68,8; 96,4] p ₁ = 1,000	78,9 [72,3; 82,2] p ₂ = 1,000; p ₃ = 0,008; p ₄ = 0,310	72,8 [67,0; 76,1] p ₁ = 0,151; p ₂ = 0,421; p ₃ = 0,841; p ₄ = 0,008
	Са, ммоль/л	2,41 [2,38; 2,55]	2,38 [2,33; 2,42] p ₁ = 1,000	2,45 [2,40; 2,49] p ₂ = 0,548; p ₃ = 0,016; p ₄ = 0,310	2,38 [2,32; 2,43] p ₁ = 0,151; p ₂ = 0,310; p ₃ = 0,690; p ₄ = 0,008
	Хондротинсульфати, г/л	0,255 [0,221; 0,288]	0,273 [0,247; 0,296] p ₁ = 0,116	0,344 [0,279; 0,369] p ₂ = 0,095; p ₃ = 0,548; p ₄ = 0,151	0,380 [0,283; 0,542] p ₁ = 0,032; p ₂ = 0,008; p ₃ = 0,151; p ₄ = 0,421
	Активність лужної фосфатази, Од/л	278,0 [244,5; 308,5]	212,0 [180,5; 262,5] p ₁ = 0,100	299,0 [245,0; 354,0] p ₂ = 0,456; p ₃ = 0,856; p ₄ = 0,008	305,0 [212,5; 336,5] p ₁ = 0,056; p ₂ = 1,000; p ₃ = 0,548; p ₄ = 0,056
	Активність кислої фосфатази, Од/л	36,5 [29,9; 40,6]	31,2 [27,8; 34,3] p ₁ = 0,045	45,1 [43,1; 50,9] p ₂ = 0,548; p ₃ = 0,008; p ₄ = 0,008	38,7 [35,3; 42,4] p ₁ = 0,690; p ₂ = 0,841; p ₃ = 0,095; p ₄ = 0,056

p₁: вірогідність відмінностей показників у групах щурів різного віку з однаковим типом заповнення дефекту в однаковий термін після втручання; p₂: достовірність відмінностей показників групи з алоімплантатом, що доповнений використанням мезенхімальних стовбурових клітин, з групою щурів того самого віку з алоімплантатом в однаковий термін після втручання; p₃: вірогідність відмінностей показників груп щурів того самого віку та типу заповнення дефекту з показниками щурів на 14 добу після втручання; p₄: порівняння показників групи щурів однакового віку та типу заповнення дефекту на 90 добу після операції з показниками групи тварин на 28 добу після втручання.

щення на 90 добу порівняно з показниками на 14 добу: загального білка – в 1,20 раза (p = 0,008), кальцію – в 1,10 раза (p = 0,016).

Рівень хондротинсульфатів у сироватці крові експериментальних тварин вищий в 1,40 раза (p = 0,032) на 28 добу порівняно з таким у щурів відповідного віку без використання МСК, не відрізнявся в інші терміни та значущо не змінювався протягом експерименту.

На 90 добу встановили достовірне зниження активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів віком 3 місяці (в 1,38 раза, p = 0,008) порівняно з показником на 28 добу. Це підтверджує зниження активності процесу формування кісткової тканини з часом.

На 28 добу визначили більшу активність (в 1,90 раза, p = 0,008) кислої фосфатази в сироватці крові тварин віком 3 місяці після імплантації алоімплантатів із МСК порівняно з параметром щурів із групи без них. В інші терміни цей показник не відрізнявся від такого у щурів відповідно віку без використання МСК. Зафіксовано зниження активності цього ферменту на 90 добу в 2,47 раза (p = 0,008) порівняно з таким на 14 добу, в 3,30 раза (p = 0,008) – на 28 добу (табл. 1).

У 12-місячних щурів після імплантації алокістки з МСК рівень глікопротеїнів у сироватці крові порівняно з таким у 3-місячних щурів виявився вищим на 28 добу в 1,80 раза (p = 0,008), а в інші терміни не відрізнявся

(табл. 1). Порівняно з даними щурів цього віку без використання МСК рівень глікопротеїнів у сироватці крові тварин не відрізнявся в усі терміни та суттєво не змінився протягом експерименту.

