DOI: 10.26693/jmbs08.01.068
УДК 616.71–003.93–089.843:611.018.54:611.018–08
Воронцов П. М., Туляков В. О.,
Гуліда Т. І.

ЗМІНИ РОЗРАХУНКОВИХ ІНДЕКСІВ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ПІСЛЯ ЗАПОВНЕННЯ ДЕФЕКТУ В МЕТАФІЗІ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ АЛОГЕННИМИ КІСТКОВИМИ ІМПЛАНТАТАМИ, НАСИЧЕНИМИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ

Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

Мета: на основі аналізу розрахункових біохімічних показників мінералізації в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг метаболічних процесів у кістковій тканині після заповнення дефекту критичного розміру в метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами, насиченими мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Матеріал та методи. Досліджено показники мінералізації кісткової тканини у сироватці крові білих щурів: вміст загального білку, кальцію, активності лужної та кислої фосфатаз, проведено розрахунок показників співвідношення активності лужної до активності кислої фосфатази, а також ступеня мінералізації.

Результати. У *3-місячних щурів із алоімплантатами без МСК* на 90-у добу спостерігалося зниження ступеня мінералізації, який відображує завершальні стадії перебудови кісткової тканини у 1,13 разів відносно рівня такого у тварин аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 14-у добу (p = 0,008) та у 1,12 разів відносно даних на 28-у добу досліду (p = 0,008). Протягом експерименту спостерігалося прогресивне достовірне зниження співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз сироватки крові, яке характеризує перебіг початкових стадій ремоделювання кісткової тканини.

В *3-місячних* щурів *із алоімплантатами, насиченими МСК*, визначено зниження ступеня мінералізації на 90-у добу порівняно з таким у експериментальних щурів аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 14-у добу в 1,13 разів (p = 0,008), а порівняно із даними аналогічної групи на 28-у добу – у 1,14 разів (p = 0,008), що відображає затримку перебігу повноцінної стадійності ремоделювання кісткової тканини внаслідок використання МСК.

У *12-місячних щурів без використання МСК* на 90-у добу мало місце зниження ступеня мінералізації у 1,10 разів відповідно до рівня такого у групи щурів аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 14-у добу (p = 0,008) та у 1,09 разів порівняно із таким на 28-у добу (p = 0,008), з чого можна зробити висновок про прогресивне зниження активності завершальних стадій ремоделювання кісткової тканини.

У *12-місячних щурів із використанням МСК* ступінь мінералізації був нижчим, ніж такий у 3-місячних щурів в 1,05 разів (p = 0,016) на 14-у добу, в 1,20 разів на 28-у добу (p = 0,008), що відповідно може вказувати на меншу активність прикінцевих перетворень ремоделювання кісткової тканини, а на 90-у добу, навпаки, був більшим у 1,06 разів порівняно з таким у 3-місячних щурів із МСК (p = 0,008), що свідчить про активацію відповідних процесів у 12-місячних тварин на 90-у добу.

Висновки. Лікування експериментальних щурів із дефектом критичного розміру у метафізі стегнової кістки алоімплантатами, насиченими мезенхімальними стовбуровими клітинами, особливо на ранніх стадіях, призводить до уповільнення процесів ремоделювання кісткової тканини.

Ключові слова: алоімплантат, дефект, моделювання, біохімія, мінералазація, розрахункові показники.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження є частиною науково-дослідної роботи відділення трансплантології та відділу лабораторної діагностики та імунології ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка Національної академії медичних наук 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», № держ. реєстрації 0119U102341. У рамках зазначеної теми авторами проведено визначення динаміки рівнів біомаркерів та розрахункових показників мінералізації у експериментальних білих щурів із транскортикальним дефектом стегнової кістки критичного розміру в умовах встановлення алоімплантатів кісткової тканини.

Вступ. Травматичні рани з сегментарними дефектами кістки є серйозними реконструктивними проблемами. Досягнення регенеративних методів з використанням мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) з кісткового мозку та жирової тканини створили можливість для покращення відновлення кісткової тканини. [1].

МСК мають самовідновлюваний і мультидиференціальний потенціал. Остеогенне диференціювання МСК є сферою уваги в області регенерації кістки. Виявлення чинників, що у остеогенної диференціювання МСК, важливо задля кращого розуміння механізму остеогенної диференціювання. За даними літератури для стимуляції остеогенезу МСК використовуються різні методи, у тому числі загальноприйняті остеогенні середовища, фактори росту, гормони, гіпоксія, механічні та хімічні подразники, генетична модифікація та нанотехнології [2].

Стовбурові або стромальні клітини жирового походження (МСКЖ) демонструють високий остеогенний потенціал, остеоіндуктивну здатність та імуномодулюючі властивості. Крім того, їх можна отримувати за допомогою неінвазивного процесу у великих кількостях. МСКЖ може бути індуковані до остеогенної диференціації за допомогою біоактивних молекул, тобто. факторів росту та цитокінів [3].

При порівнянні здатності до проліферації та остеогенного диференціювання людських МСКЖ, ізольованих з підшкірної жирової тканини з різних місць (черевної стінка, кульшова зона, стегно, коліно та кінцівка), МСКЖ з кінцівки та коліна показали сильну здатність до проліферації, незважаючи на присутність остеогенних стимулів, що призвело до обмежених остеогенних характеристик. Менш проліферативні МСКЖ із кульшової зони та стегна показали найвищу активність лужної фосфатази та мінералізацію матриксу. МСКЖ з черевної стінки показали хорошу проліферацію та остеогенні характеристики [4].

МСК мають внутрішню здатність до регенерації у відповідь на пошкодження навколишніх тканин. МСК кісткового мозку людини (МСККМ) мають більш сильний остеогенний і нижчий потенціал адипогенного диференціювання порівняно з МСК жирової тканини (МСКЖ), оскільки епігенетична пам'ять, отримана або з кісткового мозку, або з жирової тканини, сприяє диференціювання МСК відповідно за остеобластною або адіпоцитарною лініями [5].

