

УДК 616.71-003.93-089.843:611.018.54:611.018-08

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872023343-50>

## Гістологічна структура стегнових кісток щурів за умов пластики дефектів у дистальному метафізі 3D-друкованими імплантатами на основі полілактиду та трикальційфосфату в поєднанні з мезенхімальними стромальними клітинами

Н. О. Ашукіна<sup>1</sup>, Н. М. Гонтар<sup>2</sup>, З. М. Данишук<sup>1</sup>, О. А. Нікольченко<sup>1</sup>, Я. Д. Калюжна<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», Харків

<sup>2</sup> Харківський національний медичний університет. Україна

*Poly(lactide) (PLA) frameworks printed on a 3D printer are used for filling the bone defects. The osteotropic properties of 3D-PLA can be improved by combining with tricalcium phosphate (TCP) and mesenchymal stromal cells (MSCs). Objective. Study the reconstruction in the rat femurs after implanting 3D-printed implants based on PLA and TCP (3D-I) in combination with cultured allogeneic MSCs into defects in the distal metaphysis. Methods. 48 white laboratory rats (age 5–6 months) were used, which were randomly divided into groups: Control — 3D-I; Experiment-I — 3D-I, saturated MSCs; Experiment II — 3D-I, with injection of 0.1–0.2 ml of medium with MSCs into the area of surgical intervention 7 days after implantation. 15, 30 and 90 days after the operation, histological (with histomorphometry) studies were conducted. Results. The area of 3D-I decreased with time in all groups and connective and bone tissues formed in different ratios. 15 days after the surgery, in the Experiment-I group, the area of the connective tissue was 1.9 and 1.6 times greater ( $p < 0.001$ ) in comparison to the Control and Experiment II; 30 days it was greater 1.6 times ( $p < 0.001$ ) and 1.4 times ( $p = 0.001$ ), respectively. 30 days after the surgery, the area of newly formed bone in the Experiment-I group was 2.2 times ( $p < 0.001$ ) less than in the Control. On the contrary, in the Experiment-II, the area of newly formed bone was 1.5 and 3.3 times greater ( $p < 0.001$ ) compared to Experiment-I and Control, respectively. Conclusions. The studied 3D-I with time after their implantation into the metaphyseal defects of the rats' femurs are replaced by connective and bone tissues. The use of 3D-I, saturated MSCs, 15 and 30 days after the surgery, caused excessive formation of connective tissue and slower bone formation. Local injection of MSCs 7 days after the implantation of 3D-I caused to the formation of a larger area of newly bone 30th day after surgery compared to 3D-I alone and 3D-I with MSCs. Key words. Rat model, bone defect, bone regeneration, additive technologies, polylactide, tricalcium phosphate, mesenchymal stromal cells.*

Для заміщення дефектів кісток використовують надруковані на 3D-принтері каркаси з полілактиду (poly(lactide), PLA). Їхні остеотропні властивості можна покращити шляхом комбінації з трикальційфосфатом (ТКФ) та мезенхімальними стромальними клітинами (МСК). Мета. Дослідити перебудову стегнової кістки щурів після імплантації в дірчастий метафізарний дефект 3D-друкованих імплантатів на основі PLA та ТКФ (3D-I) в поєднанні з культивованими аlogenними МСК. Методи. Використано 48 білих лабораторних щурів (вік 5–6 міс.), яких у випадковий спосіб розподілили на групи: Контроль — 3D-I; Дослід I — 3D-I, насичений МСК; Дослід II — 3D-I з ін'єкційним введенням 0,1–0,2 мл середовища з МСК у ділянку хірургічного втручання через 7 днів після імплантації. Через 15, 30 і 90 днів після операції виконано гістологічні (з гістоморфометрією) дослідження. Результати. Відносна площа 3D-I протягом експерименту зменшувалася в усіх групах з утворенням сполучної та кісткової тканин у різних співвідношеннях. У групі Дослід-I через 15 днів після операції відносна площа сполучної тканини виявилася більшою в 1,9 і 1,6 рази ( $p < 0,001$ ) порівняно з величинами в групах Контроль і Дослід II відповідно; через 30 днів — в 1,6 рази ( $p < 0,001$ ) і в 1,4 рази ( $p = 0,001$ ) відповідно. На 30-ту добу в групі Дослід-I площа кісткової тканини була в 2,2 рази ( $p < 0,001$ ) меншою порівняно з Контролем, а в групі Дослід-II, навпаки, — більшою в 1,5 і 3,3 рази ( $p < 0,001$ ) порівняно з Дослід-I і Контроль відповідно. Висновки. Досліджені 3D-I з плином часу після їхнього встановлення в метафізарних дефектах стегнових кісток щурів заміщуються сполучною та кістковою тканинами. Використання 3D-I, насиченого МСК, призводить до утворення більших обсягів сполучної тканини на 15 та 30-ту доби й уповільнення кісткоутворення. Локальне введення МСК через 7 днів після встановлення 3D-I сприяло утворенню більшого обсягу кісткової тканини на 30-ту добу після операції порівняно з 3D-I самотійно та 3D-I одночасно з МСК.