Рівень загального білка в сироватці крові 12-місячних щурів після імплантації алокістки з МСК на 14 добу вищий в 1,10 раза ($p = 0,016$), на 28 добу – в 1,30 раза ($p = 0,032$) порівняно з таким у 3-місячних щурів і щурів без використання МСК ($p = 0,008$; $p = 0,008$), вірогідно не відрізнявся від показників на 90 добу. Протягом експерименту рівень загального білка в сироватці крові 12-місячних щурів підвищився на 28 добу в 1,20 раза ($p = 0,008$) порівняно з показником на 14 добу, на 90 добу знизився в 1,20 раза ($p = 0,008$) щодо даних на 28 добу, не відрізнявся як порівняти параметри, що одержали на 14 і 90 доби.

Рівень кальцію у сироватці крові 12-місячних щурів також вірогідно вищий в 1,11 раза на 14 і 28 доби порівняно з таким у 3-місячних щурів; в 1,10 раза – щодо параметрів 12-місячних щурів без використання для імплантації МСК. На 90 добу рівень кальцію в сироватці крові 12-місячних тварин знизився в 1,20 раза ($p = 0,008$) порівняно з даними, що одержали на 28 добу, та не відрізнявся від такого на 14 добу експерименту.

Рівень хондроїтинсульфатів у сироватці крові 12-місячних тварин при встановленні імплантатів з МСК порівняно з таким у щурів без використання МСК на 14 добу нижчий в 1,20 раза ($p = 0,016$), на 90 добу – вищий в 2,22 раза ($p = 0,008$). Порівняно з відповідними показниками у 3-місячних щурів рівень хондроїтинсульфатів у сироватці крові лабораторних щурів на 90 добу також вищий (в 2,10 раза, $p = 0,032$), не змінювався протягом експерименту.

Активність лужної фосфатази в сироватці крові 12-місячних тварин нижча на 28 добу в 2,70 раза ($p = 0,008$) та 2,90 раза ($p = 0,008$), а на 14 і 90 доби вірогідно не відрізнялася від показників 3- та 12-місячних тварин без використання МСК. Протягом дослідження активність лужної фосфатази в сироватці крові тварин вірогідно не змінювалася.

Активність кислої фосфатази в сироватці крові 12-місячних щурів порівняно з такою в тварин віком 3 місяці нижча в 1,57 раза ($p = 0,032$) на 14 добу, в 1,45 раза ($p = 0,008$) – на 28 добу. Не зафіксували достовірні відмінності порівняно з показниками щурів того самого віку без використання МСК (табл. 1). Протягом експерименту рівень кислої фосфатази в сироватці крові значущо не змінювався.

Обговорення

Отже, у 3-місячних щурів, які отримали алоімплантати з МСК, порівняно з показниками експериментальних тварин того самого віку без використання МСК встановили нижчий на 14 добу та вищий на 90 добу рівень глікопротеїнів у сироватці крові; це характеризує хронізацію запального процесу. На 28 добу в щурів віком 3 місяці визначили вищий рівень хондроїтинсульфатів у сироватці крові, що свідчить про вплив введення МСК в напрямі активації метаболізму сполучної тканини; виявили також більшу активність кислої фосфатази – маркера кісткової резорбції. На 90 добу в щурів цієї групи зафіксовано зменшення рівня лужної фосфатази

в сироватці крові; імовірно, це визначає припинення утворення кістки.

У сироватці крові 12-місячних щурів порівняно з даними експериментальних тварин без використання МСК на 14 добу визначили вищі рівні загального білка, кальцію та активність кислої фосфатази, зареєстрували нижчу концентрацію хондроїтинсульфатів. На 28 добу в них зафіксували вищі рівні загального білка та кальцію, нижчу активність лужної фосфатази. На 90 добу визначили вищий рівень хондроїтинсульфатів.

Протягом усього експерименту в 3-місячних щурів незмінним залишився тільки рівень хондроїтинсульфатів у сироватці крові, а в 12-місячних тварин не змінилися рівні глікопротеїнів, хондроїтинсульфатів, активність кислої та лужної фосфатаз у сироватці крові.