Велика кількість транскрипційних факторів та ектоцитарних або внутрішньотканинних сигнальних шляхів регулюють адипогенне або остеогенне диференціювання МСК. Існує і зворотний зв'язок, тому сигнальні шляхи індукують адипогенез за рахунок остеогенезу і навпаки [6].

Зазначено, що МСКЖ сприяє остеогенезу, регулюючи остеогенні сигнальні шляхи та генну трансдукцію [7].

Останні дослідження в галузі інженерингу кісткової тканини з використанням МСКЖ продемонстрували, що такі клітини можуть відігравати вирішальну роль у лікуванні кісткових дефектів, враховуючи їхню сильну відданість остеогенному фенотипу. Більш глибоке знання молекулярних механізмів, що лежать у основі використання МСКЖ, має вирішальне значення для правильного розуміння можливостей терапії на основі МСКЖ [8].

МСКЖ можуть бути джерелом клітин при інженерії кісткової тканини з кращою ефективністю остеогенного диференціювання для майбутнього клінічного застосування [9].

Мета дослідження: на основі аналізу розрахункових біохімічних показників мінералізації в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг метаболічних процесів у кістковій тканині після заповнення дефекту критичного розміру в метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами, насиченими мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Матеріал і методи дослідження. Експериментальні дослідження проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин [10, 11, 12] після ухвалення плану Комітетом із біоетики (протокол № 191 від 22.04.2019) при Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка Національної академії медичних наук України» (Ліцензія МОЗ України на медичну практику від 16 серпня 2012 р. № 02012214).

Експеримент проведений на базі експериментально-біологічної клініки атестованих відділів трансплантології та експериментального моделювання з експериментально–біологічною клінікою (Свідоцтво про відповідність системі вимірювань вимогам ДСТУ ISO 10012:2005 № 01–0020/2019 від 8 лютого 2019 р., чинно до 8 лютого 2021 р.).

В експерименті було використано 60 білих щурів. З них 30 – 3–місячного віку і 30 – 9–місячного віку, яких рандомно розподілили на чотири групи:

- I – 15 щурів 3–місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки;
- II – 15 щурів 3–місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки та заповнення його кістковим алоімплантатом;
- III – 15 щурів 12–місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки;
- IV – 15 щурів 12–місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки та заповнення його кістковим алоімплантатом.

Через 14, 28 і 90 діб після операції відповідно виводили з експерименту по 5 тварин кожної групи.

Хірургічні втручання виконані в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після вистрижіння шерсті на лівому коліні й оброблення ділянки антисептиком Бетадин® передньолатеральним доступом відкривали ділянку дистального метафізу стегнової кістки та за допомогою стоматологічного бора моделювали дірчастий дефект критичного розміру – мінімальний дефект, який не загоюється самостійно протягом життя тварини чи впродовж експерименту [13]. Для дистального метафізу стегнової кістки щурів мінімальний розмір критичного дефекту названий діаметром і глибиною 2,5 мм [14]. Циліндричні кісткові алоімплантати діаметром 3 мм, довжиною 3 мм розміщували в ділянці дефекту щурів III та VI груп. Після місцевої обробки антибіотиком пошарово ушивали м'язи та шкірну рану, ділянку хірургічного втручання обробляли антисептиком.

Підготовка кісткових алотрансплантатів Донорами алотрансплантатів були 6-місячні щури (n=13), стегнові кістки яких видаляли після введення летальної дози анестетика (тіопентал натрію, 90 мг/кг внутрішньом'язово). Щоб видалити залишки крові та зберегти алогенну кістку донора стерильною, її зберігали в 10 % розчині перекису водню протягом двох годин. Для видалення жирів кістку витримували в розчині 96 % етилового спирту та 100 % діетилового ефіру (1:1) протягом двох 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°С протягом ночі. Потім стегнові кістки виймали і сушили за допомогою конвекційного нагрівача протягом 4–5 днів. Алотрансплантати (діаметр 3 мм, висота 3 мм) виготовляли з дистального метафізу стегнової кістки та стерилізували дозами опромінення від 15 до 25 кГр за допомогою лінійного прискорювача ЛУ-10 (10 МеВ; 10 кВт) [15]. Після стерилізації чотири зразки з кожної партії імплантатів перевіряли на стерильність з використанням рідкого тіогліколатного середовища для бактеріального культивування. Алотрансплантати вважалися стерильними, якщо в живильному середовищі не було проростання колоній мікроорганізмів.

Методика отримання алогенних МСК. Жирову тканину отримували зі сальника щурів, переносили зі стерильної пробірки типу Falcon 15 мл із середовищем DMEM (Biowest, Lo102-500, Франція) у співвідношенні об'єму тканини та ферментів 1:5. Переносили в стерильну чашку Петрі, де подрібнювали жирову тканину за допомогою ножиць 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) та інкубували в термостаті (ТС–1/80 СПУ: ТУ 9452-002 – 00141798-97) за 37ºС упродовж 60 хвилин. Після ферментативної обробки фрагменти жирової тканини центрифугували (центрифуга Nuve NF800R, Туреччина, кат. № 04-0891) за 1200 g 5 хвилин. Центрифугування первинної суспензії призводить до поділу на дві фракції. У верхньому світлому шарі розташовуються адипоцити, а в осаді – клітини стромальної васкулярної фракції з домішкою гемопоетичних.

Надосадову рідину відбирали за допомогою стерильної серологічної піпетки, а осад ресуспендували у 20 мл середовища DMEM (Biowest Lo102-500, Франція). Після цього отриману клітини по 3,0 × 105 розсіяли в культуральні флакони 25 $см_2$ (TPP, 20200482, Швейцарія) із додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (Biowest, SOOCT100R, Франція), фільтровану два рази крізь фільтри шприцеві 0,22 мкм (Millex, SLGP033RB), та 0,01 % гентаміцину сульфату. Культуральні флакон із клітинами розміщали в CO_2-інкубаторі EC 160 (Туреччина) за температури 37 ºС, вмісту CO2 5 % у повітрі та 95 % вологості.