**Ключові слова.** Моделювання на щурах, дефект кістки, регенерація кістки, адитивні технології, полілактид, трикальційфосфат, мезенхімальні стромальні клітини

## Вступ

Розроблення остеопластичних матеріалів для ортопедичної хірургії пов'язане з необхідністю лікування дефектів кісток, які не загоюються самостійно через великі розміри та є наслідком травм, вогнепальних поранень, видалення новоутворень, інфекції тощо. Проблема постала гостріше в Україні через активні військові дії, коли застосування високоенергетичної зброї серед постраждалих збільшило кількість осіб із переломами довгих кісток, ускладнених утворенням значних дефектів [1]. Саме сегментарні діафізарні дефекти довгих кісток критичного розміру, за визначенням, є нездатними до спонтанного загоєння й, отже, є показанням до хірургічного втручання [2].

«Золотим стандартом» для заміщення кісткової тканини залишаються кісткові автотрансплантати. Проте їхнє використання обмежене кількістю матеріалу, необхідністю додаткового хірургічного втручання, болючістю донорської ділянки та ймовірними ускладненнями [3, 4]. Перспективною альтернативою авто- й алотрансплантатам вбачаються штучні біокерамічні каркаси на основі фосфату та сульфату кальцію [5], застосування яких постійно збільшується завдяки досягненням у галузі інженерії кісткової тканини [6–8]. Проте властивості нових продуктів далекі від оптимальних. Відомо про низьку швидкість вrostання в них кісткової тканини та небажані ефекти [7]. Новим етапом у розвитку біоінженерного підходу для оптимізації відновлення кісткової тканини стало використання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) у поєднанні з біоматеріалами для підвищення остеогенних якостей останніх [9]. Кількість і функціональна активність МСК є одним із важливих складових процесу регенерації кістки, що підтверджено в експериментальних дослідженнях на мишах. Автори показали, що через 8 тижнів після відтворення перелому великогомілкової кістки ( $85 \pm 10$  %) остеобластів у регенераті є похідними з МСК кісткового мозку [10]. До того ж, МСК здатні не лише мігрувати в ділянку травми та безпосередньо диференціюватися в кісткові клітини, а й можуть локально змінювати середовище шляхом синтезу факторів росту, що сприяє залученню інших клітин і покращенню репаративного остеогенезу [9, 11].

Починаючи з 80-х років минулого сторіччя технологія тривимірного (3D) друку для створення медичних імплантатів розвивається досить

швидко [12]. Вона дає змогу виготовити індивідуальні зразки, які за формою й обсягом відповідають дефектові в травмованій ділянці скелета, із достатньою механічною міцністю та сприятливою макро- й мікроструктурою [13]. Для 3D-друку використовують високопористий титан (ацетабулярні компоненти для тотального ендопротезування кульшового суглоба) [14, 15], керамічні матеріали [16], різні полімери, проте частіше — полілактиди (polylactide, PLA) та полігліколіди, а також композити на їхній основі [17, 18]. Серед переваг надрукованих на 3D-принтері імплантатів із біорозчинних матеріалів слід зазначити відсутність повторної операції для їхнього видалення, остеокондуктивні й остеоіндуктивні властивості, відповідну дефектові форму, простоту та швидкість виготовлення. Проте зміна фізико-хімічних властивостей матеріалів (хімічний склад, біомеханіка, додані біологічні агенти тощо) із метою покращення їхньої якості обумовлює виконання комплексних преклінічних досліджень щодо визначення їхньої біосумісності, міцності, здатності до біодеградації, остеотропності.

*Мета:* дослідити перебудову стегнової кістки щурів після імплантації в дірчастий метафізарний дефект 3D-друкованих імплантатів на основі полілактиду та трикальційфосфату в поєднанні з мезенхімальними стовбуровими клітинами.

## Матеріал і методи

План дослідження схвалено на засіданні комітету з біоетики при ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (протокол № 205 від 13 липня 2020 р.) відповідно до Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 26, 31), Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) та Директиви 2010/63/EU [19, 20].

### *Тварини*

У дослідженні використано 48 білих лабораторних щурів популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», яким виконано дірчастий дефект у дистальному метафізі стегнової кістки. Вік тварин на початок експерименту становив 5–6 міс., маса тіла — ( $365,8 \pm 6,4$ ) г. У випадковий спосіб щурів розподілили на групи залежно від імплантованого матеріалу:

– Контроль — 3D-друкований імплантат (3D-I);

– Дослід I — 3D-I у поєднанні з культивованими алогенними МСК;

– Дослід II — 3D-I з ін'єкційним введенням 0,1–0,2 мл середовища з культивованими алогенними МСК у ділянку хірургічного втручання через 7 діб після імплантації.

Додатково для отримання мезенхімальних стовбурових клітин за детально описаною методикою [21] використали 3 шурів.

По 5 тварин із кожної групи виводили з експерименту на 15; 30; 90-ту доби після хірургічного втручання шляхом декапітації під відкритим інгаляційним наркозом діетиловим ефіром (для забору крові для досліджень [22]) та вилучали в них оперовані стегнові кістки.