У 3-місячних щурів концентрації загального білка та кальцію в сироватці крові на 28 добу залишалися незмінними щодо рівня на 14 добу, зросли на 90 добу порівняно з таким на 28 добу дослідю. В 12-місячних щурів ці показники вірогідно підвищилися на 28 добу порівняно з параметрами, що встановили на 14 добу, а на 90 добу знову знизилися.

Аналізуючи вплив віку на біохімічні показники, встановили: на 14 добу в 12-місячних щурів порівняно з параметрами тварин віком 3 місяці активність кислої фосфатази у сироватці крові нижча, а інші показники достовірно не відрізнялися. На 28 добу зафіксовано вищі рівні глікопротеїнів, загального білка та кальцію, нижчу активність лужної та кислої фосфатаз. На 90 добу визначили тільки вищий рівень хондроїтинсульфатів у сироватці крові.

Загалом зміни біохімічних показників крові, зафіксовані у тварин обох вікових груп, свідчать про негативний вплив введення кісткових імплантатів разом із МСК на перебіг репаративного остеогенезу порівняно із заміщенням дефекту алоімплантатом.

Висновки

1. Ґрунтуючись на результатах біохімічного дослідження сироватки крові експериментальних щурів віком 3 і 12 місяців із дефектом критичного розміру в метафізі стегнової кістки із заповненням дефекту кістковими алоімплантатами, що насичені алогенними МСК, та без МСК, встановили: на 28 добу в 3-місячних тварин, яким встановлено алоімплантати, насичені алогенними МСК, порівняно з даними експериментальних щурів, котрі одержали алоімплантати без МСК, зафіксовано вираженіші ознаки активації формування сполучної тканини, вищу активність кісткової резорбції (вірогідне перевищення в сироватці крові вмісту хондроїтинсульфатів та активності кислої фосфатази). На 90 добу в щурів цієї групи під впливом алогенних МСК зареєстрували різке зниження темпу формування кісткової тканини, що підтверджено достовірно меншим значенням активності лужної фосфатази в сироватці крові порівняно з таким у щурів, які отримали алоімплантати без МСК.

2. У 3-місячних щурів, які отримали алогенні МСК, зафіксовано ознаки хронізації запального процесу (більший вміст глікопротеїнів у сироватці крові на 90 добу експерименту порівняно з параметрами тварин того самого віку, в яких МСК не застосовували).

3. У групі 12-місячних щурів, котрі одержали алогенні МСК, на 14 добу зафіксовано ознаки інтенсивнішої резорбції кісткової тканини: більші значення активності кислоти фосфатази в сироватці крові при меншому формуванні сполучної тканини, а також нижчий вміст хондроїтинсульфатів. На 28 добу експерименту вплив алогенних МСК у 12-місячних тварин виявляли за гальмуванням формування кісткової тканини із відповідним зниженням активності лужної фосфатази. На 90 добу у тварин цієї групи зафіксовано активацію формування сполучної тканини, що визначили за достовірно вищим вмістом хондроїтинсульфатів у сироватці крові.

4. Біохімічні показники у 3-місячних тварин характеризувалися більшою лабільністю, а в 12-місячних щурів їм притаманна більша консервативність. Перебіг фаз регенерації відбувся швидше у 3-місячних тварин порівняно з 12-місячними, а також у тварин з алоімплантатами без МСК щодо щурів з алоімплантатами, насиченими алогенними МСК.

5. Введення алогенних МСК разом з алотрансплантатом відразу після травматичного ушкодження кістки спричиняє уповільнення кісткоутворення незалежно від віку та надлишкового формування сполучної тканини. Тому комбінацію алогенних МСК з алогенним кістковим імплантатом недоцільно використовувати при «свіжих» переломах.

Перспективи подальших досліджень. Надалі плануємо розширити коло стимуляторів ремоделінгу кісткової тканини, зокрема факторами росту плазми крові.

Фінансування

Дослідження здійснене в рамках НДР ДУ «Інститут патології хребта і суглобів імені професора М. І. Ситенка НАМН України»: «Вивчити механізми оптимізації регенерації кістки залежно від віку реципієнта в разі використання алогенних кісткових імплантатів у комбінації з мезенхімальними стромальними клітинами і біологічно активними факторами плазми крові» за програмою наукових досліджень і розробок, що фінансується з державного бюджету, держреєстрація № 0119U102341 (2020–2022).