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

Після утворення моношару клітин на 9-ту добу їх знімали з дна флакону шляхом інкубації упродовж 5 хв у підігрітій до 37ºС суміші 0,25 % розчину трипсину (Boiwest, X0915-100, Франція) з 0,02 % розчином Версену (Vetline) у співвідношенні 1:9, ресуспендували і культуральному середовищі й осаджували центрифугуванням за 1000 об./хв. упродовж 10 хвилин. Оцінили концентрацію клітин строми жирової тканини в камері Горяєва за допомогою мікроскопа МС–100Х MICROS і знову розсіяли по 3,0 × 10^5 клітин у кожен культуральний флакон.

Через 7–9 діб культивування клітини знімали та переносили в стерильні мікропробірки у кількості 1,0 × 106 клітин на 0,5 мл культурального середовища (середовище DMEM із додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки) для введення в дефекти щурів.

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

Лабораторні дослідження виконані у атестованому відділі лабораторної діагностики та імунології ДУ «ІПХС ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», свідоцтво про відповідність засобів вимірювання № 01-0018/2019 від «08» лютого 2019 р., дійсне до 08 лютого 2022 р., акредитаційний сертифікат Головної акредитаційної комісії при МОЗ України вищої категорії № 468 від 13.03.2018 р., дійсний до 12.03.2021 р., сертифікат на систему управління якістю ДП «Харківстандартметрологія» № UA 8O072.02012214.1-2019 від 26.02.2019 р., дійсний до 25.02.2022 р.

Зібрану кров після природного зсідання звільнювали від формених елементів 15 хвилин центрифугуванням при 3000 об./хв. Надосадкову рідину відокремлювали і в ній вимірювали досліджувані показники.

Відбір параметрів біохімічного аналізу проводили таким чином, щоб дослідити показники мінерального обміну кісткової тканини.

- активність лужної та кислої фосфатаз за реакцією з діетаноламіном кінетичними методами згідно з інструкцією «Лужна фосфатаза – кін Сп.Л» та «Кисла фосфатаза – кін Сп.Л»;
- вміст кальцію потенціометричним методом з використанням аналізатора електролітів АЄК–01;
- вміст загального білку біуретовим методом [16].

При виконанні біохімічних досліджень використовували напівавтоматичні біохімічні аналізатори «GBG STAT FAX 1904 plus» та Stardust FC. Проведено розрахунок показників співвідношення активності лужної до активності кислої фосфатази, а також ступеня мінералізації (відношення вмісту кальцію (для цього перераховано одиниці вимірювання ммоль/л в г/л) до вмісту білку).

Аналіз даних був виконаний з використанням програмних пакетів Microsoft Excel XP та Statsoft Statistica 10.0 (№ ліцензії 00218-04981-27336-AA152). Результати вимірювань представлені як медіана та квартилі (25 %, 75 %) Для порівняння двох груп використовували аналіз Манна–Уїтні. Різницю вважали статистично значущою за умови якщо $p < 0,05$ [17].

Результати дослідження та їх обговорення.

14-а доба. 3-місячні тварини На 14-у добу в 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, не було зафіксовано статистично достовірних розбіжностей із таким у групи експериментальних тварин із алоімплантатами без МСК за ступенем мінералізації. Відношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові у 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, на 14-у добу експерименту було нижчим в 1,32 рази порівняно із даними групи аналогічного віку із алоімплантатами без МСК ($p = 0,008$) (**табл.**).

14-а доба. 12-місячні тварини. У 12-місячних щурів без використання МСК спостерігалися значення ступеня мінералізації, аналогічні таким у 3-місячних експериментальних тварин, що відповідно призводило до відсутності достовірних відмінностей від даних у 3-місячних щурів аналогічного терміну експерименту та умов заповнення дефекту.

За значенням співвідношення лужної та кислої фосфатаз також не було зафіксовано відмінностей із таким у 3-місячних щурів із алоімплантатами без МСК.

У 12-місячних щурів із використанням МСК на 14-у добу експерименту ступінь мінералізації був визначений нижчим, ніж такий у 3-місячних щурів в 1,05 разів ($p = 0,016$), ($p = 0,008$), що може вказувати на відповідно меншу активність прикінцевих перетворень ремоделювання кісткової тканини.

Відношення активності лужної та кислої фосфатаз сироватки крові, за яким можна судити про активність початкових стадій ремоделювання кісткової тканини, у 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, на 14-у добу у 1,19 разів достовірно переважало таке у 3-місячних тварин із використанням МСК ($p = 0,008$).

У 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, порівняно з даними групи 12-місячних тварин без використання МСК, ступінь мінералізації на 14-у добу був нижчим в 1,05 разів ($p = 0,016$), що свідчить про вплив використання МСК в напрямку уповільнення протікання пізніх стадій кальцифікації кісткової тканини.

При порівнянні співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК їх такою у 12-місячних тварин без використання МСК виявлено менші у 1,09 разів значення (**табл.**).

28-а доба. 3-місячні тварини. На 28-у добу у 3-місячних щурів із алоімплантатами без МСК величина ступеня мінералізації достовірно не змінювалася порівняно із такою у аналогічних щурів на 14-у добу.