#### *Імплантати*

Для друкування імплантатів на 3D-принтері «Easy3DPrint» з екструдером (ТОВ Студія 3D-друку Easy 3D Print, Харків, Україна) використано композитну нитку з ПЛА та трикальційфосфату (ТКФ), виготовлену шляхом змішування 60 % гранул ПЛА та 40 % мінерального компаунду (20 % ПЛА та 80 % ТКФ), нагрівання й екструзії. Товщина нитки дорівнювала 1,75 мм, діаметр гранул ПЛА (L-ПЛА) та ТКФ (ТКФ медичний, Китай) — 10 мкм. Отримані імплантати циліндричної форми (довжина 30 мм, діаметр 2,5 мм, розмір пор 300 мкм, пористість 45 %) розділяли на фрагменти довжиною 3 мм. Перед імплантацією в кістку шурів групи Дослід I 3D-друкований імплантат просочували впродовж 20 хв у 0,5 мл культурального середовища з  $10^6$  клітин, залишок клітин вводили в порожнину дефекту.

#### *Хірургічні втручання*

Операції виконано під загальним знеболюванням (кетамін 50 мг/кг, внутрішньом'язово) в умовах асептики й антисептики. Застосовуючи передньолатеральний доступ за допомогою стоматологічного бора моделювали дірчастий дефект діаметром 2,6 мм, глибиною 3 мм відповідно до розмірів виготовлених імплантатів. Рану промивали розчином декасану, висушували та з використанням press-fit техніки в дефекті кістки розміщували досліджувані зразки. М'які тканини зашивали пошарово, обробляли антисептичним засобом.

#### *Гістологічні дослідження*

Для гістологічного аналізу виділені стегнові кістки з ділянкою імплантації очищували від м'яких тканин, фіксували протягом 4 діб у 10 % розчині нейтрального формаліну, декальцинували в 10 % розчині мурашиної кислоти. Після цього відсічені дистальні метафізи зі зоною де-

фекту зневоднювали в спиртах збільшеної концентрації та заливали в парафін. Виготовлені фронтальні гістологічні зрізи 5–6 мкм завтовшки забарвлювали гематоксиліном та еозином (H & E) і пікофуксином за Ван-Гізеном, аналізували під світловим мікроскопом BX63 (Olympus, Японія). Цифрові знімки отримували за допомогою камери DP73 (Olympus).

#### *Гістоморфометрія*

Вимірювали площу дефекту імплантата, сполучної та кісткової тканин (на 4 центральних зрізах у кожній тварини), потім розраховували їхній відносний вміст (%) відносно до загальної площі дефекту. Використано програмне забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013).

#### *Статистичні дослідження*

Аналіз даних виконаний зі застосуванням програм «IBM Statistics SPSS 23 software» та «Microsoft Office Excel 2007». Результати вимірювань наведені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення у випадку нормального розподілу. Аналіз впливу різних типів матеріалів після їхньої імплантації на формування сполучної та кісткової тканини виконували за методом Стьюдента–Фішера. Різницю вважали статистично значущою за умови  $p < 0,05$  [23].