Подяки

Автори вдячні Катерині Самойлової та Оксані Майбороді, які надавали технічну підтримку в підготовці алотрансплантатів.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 31.01.2023

Після доопрацювання / Revised: 04.05.2023

Схвалено до друку / Accepted: 24.05.2023

Відомості про авторів:

Воронцов П. М., канд. мед. наук, зав. відділення трансплантології, ДУ «Інститут патології хребта і суглобів імені професора М. І. Ситенка НАМН України», м. Харків.
ORCID ID: 0000-0002-5758-7223

Корж М. О., д-р мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут патології хребта і суглобів імені професора М. І. Ситенка НАМН України», м. Харків; заслужений діяч науки і техніки України.

ORCID ID: 0000-0002-0489-3104

Леонтьєва Ф. С., канд. біол. наук, старший науковий співробітник, зав. відділу лабораторної діагностики і імунології, ДУ «Інститут патології хребта і суглобів імені професора М. І. Ситенка НАМН України», м. Харків.

ORCID ID: 0000-0001-9801-7908

Туляков В. О., д-р фарм. наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу лабораторної діагностики і імунології, ДУ «Інститут патології хребта і суглобів імені професора М. І. Ситенка НАМН України», м. Харків.

ORCID ID: 0000-0002-3187-1592

Information about the authors:

Vorontsov P. M., MD, PhD, Head of the Department of Transplantology, Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv.

Korzh M. O., MD, PhD, DSc, Professor, Director of Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv; Honored Worker of Science and Engineering of Ukraine.

Leontieva F. S., PhD, Senior Researcher, Head of the Department of Laboratory Diagnostics and Immunology, Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv.

Tuliakov V. O., PhD, DSc, Senior Researcher, Leading Researcher of the Department of Laboratory Diagnostics and Immunology, Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv.

References

- Raghuram, A., Singh, A., Chang, D. K., Nunez, M., & Reece, E. M. (2019). Bone Grafts, Bone Substitutes, and Orthobiologics: Applications in Plastic Surgery. *Seminars in plastic surgery*, 33(3), 190-199. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693020>
- Rupp, M., Biehl, C., Budak, M., Thormann, U., Heiss, C., & Alt, V. (2018). Diaphyseal long bone nonunions – types, aetiology, economics, and treatment recommendations. *International orthopaedics*, 42(2), 247-258. <https://doi.org/10.1007/s00264-017-3734-5>
- Choi, S. W., Bae, J. Y., Shin, Y. H., Song, J. H., & Kim, J. K. (2021). Treatment of forearm diaphyseal non-union: Autologous iliac corticocancellous bone graft and locking plate fixation. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*, 107(8), 102833. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2021.102833>
- Verma, P. R., Anjanekar, A., & Singh, P. V. (2022). Need, Strategies and Requirements in the Medical System for Bone Banks: A Review Article. *Cureus*, 14(9), e28785. <https://doi.org/10.7759/cureus.28785>
- Petersen, L. L., Baas, J., Sørensen, M., Bechtold, J. E., Søballe, K., & Barckman, J. (2022). Accelerated bone growth, but impaired implant fixation in allograft bone mixed with nano-hydroxyapatite – an experimental study in 12 canines. *Journal of experimental orthopaedics*, 9(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s40634-022-00465-z>
- Lu, Y., Ma, T., Ren, C., Li, Z., Sun, L., Xue, H., Li, M., Zhang, K., Zhang, C., & Wang, Q. (2020). Treatment of segmental tibial defects by bone transport with circular external fixation and a locking plate. *The Journal of international medical research*, 48(4), 300060520920407. <https://doi.org/10.1177/0300060520920407>
- Feltri, P., Solaro, L., Di Martino, A., Candrian, C., Errani, C., & Filardo, G. (2022). Union, complication, reintervention and failure rates of surgical techniques for large diaphyseal defects: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 12(1), 9098. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12140-5>
- Panagopoulos, G. N., Mavrogenis, A. F., Mauffrey, C., Lesenský, J., Angelini, A., Megaloikonos, P. D., Igoumenou, V. G., Papanastassiou, J., Savvidou, O., Ruggieri, P., & Papagelopoulos, P. J. (2017). Intercalary reconstructions after bone tumor resections: a review of treatments. *European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie*, 27(6), 737-746. <https://doi.org/10.1007/s00590-017-1985-x>
- Errani, C., Alfaro, P. A., Ponz, V., Colangeli, M., Donati, D. M., & Manfrini, M. (2021). Does the Addition of a Vascularized Fibula Improve the Results of a Massive Bone Allograft Alone for Intercalary Femur Reconstruction of Malignant Bone Tumors in Children?. *Clinical orthopaedics and related research*, 479(6), 1296-1308. <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000001639>
- Huang, Q., Xu, Y. B., Ren, C., Li, M., Zhang, C. C., Liu, L., Wang, Q., Lu, Y., Lin, H., Li, Z., Xue, H. Z., Zhang, K., & Ma, T. (2022). Bone transport combined with bone graft and internal fixation versus simple bone transport in the treatment of large bone defects of lower limbs after trauma. *BMC musculoskeletal disorders*, 23(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12891-022-05115-0>