На 28-у добу у 3-місячних щурів із алоімплантатами без МСК величина співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз сироватки крові, яке характеризує перебіг початкових стадій ремоделювання кісткової тканини, було меншим у 1,09 рази, ніж таке у групи щурів аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 14-у добу ($p = 0,008$),

Таблиця – Співвідношення активності лужної до активності кислої фосфатаз, а також ступінь мінералізації у щурів різного віку після моделювання дефекту в метафізі стегнової кістки з використанням алогенних кісткових імплантатів, насичених мезенхімальними стовбуровими клітинами та без насичення (Me, (25 %; 75 %)) (n = 5)

Термін після втручання	Показники	Групи тварин			
		алоімплантат		алоімплантат+мезенхімальні стовбурові клітини	
		3 місячні щури (n = 5)	12-місячні щури (n = 5)	3-місячні щури (n = 5)	12-місячні щури (n = 5)
14 доба	ступінь мінералізації	1,43 (1,40; 1,46) $\cdot 10^{-3}$	1,41 (1,39; 1,42) $\cdot 10^{-3}$ p_1 = 1,000	1,40 (1,38; 1,41) $\cdot 10^{-3}$ p_2 = 0,032	1,34 (1,25; 1,36) $\cdot 10^{-3}$ p_1 = 0,016 p_2 = 0,008
	активність лужної фосфатази / активність кислої фосфатази	10,55 (10,28; 11,09)	10,39 (10,05; 10,93) p_1 = 0,256	8,02 (7,86; 8,39) p_2 = 0,310	9,52 (9,08; 10,02) p_1 = 0,031 p_2 = 0,046
28 доба	ступінь мінералізації	1,42 (1,35; 1,43) $\cdot 10^{-3}$ p_3 = 0,960	1,39 (1,35; 1,42) $\cdot 10^{-3}$ p_1 = 1,000 p_3 = 0,960	1,41 (1,21; 1,42) $\cdot 10^{-3}$ p_2 = 0,421 p_3 = 0,690	1,18 (1,18; 1,20) $\cdot 10^{-3}$ p_1 = 0,008 p_2 = 0,008 p_3 = 0,008
	активність лужної фосфатази / активність кислої фосфатази	9,64 (9,18; 11,05) p_3 = 0,008	9,24 (8,70; 9,76) p_1 = 0,116 p_3 = 0,016	9,01 (8,52; 9,66) p_2 = 0,256 p_3 = 0,008	7,52 (7,05; 8,13) p_1 = 0,008 p_2 = 0,008 p_3 = 0,008
90 доба	ступінь мінералізації	1,27 (0,98; 1,36) $\cdot 10^{-3}$ p_3 = 0,008 p_4 = 0,008	1,28 (1,08; 1,37) $\cdot 10^{-3}$ p_1 = 1,000 p_3 = 0,008 p_4 = 0,008	1,24 (1,21; 1,33) $\cdot 10^{-3}$ p_2 = 1,000 p_3 = 0,008 p_4 = 0,222	1,31 (1,27; 1,39) $\cdot 10^{-3}$ p_1 = 0,016 p_2 = 0,421 p_3 = 0,841 p_4 = 0,008
90 доба	активність лужної фосфатази / активність кислої фосфатази	7,62 (7,29; 8,05) p_3 = 0,008 p_4 = 0,008	6,80 (6,32; 7,22) p_1 = 0,008 p_3 = 0,008 p_4 = 0,008	6,63 (7,19; 7,15) p_2= 0,008 p_3 = 0,008 p_4 = 0,008	7,88 (7,34; 8,25) p_1 = 0,008 p_2 = 0,016 p_3 = 0,008 p_4 = 0,116

Примітки: p_1 – порівняння показників у щурів різного віку з однаковим типом заповнення дефекту на однаковий термін після втручання; p_2 – порівняння показників групи з алоімплантатами та мезенхімальними стовбуровими клітинами з групою з алоімплантатами у щурів однакового віку на однаковий термін після втручання; p_3 – порівняння показників у тварин одного віку та типу заповнення дефекту з показниками щурів на 14-у добу після операції; p_4 – порівняння показників у щурів однакового віку та типу заповнення дефекту на 90-у добу після операції з показниками групи шурів на 28-у добу після втручання.

На 28-у добу у 3-місячних щурів із алоімплантатами з МСК величина ступеня мінералізації та співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові достовірно не відрізнялася від такого у 3-місячних щурів без з МСК аналогічного віку та терміну експерименту.

У порівнянні із даними 3-місячнних щурів із МСК на 14-у добу в даної групи експериментальних щурів спостерігалося у 1,12 разів більш високе значення співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз (p = 0,008). За ступенем мінералізації подібних розбіжностей між зазначеними групами порівняння зафіксовано не було.

28-а доба. 12-місячні тварини. У 12-місячних щурів із алоімплантатами без МСК на 28-у добу ступень мінералізації та співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз достовірно не відрізнялися від таких показників у 3-місячних шурів без МСК на той же термін експерименту.

При порівнянні розрахункових показників мінералізації у 12-місячних щурів із алоімплантатами без МСК на 28-у добу не виявлено достовірної різниці із аналогічними щурами на 14-у добу експерименту за ступенем мінералізації. В той же час, величина співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз на цей термін експерименту достовірно знижувалася у 1,12 разів (p = 0,016).

Впродовж експерименту у 12-місячних щурів із МСК ступень мінералізації, і, вірогідно, пов'язані із ним активність початкових стадій перебудови кісткової тканини, спочатку знижувався у 1,14 разів на 28-у добу досліду порівняно із таким у щурів аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 14-у добу (p = 0,008), що вказує на затримку в умовах використання алоімплантатів без МСК саме пізніх стадій ремоделювання кісткової тканини.

У 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, порівняно з даними групи 3-місячних тварин з використанням МСК, на 28-у добу спостерігалися достовірно нижчі значення за обома досліджуваними показниками. В обох випадках було зафіксовано різницю у 1,20 разів (p = 0,008, p = 0,008).

У 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, порівняно з даними групи 12-місячних тварин без використання МСК ступінь мінералізації був нижчим в 1,18 разів (p = 0,008) на 28-у добу, що свідчить про вплив використання МСК в напрямку уповільнення протікання пізніх стадій кальцифікації кісткової тканини (**табл.**).

Відповідно і співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз у 12-місячних із алоімплантатами, насиченими МСК, на 28-у добу експерименту поступалося такому у 12-місячних щурів із алоімплантатами без МСК у 1,23 рази (p = 0,008).

Порівняння обох розрахункових показників мінералізації у 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, на 28-у добу із даними аналогічних тварин на 14-у добу виявили достовірно менші значення. Так за ступенем мінералізації було зафіксовано різницю у 1,14 разів (p = 0,008), а за співвідношенням активності лужної та кислої фосфатази сироватки крові – у 1.27 разів (p = 0,008) (**табл.**). Зазначене вказує на очевидне суттєве зниження активності перебігу як початкових, так і прикінцевих стадій мінералізації у щурів в умовах використання алоімплантатів, насичених МСК на даний термін.