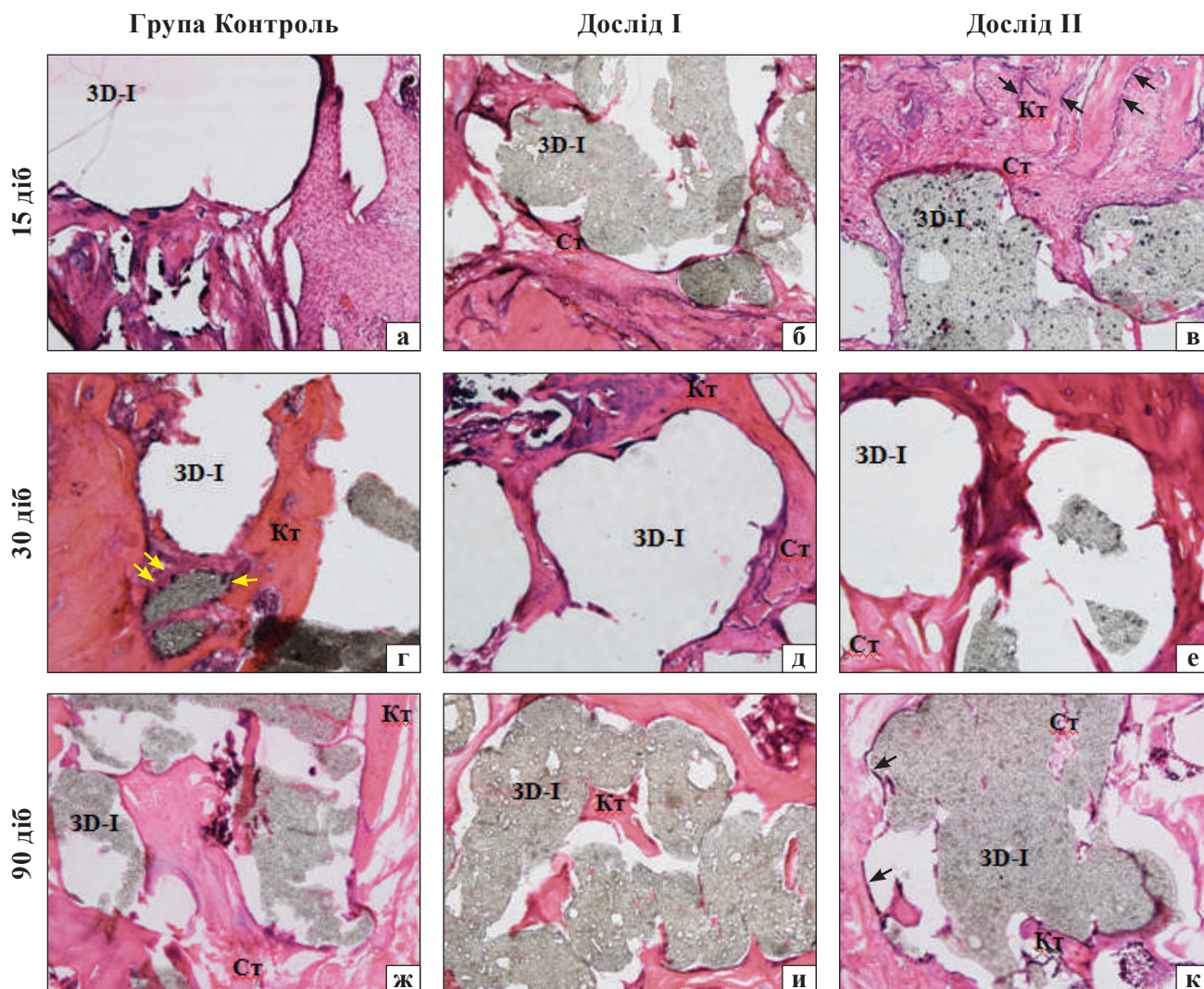
## **Результати та їх обговорення**

#### *15 діб після операції*

На гістологічних препаратах у зоні метафізарного дефекту стегнової кістки шурів усіх досліджуваних груп чітко візуалізували 3D-I, на поверхні якого виявлено ділянки утворення сполучної та кісткової тканин, які проростали в його зовнішні пори (рис. 1, а–в).

Сполучна тканина характеризувалась різним ступенем зрілості, складалась із пучків колагенових волокон, між якими розподілялися кровоносні капіляри, клітини фібробластичного та остеобластичного диферонів. Деякі з них мали витягнуті ядра та вузьку цитоплазму, інші — округлі ядра з 1–2 ядерцями та розвинуту базофільну цитоплазму, що свідчить про їхню високу функціональну активність, спрямовану на біосинтез компонентів матриксу.

Новоутворені кісткові трабекули грубоволокнистої структури містили густо розташовані остецити з гіпохромними ядрами та розвинутою цитоплазмою, на зовнішній поверхні — функціонально активні остеобласти з гіпохромними ексцентричними ядрами. Ознак запалення не виявлено в жодній тварини.

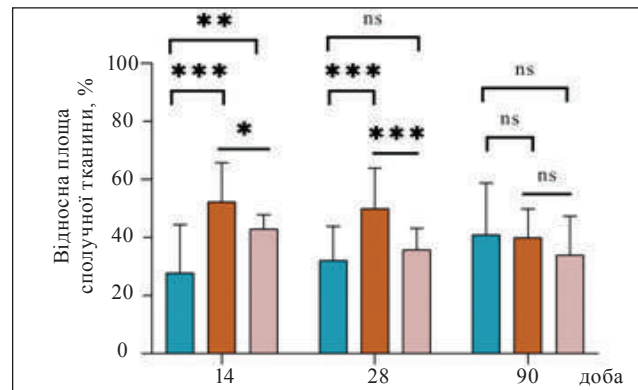
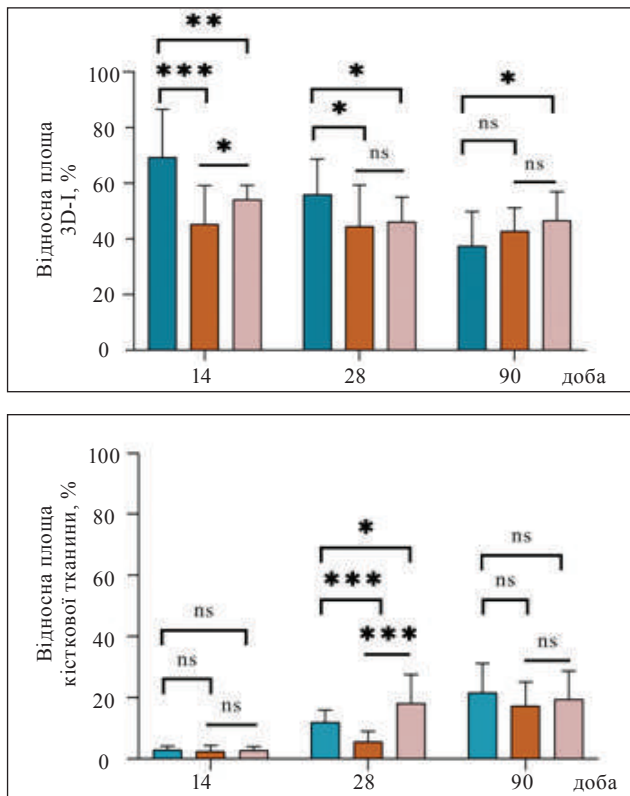