11. Lytle, E. J., Lawless, M. H., Paik, G., Tong, D., & Soo, T. M. (2020). The minimally effective dose of bone morphogenetic protein in posterior lumbar interbody fusion: a systematic review and meta-analysis. *The spine journal*, 20(8), 1286-1304. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2020.04.012>
12. Cerapedics. (2021, December 17). i-FACTOR Peptide Enhanced Bone Graft. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/p140019d.pdf
13. Stanovici, J., Le Nail, L. R., Brennan, M. A., Vidal, L., Trichet, V., Rosset, P., & Layrolle, P. (2016). Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Current research in translational medicine*, 64(2), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.04.006>
14. Verkhovna Rada of Ukraine. (2006, February 21). *Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennia* [On the Protection of Animals from Brutal Treatment (No. 3447-IV)]. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>
15. Verkhovna Rada of Ukraine. (n.d.). *Yevropeiska konventsia pro zakhyst khrebetnykh tvaryn, shcho vykorystovuiutsia dlia doslidnykh ta inshykh naukovykh tsilei* [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. 1986, March 18]. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text
16. Directive 2010/63. *Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/2019-06-26>
17. Poser, L., Matthys, R., Schwalder, P., Pearce, S., Alini, M., & Zeiter, S. (2014). A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *BioMed research international*, 2014, 348635. <https://doi.org/10.1155/2014/348635>
18. Tao, Z. S., Wu, X. J., Zhou, W. S., Wu, X. J., Liao, W., Yang, M., Xu, H. G., & Yang, L. (2019). Local administration of aspirin with β -tricalcium phosphate/poly-lactic-co-glycolic acid (β -TCP/PLGA) could enhance osteoporotic bone regeneration. *Journal of bone and mineral metabolism*, 37(6), 1026-1035. <https://doi.org/10.1007/s00774-019-01008-w>
19. Thormann, U., Ray, S., Sommer, U., Elkhassawna, T., Rehling, T., Hundgeburth, M., Henß, A., Rohnke, M., Janek, J., Lips, K. S., Heiss, C., Schlewitz, G., Szalay, G., Schumacher, M., Gelinsky, M., Schnettler, R., & Alt, V. (2013). Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials*, 34(34), 8589-8598. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.036>
20. Korzh, M. O., Vorontsov, P. M., Slota, O. M., Husak, V. S., & Vorontsova, M. P. (2019). *Sposib vyhotovlennia implantatsiinoho dehidratovano-ho kistkovoho biomaterialu alohennoho pokhodzhennia*. Patent UA No. 119699 [Method of manufacturing implantation dehydrated bone biomaterial of allogeneic origin]. Ukraine Patent UA 119699. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1372114/>
21. Talib, V. H. (2020). *Practical Textbook of Laboratory Medicine* (1st ed.). CBS Publishers and Distributors Pvt Ltd.
22. Morozenko, D. V., & Leontieva, F. S. (2016). *Metody doslidzhennia markeriv metabolizmu spoluchnoi tkanyny u suchasni klinichni ta eksperymentalni medytsyni* [Research methods markers of connective tissue metabolism in modern clinical and experimental medicine]. *Molodyi vchenyi*, (2), 168-172. [in Ukrainian].
23. Walters, S. J., Campbell, M. J., & Machin, D. (2021). *Medical Statistics: A Textbook for the Health Sciences* (5th ed.). Wiley-Blackwell.