90-а доба. 3-місячні тварини. У 3-місячних щурів із алоімплантатами без МСК на 90-у добу спостерігалося зниження ступеня мінералізації, який відображує завершальні стадії перебудови кісткової тканини у 1,13 разів відносно рівня такого у тварин аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 14-у добу (p = 0,008) та у 1,12 разів відносно даних у аналогічної групи експериментальних щурів на 28-у добу досліду (p = 0,008) (**табл.**).

У 3-місячних щурів із алоімплантатами без МСК на протязі експерименту спостерігалося достовірне прогресивне зниження співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз сироватки крові, яке характеризує перебіг початкових стадій ремоделювання кісткової тканини, зокрема на 90-у добу величина даного показника була меншою у 1,39 разів у порівнянні із таким на 14-у добу експерименту (p = 0,008) і у 1,27 рази, ніж така у групи щурів аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 28-у добу експерименту (p = 0,008).

В 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, на 90-у добу визначено зниження ступень мінералізації порівняно з таким у експериментальних щурів аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 14-у добу в 1,13 разів (p = 0,008), а порівняно із даними аналогічної групи на 28-у добу – у 1,14 разів (p = 0,008), що відображає затримку перебігу повноцінної стадійності ремоделювання кісткової тканини внаслідок використання МСК.

Відношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові у 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, було нижчим на 90-у добу в 1,21 рази, ніж таке на 14-у добу (p = 0,008) та у 1,36 разів у порівнянні із даними на 28-у добу експерименту (p = 0,008), що вказує на пригнічення процесів початкового ремоделювання кісткової тканини на пізні терміни досліду.

За ступенем мінералізації 3-місячні щурі із алоімплантатами, насиченими МСК на 90-у добу достовірно не відрізнялися від відповідних показників у 3-місячних щурів без МСК.

В той же час співвідношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові у 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, на 90-у добу експерименту було достовірно меншим у 1,15 разів по відношенню до відповідного показника аналогічних тварин без МСК , що вказує на негативний вплив МСК на процеси ремоделювання кісткової тканини навіть на пізніх термінах експерименту (p = 0,008).

При розгляді динаміки змін розрахункових показників мінералізації кісткової тканини у 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, виявлено, що на 90-у добу досліду спостерігається зменшення даного показника у 1,13 разів у порівнянні із даними групи аналогічного віку та терміну експерименту із алоімплантатами без МСК (p = 0,008), та у 1,14 разів порівняно із даними у тварин на 28-у добу експерименту (p = 0,008), що також свідчить про затримку розвитку пізніх стадій мінералізації кісткової тканини внаслідок використання МСК.

Аналогічно цьому, співвідношення лужної та кислої фосфатаз у 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, на 90-у добу експерименту було у 1,21 рази меншим, ніж у аналогічних щурів на 14-у добу досліду (p = 0,008) та у 1,36 рази нижчим за таке у щурів на 28-у добу досліду (p = 0,008), що дає підстави вважати про затримку

і ранніх стадій мінералізації кісткової тканини внаслідок впливу на нього МСК.

90-а доба. 12-місячні тварини. При аналізі розрахункових індексів мінералізації кісткової тканини у 12-місячних щурів іх алоімплантатами без МСК визначено, що на 90-у добу вони не мали достовірних розбіжностей із таким за ступенем мінералізації у 3-місячних щурів із алоімплантатами без МСК. В той же час, за величиною співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз щури зазначеної групи достовірно поступалися такому у групи порівнянні у 1,12 разів (p = 0,008), що свідчить про меншу активність початкових стаді мінералізації кісткової тканини на пізніх термінах загоєння дефекту.

У 12-місячних щурів без використання МСК на 90-у добу мало місце зниження ступеня мінералізації у 1,10 разів відповідно до рівня такого у групи щурів аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 14-у добу (p = 0,008) та у 1,09 разів порівняно із таким у аналогічної групи на 28-у добу (p = 0,008), з чого можна зробити висновок про прогресивне зниження активності завершальних стадій ремоделювання кісткової тканини.

Співвідношення активності лужної та кислої фосфатази у 12-місячних щурів із алоімплантатами без МСК прогресивно знижувалося на протязі всього терміну експерименту. Так, на 90-у добу воно було меншим у 1,53 рази відповідно до даних на 14-у добу (p = 0,008) та у 1,36 разів порівняно із таким у аналогічних експериментальних щурів на 28-у добу досліду (p = 0,008) (**табл.**).

У 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, на 90-у добу величина ступеня мінералізації була більшою у 1,06 разів ніж така у 3-місячних тварин відповідного терміну експерименту та умов заповнення дефекту алоімплантатами із МСК (p = 0,008), що свідчить про більшу активацію прикінцевих перетворень ремоделювання кісткової тканини у 12-місячних тварин на 90-у добу.

За співвідношенням активності лужної та кислої фосфатаз сироватки крові зазначена група також переважала таке у 3-місячних тварин із МСК у 1,19 разів (p = 0,008).

На 90-у добу 12 місячні щури із використанням МСК не мали за ступенем мінералізації достовірних розбіжностей з таким у групи 12-місячних щурів без МСК (**табл.**).

В той же час за величиною співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз у 12 місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, спостерігалося більше у 1,19 разів значення, ніж таке у аналогічних щурів із алоімплантатами без МСК (p = 0,008).

Впродовж експерименту у 12-місячних щурів із МСК ступень мінералізації, і, вірогідно, пов'язані із ним активність початкових стадій перебудови кісткової тканини на 90-у добу підвищувався майже до початкових значень на 14-у добу, а саме, у 1,11 разів порівняно із таким у щурів аналогічного віку та умов заповнення дефекту на 28-у добу (p = 0,008) при відсутності достовірної різниці із показником на 14-у добу експерименту.