**Рис. 1.** Фрагменти дистальних метафізів стегнових кісток щурів через 15, 30 і 90 діб після імплантації 3D-друкованого імплантата (3D-I) (група Контроль), 3D-I у поєднанні з аlogenними культивованими МСК (Дослід I), 3D-I з введенням аlogenних культивованих МСК через 7 діб після операції (Дослід II). Показано сполучну (Ст) та кісткову (Кт) тканини навколо та в порах імплантата; чорними стрілками, в — функціонально активні остеобласти на поверхні новоутворених кісткових трабекул; жовтими стрілками, г — багатоядерні клітини чужорідних тіл на поверхні фрагментів 3D-I.  $\times 10$ . Гематоксилін та еозин

За результатами *гістоморфометрії* (рис. 2) визначено, що площа імплантата в зоні дефекту щурів групи Дослід I дорівнювала ( $45,28 \pm 13,90$ ) % і була меншою за показник Контролю ( $(69,31 \pm 17,33)$  %) в 1,5 разу ( $p < 0,001$ ), Дослід II ( $(54,19 \pm 5,11)$  % — в 1,3 разу ( $p = 0,009$ ). Відносна площа сполучної тканини, навпаки, виявилася більшою в 1,9 ( $p < 0,001$ ) і 1,6 разу ( $p < 0,001$ ) порівняно з величинами в Контролі (Дослід I —  $(52,25 \pm 13,56)$  %, Дослід II —  $(43,06 \pm 4,82)$  %, Контроль —  $(27,75 \pm 16,70)$  %) відповідно; а кісткової тканини — не відрізнялася. Порівняння між дослідними групами показало суттєві відмінності лише за показником відносної площі імплантата — він виявився більшим в 1,2 разу ( $p = 0,024$ ) в групі Дослід II.

#### 30 діб після операції

Гістологічна будова ділянки дефекту не змінилася порівняно з попереднім терміном дослідження: у ній розташовувався 3D-I, навколо нього та в його порах — щільна сполучна тканина та новоутворені кісткові трабекули (рис. 1, г–е). Пучки колагенових волокон у сполучній тканині були спрямовані паралельно поверхні імплантата й проникали в його середину. Поміж ними містилися кровоносні судини та бластні клітини видовженої форми з гіперхромними ядрами з дрібнозернистим хроматином. Новоутворені кісткові трабекули, які також проростали в середину імплантата, характеризувалися значною густиною остеоцитів, розташованих в лакунах, на їхній зовнішній поверхні виявлено шар функціонально активних остеобластів. Також на поверхні



■ Контроль  
■ 3D-I + MCK  
■ 3D-I + inMCK

**Рис. 2.** Відносні площі 3D-I та новоутворених тканин (кісткової та сполучної) по відношенню до загальної площі дефекту: ns — немає статистично значущої різниці; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ . Показники наведені як середнє та стандартне відхилення. Порівняння груп з/без використання MCK на кожен термін спостереження виконано за методом t-критерію Стьюдента

3D-I спостерігали багатоядерні клітини чужорідних тіл (рис. 1, г), що свідчить про перебіг клітинної резорбції.

За результатами *гістоморфометричного аналізу* (рис. 2) порівняно з показниками на 15-ту добу спостереження встановлено зменшення відносної площі 3D-I в 1,2 разу ( $p = 0,022$ ) в групах Контроль ( $(56,04 \pm 12,68) \%$ ) та Дослід II ( $(46,19 \pm 8,86) \%$ ); збільшення відносної площі кісткової тканини в 4,1 ( $p < 0,001$ ), 2,2 ( $p = 0,005$ ) і 6,5 разу ( $p < 0,001$ ) — відповідно група Контроль ( $(11,95 \pm 4,02) \%$  проти  $(2,94 \pm 1,18) \%$  на 15-ту добу), Дослід I ( $(5,51 \pm 3,48) \%$  проти  $(2,47 \pm 1,92) \%$ ), Дослід II ( $(18,01 \pm 9,49) \%$  проти  $(2,75 \pm 1,17) \%$ ). Порівняння вимірних показників між групами на однаковий термін дослідження (30-та доба) показало менші відносні площі 3D-I в 1,2 разу ( $p = 0,021$  і  $p = 0,013$  — Дослід I ( $(44,47 \pm 14,94) \%$ ) і Дослід II відповідно) щодо величин у Контролі, без відмінностей між дослідними групами. Відносна площа сполучної тканини виявилася більшою в групі Дослід I ( $(50,02 \pm 13,97) \%$ ) в 1,6 разу ( $p < 0,001$ ) порівняно з Контролем ( $(32,01 \pm 11,86) \%$ ), в 1,4 разу ( $p = 0,001$ ) — з групою Дослід II ( $(35,80 \pm 7,43) \%$ ).

#### 90 діб після операції

На гістологічних зрізах у ділянці дефекту визначено фрагменти 3D-I, форма якого була

змінена через його біодеградацію. По периметру та в порах 3D-I розташовувалися кісткова та сполучна тканини. У пори дрібного діаметра проникали кровеносні судини та клітини фібробластичного й остеобластичного диферонів (рис. 1, ж–к).