Відношення активності лужної та кислої фосфатаз сироватки крові, за яким можна судити про активність початкових стадій ремоделювання кісткової тканини, у 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, порівняно з даними у аналогічних щурів на 14-у добу був достовірно більшим у 1,27 разів (p = 0,008) та не відрізнявся від показника на 28-у добу (**табл.**).

Як відомо з літератури, розрахункові показники співвідношення активності лужної до активності кислої фосфатаз, а також ступінь мінералізації (співвідношення вмісту кальцію та білка) можуть бути використані для оцінювання якості процесу ремоделювання [18].

Таким чином, на підставі результатів біохімічного дослідження сироватки крові експериментальних щурів 3-х і 12-місячного віку із дефектом критичного розміру у метафізі стегнової кістки в умовах заповнення дефекту кістковими алоімплантатами, насиченими МСК та без використання МСК визначено, що у 3-місячних щурів без МСК на протязі експерименту спостерігалося прогресивне зниження співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз сироватки крові, що вказує на поступове затихання перебігу початкових стадій мінералізації нової кісткової тканини. На 90-у добу зафіксовано зниження ступеня мінералізації, який відповідає темпу насичення кісткової тканини кальцієм на більш пізніх стадіях процесу відносно такого у тварин на 14-у та на 28-у добу.

У 12-місячних тварин із алоімплантатами без МСК темпи проходження початкових стадій мінералізації кісткової тканини прогресивно знижувалося на протязі всього терміну експерименту, про що свідчить динаміка співвідношень активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові. У 12-місячних щурів із алоімплантатами без використання МСК на 90-у добу мало місце достовірне зниження темпу пізніх стадій кальцифікації кісткової тканини відповідно до рівня такого на 14-у та на 28-у добу, що відображено у динаміці значень ступеня мінералізації.

У 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, спершу мало місце прискорення початкових стадій мінералізації кісткової тканини, а потім на 90-у добу темп даного процесу, вочевидь, знов знижувався до початкового рівня, про що свідчить динаміка змін відношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові. На 14-у та

на 90-у доби, виходячи із значень даного співвідношення, і порівняно із даними групи з алоімплантатами без використання МСК, темп початкових стадій мінералізації у групи щурів, які отримували алоімплантати з МСК, був менш активним, ніж у випадку використання алоімплантатів без МСК.

Використання алоімплантатів, насичених МСК, для заповнення дефектів у 12-місячних щурів призводило до зменшення темпів початкових стадій мінералізації кісткової тканини на 28-у добу із подальшим підвищенням на 90-у добу, що підтверджується динамікою змін відношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові. У 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, швидкість плину кальцифікації кісткової тканини на 14-у та 28-у добу була нижчою, ніж в умовах встановлення алоімплантатів без МСК, причому на 28-у добу вона ще знижувалася, порівняно із такою на 14-у добу, а потім, на 90-у добу знов підвищувалася майже до початкових значень, судячи по змінам значень ступеня мінералізації.

У 12-місячних щурів із алоімплантатами без МСК темпи початкових стадій мінералізації кісткової тканини тільки на 90-у добу достовірно поступалися таким у відповідних 3-місячних тварин, виходячи із значень співвідношення активності лужної та кислої фосфатази сироватки крові.

Швидкість перебігу пізніх стадій кальцифікації кісткової тканини у 12-місячних щурів без використання МСК протікали із темпами аналогічними таким у відповідних 3-місячних експериментальних тварин, що знаходило відображення у співставних значеннях розрахункового ступеня мінералізації.

У 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, темп перебігу початкових стадій мінералізації кісткової тканини на 14-у добу достовірно переважав такий у відповідних 3-місячних тварин, на 28-у добу, поступався такому, та на 90-у добу експерименту знов доганяв та переганяв рівень у 3-місячних тварин з МСК, про що можна зробити висновки за змінами відношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові.

У 12-місячних щурів із використанням МСК швидкість плину завершальних стадій кальцифікації кісткової тканини була нижчою, ніж така у 3-місячних щурів із використанням МСК на 14-у та 28-у доби експерименту, про що свідчать менші величини ступеню мінералізації у аналізованої групи.

Висновки

1. На підставі результатів біохімічного дослідження сироватки крові експериментальних щурів 3- і 12-місячного віку із дефектом критичного розміру у метафізі стегнової кістки із заповненням дефекту кістковими алоімплантатами, насиченими мезенхімальнимистовбуровимиклітинами, та без такого насичення визначено, що у 3-місячних щурів без мезенхімальних стовбурових клітин на протязі експерименту спостерігалося прогресивне затихання початкових стадій мінералізації кісткової тканини, про що можна судити за зменшенням співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз сироватки крові. На 90-у добу зафіксовано зниження активності насичення кісткової тканини кальцієм на більш пізніх стадіях мінералізації, чому відповідає динаміка змін ступеня мінералізації.
2. У 3-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими мезенхімальними стовбуровими клітинами, спершу мало місце прискорення початкових стадій мінералізації кісткової тканини, а на 90-у добу темп даного процесу знов знижувався до початкового рівня, про що свідчить динаміка змін відношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові.
3. У 12-місячних тварин із алоімплантатами без мезенхімальних стовбурових клітин темпи проходження початкових стадій мінералізації кісткової тканини прогресивно знижувалися на протязі всього терміну експерименту, про що свідчить динаміка співвідношень активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові. У даної групи тварин на 90-у добу мало місце достовірне зниження темпу пізніх стадій мінералізації кісткової тканини відповідно до рівня такого на 14-у та 28-у доби, що відображено у динаміці значень ступеня мінералізації.
4. Введення мезенхімальних стовбурових клітин до алоімплантатів при заповненні зони дефекту метафізу стегнової кістки у 3-місячних щурів призводило до зниження темпу початкових стадій мінералізації кісткової тканини на 14-у та на 90-у доби, порівняно із даними групи щурів з алоімплантатами без використання мезенхімальних стовбурових клітин, про що свідчать їх менші значення відношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові.
5. У 12-місячних щурів використання алоімплантатів, насичених мезенхімальними стовбуровими клітинами, для заповнення дефектів критичного розміру стегнової кістки призводило до зменшення темпів початкових стадій мінералізації кісткової тканини на 14-у та на 28-у доби із подальшим підвищенням на 90-у добу, що підтверджується динамікою змін відношення

активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові. Використання алоімплантатів, насичених мезенхімальними стовбуровими клітинами, у 12-місячних щурів призводило до зниження швидкості мінералізації кісткової тканини в рамках пізніх стадій її ремоделювання на 14-у та 28-у добу, причому на 28-у добу даний процес ще більше уповільнювався, порівняно із таким на 14-у добу, а потім, на 90-у добу знов прискорювався майже до початкових темпів, судячи по змінам величини ступеня мінералізації.

6. При порівнянні показників, що характеризують мінералізацію кісткової тканини як у 3-місячних так і у 12-місячних щурів без використання мезенхімальних стовбурових клітин виявлено, що у 12-місячних щурів темпи початкових стадій мінералізації кісткової тканини тільки на 90-у добу достовірно поступалися таким у відповідних 3-місячних тварин, виходячи із значень співвідношення активності лужної та кислої фосфатази сироватки крові. Швидкість перебігу пізніх стадій мінералізації кісткової тканини у 3-місячних та 12-місячних щурів без використання мезенхімальних стовбурових клітин протікали із подібними темпами, що знаходило відображення у співставних значеннях розрахункового ступеня мінералізації.
7. У 12-місячних щурів із алоімплантатами, насиченими МСК, темп перебігу початкових стадій мінералізації кісткової тканини на 14-у добу достовірно переважав такий у відповідних 3-місячних тварин, на 28-у добу, поступався такому, та на 90-у добу експерименту знов доганяв та переганяв зазначений показник, про що можна зробити висновки за змінами відношення активності лужної до кислої фосфатаз сироватки крові. У 12-місячних щурів із використанням мезенхімальних стовбурових клітин темпи завершальних стадій мінералізації кісткової тканини був нижчим, ніж такий у 3-місячних щурів із використанням мезенхімальних стовбурових клітин на 14-у та 28-у доби експерименту, про що свідчать менші величини ступеню мінералізації у старших тварин.
8. Лікування експериментальних щурів із дефектом критичного розміру у метафізі стегнової кістки алоімплантатами, насиченими мезенхімальними стовбуровими клітинами, особливо на ранніх стадіях, призводить до уповільнення процесів ремоделювання кісткової тканини.

Перспективи подальшого дослідження. Проблема заповнення дефектів кісткової тканини при її бракуванні внаслідок травм, пухлин, інших причин вельми актуальна в усьому світі.

У всьому світі значна кількість хворих потребують ортопедичних втручань з використанням кісткових трансплантатів. Для підвищення їх остеокондуктивних й остеоіндуктивних якостей уявляється важливим подальше та більш поглиблене вивчення впливу факторів, стимулюючих регенерацію кісткової тканини на різних стадіях процесу.

Розробка оптимального протоколу використання алоімплантатів та найбільш активних стимулюючих регенерацію факторів у зазначеної категорії пацієнтів потребує продовження подальшого наукового пошуку.

References

1. Hodges WM, O'Brien F, Fulzele S, Hamrick MW. Function of microRNAs in the Osteogenic Differentiation and Therapeutic Application of Adipose-Derived Stem Cells (ASCs). *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2597. PMID: 29207475. PMCID: PMC5751200. doi: 10.3390/ijms18122597
2. Shafaei H, Kalarestaghi H. Adipose-derived stem cells: An appropriate selection for osteogenic differentiation. *J Cell Physiol.* 2020 Nov;235(11):8371-8386. PMID: 32239731. doi: 10.1002/jcp.29681
3. Mende W, Götzl R, Kubo Y, Pufe T, Ruhl T, Beier JP. The Role of Adipose Stem Cells in Bone Regeneration and Bone Tissue Engineering. *Cells*. 2021 Apr 21;10(5):975. PMID: 33919377. PMCID: PMC8143357. doi: 10.3390/cells10050975
4. Reumann MK, Linnemann C, Aspera-Werz RH, Arnold S, Held M, Seeliger C,et al. Donor Site Location Is Critical for Proliferation, Stem Cell Capacity, and Osteogenic Differentiation of Adipose Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Implications for Bone Tissue Engineering *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 26;19(7):1868. PMID: 29949865. PMCID: PMC6073876. doi: 10.3390/ijms19071868
5. Xu L, Liu Y, Sun Y, Wang B, Xiong Y, Lin W, et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):275. PMID: 29208029. PMCID: PMC5718061. doi: 10.1186/s13287-017-0716-x