За результатами *гістоморфометричного аналізу* (рис. 2) встановлено, що відносна площа 3D-I зменшилася: у Контролі ( $(37,48 \pm 12,38) \%$ ) — в 1,8 разу ( $p < 0,001$ ) порівняно з показником на 15-ту добу, в 1,5 ( $p = 0,001$ ) — на 30-ту; Дослід II ( $(46,65 \pm 10,31) \%$ ) — в 1,2 разу ( $p = 0,011$ ) порівняно з показником цієї самої групи лише на 15-ту добу; Дослід I ( $(42,80 \pm 8,42) \%$ ) — суттєво не змінилася. При цьому не встановлено значущих відмінностей площ 3D-I на 90-ту добу спостереження між групами Контроль і Дослід I, Дослід I та Дослід II, а також кісткової тканини між усіма групами (Контроль —  $(21,64 \pm 9,54) \%$ , Дослід I —  $(17,30 \pm 7,80) \%$ , Дослід II —  $(19,42 \pm 9,32) \%$ ). Слід зазначити, що порівняно з отриманими на 15-ту добу після операції значеннями площа кісткової тканини була збільшеною в 7,4 разу ( $p < 0,001$ ) у групі Контроль і в 7,1 разу ( $p < 0,001$ ) — Дослід II, а в групі Дослід I — суттєво не змінилася. Відносна площа сполучної тканини, яку виявляли переважно у внутрішніх порах імплантата, зменшилася в 1,3 разу ( $p = 0,008$ ) порівняно

з 15-ю добою в групі Дослід II ( $(33,93 \pm 13,47)$  %), але не відрізнялась від показників груп Контроль ( $(40,88 \pm 17,92)$  %) та Дослід I ( $(39,90 \pm 10,00)$  %) на 90-ту після операції.

### Обговорення

У роботі надано результати гістологічного аналізу перебудови кісткової тканини імплантів на основі полілактиду та трикальційфосфату, виготовлених за технологією 3D-друку та встановлених у дірчасті дефекти в дистальних метафізах стегнових кісток щурів. Тварин випадково розділили на 3 групи: Контроль (встановлено 3D-I самостійно), Дослід I (3D-I перед встановленням насичений культивованими аlogenними МСК) та Дослід II (3D-I самостійно, а через 7 діб після цього локально в зону травми введено суспензію культивованих аlogenних МСК). Розмір дефекту обраний глибиною 3 мм, діаметром 2,6 мм, оскільки дефекти в метафізах довгих кісток щурів аналогічного розміру використовують для оцінювання ефективності остеопластичних матеріалів заміників кісткової тканини [5, 21, 24, 25].

Для створення тривимірних імплантів взято PLA як один із найчастіше використовуваних біорозчинних полімерів для 3D-каркасів у тканинній інженерії завдяки доведеній пластичності, біоінертності, здатності до біодеградації та можливості виведення продуктів розпаду природним шляхом [17, 18, 26]. Остетропні властивості PLA в 3D-конструкціях можна покращити шляхом комбінації з ТКФ [27], якому притаманна остеоіндукція, тобто здатність до стимуляції диференціації клітин в остеогенному напрямку [5, 28, 29]. Крім того, ми застосували біологічний чинник, який потенційно може сприяти утворенню кісткової тканини [30], — МСК, отримані з жирової тканини щурів.

У цій роботі з використанням методу гістоморфометрії ми оцінили швидкість перебудови імплантата зі заміщенням кістковою та сполучною тканинами. Визначено, що після застосування для пластики дефектів кістки критичного розміру композитних 3D-I із PLA та ТКФ самостійно або в комбінації з аlogenними культивованими МСК відбувається зменшення відносної площі 3D-I з плином часу (що свідчить про їхню перебудову) з утворенням сполучної та кісткової тканин у різних співвідношеннях. У дослідних і контрольній групах упродовж експерименту встановлено зменшення відносної площі сполучної тканини та 3D-I, збільшення — кісткової. Проте на

15-ту добу після імплантації в ділянці дефекту груп Дослід I (введення МСК разом із 3D-I) та Дослід II (введення МСК через 7 діб після встановлення 3D-I) відносна площа сполучної тканини була суттєво збільшеною порівняно з Контролем, а в групі Дослід I — й на 30-ту добу. До того ж, у цій самій групі (3D-I, насичений МСК) зафіксовано уповільнення кісткоутворення, що відображує менша у 2,2 рази ( $p < 0,001$ ) відносна площа кісткової тканини на 30-ту добу порівняно з використанням 3D-I самостійно. Несприятливі умови та сповільнення загоєння дефекту кістковою тканиною створює розвиток вираженого запалення зі значущим збільшенням вмісту в сироватці крові щурів групи Дослід I глікопротеїнів, інтерлейкіну-6 і загального білка, про який ми повідомили раніше [21]. У свою чергу, така відповідь організму може бути пов'язана з дією аlogenних МСК на функціонування T- та B-лімфоцитів [31]; локальною відповіддю на їхнє введення терміново після гострої травми з вивільненням організмом реципієнта таких цитокінів, як трансформувальний фактор росту  $\beta$ , простагландин E2 та індолеамін-2,3-діоксигеназа 1 [32]; а також синтезом МСК білка SDF-1 (*stromal cell-derived factor*), який впливає на неоангіогенез [33]. Не відомо, як комбінація цих біологічних чинників впливатиме на регенераторні процеси: можна очікувати стимуляцію й остеогенезу, й утворення сполучної тканини (пухкої чи щільної). Зважаючи на отримані нами результати й інформацію інших авторів про надлишкове утворення сполучної тканини на 15 та 30-ту доби в метафізарних дефектах стегнових кісток щурів, заповнених кістковими алоімплантатами в поєднанні з аlogenними МСК [21], вважаємо не виправданим одночасне введення в ділянку дефекту імплантата, виготовленого за технологією 3D-друку із PLA та ТКФ, з аlogenними МСК у випадках свіжих травматичних ушкоджень кісток.