6. Z Y, Li Q, Luo S, Liu Z, Luo D, Zhang B, et al. PPARγ and Wnt Signaling in Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2016;11(3):216-25. PMID: 25986621. doi: 10.2174/1574888x10666150519093429
7. Zhang Z, Yang X, Cao X, Qin A, Zhao J. Current applications of adipose-derived mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration: A review of cell experiments, animal models, and clinical trials. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:942128. PMID: 36159705. PMCID: PMC9490047. doi: 10.3389/fbioe.2022.942128
8. Paduano F, Marrelli M, Amantea M, Rengo C, Rengo S, Goldberg M, et al. Adipose Tissue as a Strategic Source of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration: A Topical Review on the Most Promising Craniomaxillofacial Applications. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2140. PMID: 29027958. PMCID: PMC5666822. doi: 10.3390/ijms18102140
9. Mao S-H, Chen C-H, Chen C-T. Osteogenic potential of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):303. PMID: 31623672. PMCID: PMC6798413. doi: 10.1186/s13287-019-1402-y
10. Verkhovna Rada of Ukraine, Zakon Ukrainy vid 21 lyutoho 2006r. Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennya [On the protection of animals from brutal treatment]. Revision: February 13, 2020, accessed: January 20, 2021 [Ukrainian]. Available from: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/en/3447-15/ed20200213#Text
11. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes Strasbourg, 18.III.1986:11 p. Available from: https://rm.coe.int/168007a67b
12. 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 (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union, 2010, 20.10:276/33-276/79. Available from: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF
13. Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *Biomed Res Int*. 2014;2014:348635. PMID: 24738053. doi: 10.1155/2014/348635
14. Tao ZS, Wu XJ, Zhou WS, Wu XJ, Liao W, Yang M, et al. Local administration of aspirin with β–tricalcium phosphate/poly–lactic–co–glycolic acid (β–TCP/PLGA) could enhance osteoporotic bone regeneration. *J Bone Miner Metab*. 2019;37:1026–35. PMID: 31076895. doi: 10.1007/s00774-019-01008-w
15. *Patent 119699 Ukraine*, MPK A61K 35/32 (2015.01), A61F 2/28 (2006.01), A61P 19/00. Sposib vyhotovlennya implantatsiynoho dehidratovanoho kistkovoho biomaterialu alohennoho pokhodzhennya [Method of manufacturing implantation dehydrated bone biomaterial of allogeneic origin]. Korzh MO, Vorontsov PM, Slota OM, Husak VS, Vorontsova MP. (UA); zayavniky i vlasniky patentu Korzh MO, Vorontsov PM, Slota OM, Husak VS, Vorontsova MP. (UA). № a201709455 ; zayavl 27.09.2017 ; opubl 25.07.2019. Byul № 14. [Ukrainian]
16. Kamyshnikov VS. *Methods of clinical laboratory research*. 2018. 736 p. ISBN: 978-5-00030-511-9
17. Lang TA, Sesik MM. *How to describe statistics in medicine. An annotated guide for authors, editors, and reviewers*. 2011. 480 p. ISBN: 978-5-98811-173-3
18. Talashova IA, Gasanova AG, Tkachuk EA. Demonstration of phosphatase activity and electrolyte exchange under the conditions of implantation of calcium phosphate materials. *Genius of Orthopedics*. 2010;4:94–98.

UDC 616.71–003.93–089.843:611.018.54:611.018–08

Changes in Calculated Indices of Blood Serum Biochemical Indicators of Rats of Different Age after Filling of the Defect in the Metaphysis of the Femur Bone with Allogeneic Bone Implants Saturated with Mesenchymal Stem Cells

Vorontsov P. M., Tulyakov V. O., Gulida T. I.

Abstract. *The purpose of the study* was based on the analysis of calculated biochemical parameters of mineralization in the blood serum of laboratory rats to evaluate the course of metabolic processes in bone tissue after filling a defect of critical size in the metaphysis of the femur with allogeneic bone implants saturated with mesenchymal stem cells.

Materials and methods. Indicators of mineralization of bone tissue in the blood serum of white rats were studied (the content of total protein, calcium, alkaline and acid phosphatase activity), the ratio of alkaline to acid phosphatase activity, as well as the degree of mineralization, were calculated.

Results and discussion. In 3-month-old rats with alloimplants without mesenchymal stem cells on the 90th day, a decrease in the degree of mineralization was observed, which reflects the final stages of bone tissue remodeling by 1.13 times compared to the level of this in animals of a similar age and conditions of filling the defect on the 14th day ($p = 0.008$) and 1.12 times compared to the data on the 28th day of the experiment ($p = 0.008$).

In 3-month-old rats with alloimplants saturated with mesenchymal stem cells, a decrease in the degree of mineralization on the 90th day was determined compared to that in experimental rats of a similar age and defect filling conditions on the 14th day by 1.13 times (p = 0.008), and compared with the data of the similar group on the 28th day – 1.14 times (p = 0.008), which reflects the delay in the course of the full stage of bone tissue remodeling due to the use of mesenchymal stem cells.

The ratio of serum alkaline to acid phosphatase activity in 3-month-old rats with alloimplants saturated with mesenchymal stem cells was 1.32 times lower on the 14th day compared to the data of a group of the same age with alloimplants without mesenchymal stem cells (p = 0.008), and on the 90th day – by 1.12 times (p = 0.008), which also indicates a delay in the early stages of bone tissue mineralization due to the use of mesenchymal stem cells as part of alloimplants.

In 12-month-old rats without the use of mesenchymal stem cells, on the 90th day, there was a decrease in the degree of mineralization by 1.10 times, in accordance with the level of this in a group of rats of a similar age and conditions of defect filling on the 14th day (p = 0.008) and by 1.09 times compared to that on the 28th day (p = 0.008), from which we can conclude about a progressive decrease in the activity of the final stages of bone tissue remodeling.

The ratio of the activity of alkaline and acid phosphatase in 12-month-old rats with alloimplants without mesenchymal stem cells on the 90th day was significantly inferior to that in the corresponding 3-month-old animals by 1.12 times (p = 0.008), which indicates a lower activity of the initial stages of bone tissue mineralization in the late stages of defect healing. This indicator progressively decreased during the experiment. Thus, on the 28th day, it was 1.12 times smaller than on the 14th day, and on the 90th day – by 1.53 times less, in accordance with the data on the 14th day (p = 0.008) and by 1.36 times compared to that on the 28th day (p = 0.008).

Conclusion. Treatment of experimental rats with a critical size defect in the femoral metaphysis with alloimplants saturated with mesenchymal stem cells, especially in the early stages, leads to a slowing down of bone tissue remodeling processes.

Keywords: alloimplant, defect, modeling, biochemistry, mineralization, calculated indicators.

ORCID and contributionship:
Petro Vorontsov : 0000 0002-5758-7223 A,B
Vladislav Tuljakov : 0000-0002-3187-1592 D,F,E
Tetjana Gulida : 0000 0001 5239 4732 B,C

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR
Petro Vorontsov
Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology Ukrainian National Academy of Medical Sciences,
Department of Transplantology
80, Pushkinska Str., Kharkiv 64002, Ukraine
phone: +380577251430, e-mail: vorontsov63@ukr.net

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Received 18.12.2022
Accepted 11.01.2023
Recommended for publication by a meeting of the editorial board after review