Відтерміноване (через 7 діб після встановлення 3D-I на основі PLA та ТКФ) ін'єкційне введення аlogenних МСК привело до скорішого утворення кісткової тканини в ділянці дефекту на 30-ту добу порівняно з введенням МСК під час імплантації та з контролем, що підтверджують більші показники її відносної площі в 3,3 та 1,5 рази ( $p < 0,001$ ) відповідно.

### Висновки

Установлено зменшення з плином часу відносної площі усіх досліджених композитних імплантів, виготовлених за технологією 3D-друку

з PLA та ТКФ (самостійно або в комбінації з МСК), з утворенням сполучної та кісткової тканини після їхнього встановлення в метафізарних дефектах стегнових кісток щурів.

Використання 3D-І, насиченого культивованими аlogenними МСК перед імплантацією, призводить до утворення більших обсягів сполучної тканини на 15-ту та 30-ту доби після операції в 1,9 і 1,6 разу ( $p < 0,001$ ) відповідно й уповільнення кісткоутворення, що відображує менша у 2,2 разу ( $p < 0,001$ ) відносна площа кісткової тканини на 30-ту добу порівняно з групою Контроль (3D-І самостійно).

Введення МСК через 7 діб після встановлення 3D-І в ділянку дефекту сприяло утворенню більшого обсягу кісткової тканини на 30-ту добу після операції в 1,5 разу ( $p < 0,001$ ) порівняно з Контролем (3D-І самостійно) та в 3,3 разу ( $p < 0,001$ ) порівняно з групою Дослід І (3D-І одночасно з МСК).

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

## Список літератури

- Kazmirchuk, A., Yarmoliuk, Y., Lurin, I., Gybalo, R., Burianov, O., Derkach, S., & Karpenko, K. (2022). Ukraine's Experience with Management of Combat Casualties Using NATO's Four-Tier "Changing as Needed" Healthcare System. *World Journal of Surgery*, 46(12), 2858–2862. <https://doi.org/10.1007/s00268-022-06718-3>
- 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>
- Baldwin, P., Li, D. J., Auston, D. A., Mir, H. S., Yoon, R. S., & Koval, K. J. (2019). Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *Journal of orthopaedic trauma*, 33(4), 203–213. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420>
- Kobbe, P., Laubach, M., Hutmacher, D. W., Alabulrahman, H., Sellei, R. M., & Hildebrand, F. (2020). Convergence of scaffold-guided bone regeneration and RIA bone grafting for the treatment of a critical-sized bone defect of the femoral shaft. *European journal of medical research*, 25(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s40001-020-00471-w>
- Brunello, G., Panda, S., Schiavon, L., Sivoletta, S., Biasetto, L., & Del Fabbro, M. (2020). The Impact of Bioceramic Scaffolds on Bone Regeneration in Preclinical In Vivo Studies: A Systematic Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(7), 1500. <https://doi.org/10.3390/ma13071500>
- Morris, M. T., Tarpada, S. P., & Cho, W. (2018). Bone graft materials for posterolateral fusion made simple: a systematic review. *European spine journal*, 27(8), 1856–1867. <https://doi.org/10.1007/s00586-018-5511-6>
- Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F., & Perale, G. (2019). Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *Journal of clinical periodontology*, 46 Suppl 21, 92–102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>
- Stark, J. R., Hsieh, J., & Waller, D. (2019). Bone graft substitutes in single- or double-level anterior cervical discectomy and fusion: A Systematic Review. *Spine*, 44(10), E618–E628. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000002925>
- Chen Y., Lin J., & Yu, X. (2020). Role of mesenchymal stem cells in bone fracture repair and regeneration. Chapter 7. In Ahmed H. K. El-Hashash (Eds.) *Mesenchymal Stem Cells in Human Health and Diseases* (pp. 127 – 143). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819713-4.00007-4>
- Zhou, B. O., Yue, R., Murphy, M. M., Peyer, J. G., & Morrison, S. J. (2014). Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell stem cell*, 15(2), 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.008>
- Lin, H., Sohn, J., Shen, H., Langhans, M. T., & Tuan, R. S. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials*, 203, 96–110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.026>
- Science and society. Experts warn against bans on 3D printing. (2013). *Science (New York, N.Y.)*, 342(6157), 439.
- Brachet, A., Belžek, A., Furtak, D., Geworgjan, Z., Tulej, D., Kulczycka, K., Karpiński, R., Maciejewski, M., & Baj, J. (2023). Application of 3D Printing in Bone Grafts. *Cells*, 12(6), 859. <https://doi.org/10.3390/cells12060859>
- Chen, H., Han, Q., Wang, C., Liu, Y., Chen, B., & Wang, J. (2020). Porous Scaffold Design for Additive Manufacturing in Orthopedics: A Review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 609. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00609>
- Dall'Ava, L., Hothi, H., Henckel, J., Di Laura, A., Tirabosco, R., Eskelinen, A., Skinner, J., & Hart, A. (2021). Osseointegration of retrieved 3D-printed, off-the-shelf acetabular implants. *Bone & joint research*, 10(7), 388–400. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.107.BJR-2020-0462.R1>
- Habibovic, P., Gbureck, U., Doillon, C. J., Bassett, D. C., van Blitterswijk, C. A., & Barralet, J. E. (2008). Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials*, 29(7), 944–953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.023>
- Makarov, V., Dedukh, N., & Nikolchenko, O. (2021). Osteointegration of polylactide-based implants. *Trauma*, 22 (3), 58–62. <https://doi.org/10.22141/1608-1706.3.22.2021.236325>
- Hamad, K., Kaseem, M., Yang, H. W., Deri, F., & Ko, Y. G. (2015). Properties and medical applications of polylactic acid: A review. *Express Polymer Letters*, 9(5), 435–55. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2015.42
- European Convention for the protection of vertebrate animals used for research and other scientific purposes. Strasbourg, 18 March 1986: official translation. Verkhovna Rada of Ukraine. (In Ukrainian). URL: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137\\_21](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137_21)
- On protection of animals from cruel treatment: Law of Ukraine №3447-IV of February 21, 2006. The Verkhovna Rada of Ukraine. (In Ukrainian). URL: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>
- Ashukina, N. O., Vorontsov, P. M., Maltseva, V. Ye., Danyshchuk, Z. M., Nikolchenko, O. A., Samoylova, K. M., & Husak V. S. (2022). Morphology of the repair of critical size bone defects which filling allogeneic bone implants in combination with mesenchymal stem cells depending on the recipient age in the experiment. *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics*, (3–4), 80–90. <http://dx.doi.org/10.15674/0030-598720223-480-90>
- Gontar, N. M. (2023) Changes in markers of bone tissue remodeling and the inflammatory process in the blood serum of white rats in case of defect filling of the femur with implants based on polylactide and tricalciumphosphate with mesenchymal stem cells. *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics* (2), 33–42. <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872023233-42>
- Walters, S. J., Campbell, M. J., & Machin, D. (2021). Medical

- Statistics: A Textbook for the Health Sciences (5<sup>th</sup> Eds). Wiley-Blackwellm
24. 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>
  25. 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  $\beta$ -tricalcium phosphate/poly-lactic-co-glycolic acid ( $\beta$ -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>
  26. Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3640–3659. <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
  27. Xu, Z., Wang, N., Liu, P., Sun, Y., Wang, Y., Fei, F., Zhang, S., Zheng, J., & Han, B. (2019). Poly(Dopamine) Coating on 3D-Printed Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23), 4397. <https://doi.org/10.3390/molecules24234397>
  28. Zyman, Z. Z. (2018). Calcium-phosphate biomaterials. Textbook, Kharkiv. (in Ukrainian)
  29. Bohner, M., Santoni, B. L. G., & Döbelin, N. (2020).  $\beta$ -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta biomaterialia*, 113, 23–41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.022>
  30. Mende, W., Götzl, R., Kubo, Y., Pufe, T., Ruhl, T., & Beier, J. P. (2021). The role of adipose stem cells in bone regeneration and bone tissue engineering. *Cells*, 10(5), 975. <https://doi.org/10.3390/cells10050975>
  31. Chatterjea, A., LaPointe, V. L., Alblas, J., Chatterjea, S., van Blitterswijk, C. A., & de Boer, J. (2014). Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(1), 134–142. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12172>
  32. Grayson, W. L., Bunnell, B. A., Martin, E., Frazier, T., Hung, B. P., & Gimble, J. M. (2015). Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature reviews. Endocrinology*, 11(3), 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.234>
  33. Wang, X., Jiang, H., Guo, L., Wang, S., Cheng, W., Wan, L., Zhang, Z., Xing, L., Zhou, Q., Yang, X., Han, H., Chen, X., & Wu, X. (2021). SDF-1 secreted by mesenchymal stem cells promotes the migration of endothelial progenitor cells via CXCR4/PI3K/AKT pathway. *Journal of molecular histology*, 52(6), 1155–1164. <https://doi.org/10.1007/s10735-021-10008-y>

Стаття надійшла до редакції 29.07.2023

## HISTOLOGICAL STRUCTURE OF THE RAT FEMURS AFTER FILLING OF DEFECTS IN THE DISTAL METAPHYSIS WITH 3D-PRINTED IMPLANTS BASED ON POLYLACTIDE AND TRICALCIUM PHOSPHATE IN COMBINATION WITH MESENCHYMAL STROMAL CELLS

N. O. Ashukina<sup>1</sup>, N. M. Gontar<sup>2</sup>, Z. M. Danyshchuk<sup>1</sup>, O. A. Nikolchenko<sup>1</sup>, Ya. D. Kaliyuzhna<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

<sup>2</sup> National Medical University, Kharkiv. Ukraine

✉ Nataliya Ashukina, PhD in Biol. Sci.: natalya.ashukina@gmail.com

✉ Nazar Gontar, MD: gontarnazar@ukr.net

✉ Zinaida Danyshchuk, MD: zinada1962@gmail.com

✉ Olga Nikolchenko, PhD in Biol. Sci.: o\_nicolchenko@ukr.net

✉ Yaryna Kaliyuzhna: kalyuzhna888@gmail.com