

УДК 616.718.4-089.844-092.9:[577.1:599.323.4]](045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872024357-64>

Біохімічні показники крові щурів різного віку після заповнення метафізарного дефекту стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами за локального введення плазми крові, збагаченої тромбоцитами

П. М. Воронцов, Ф. С. Леонтьєва, В. О. Туляков

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», Харків

A promising method of regenerative medicine is the saturation of allografts with platelet-rich plasma (PRP). Objective. To evaluate the course of metabolic processes after filling a hole defect in the distal metaphysis of the femur with allogeneic bone implants in conditions of additional local administration of allogeneic PRP. Methods. In the model of a hole defect in white rats with the filling of the defect with an allograft, as well as with additional local stimulation of PRP on the 7th day; on the 3rd and 7th days and on the 1st, 3rd and 7th days in blood serum, the content of glycoproteins (GP), chondroitin sulfates (CST), total protein (TP), calcium (Ca), activity alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (AcP). The results. 14 day. In the 3-month rats, under one stimulation, an increase in TP and Ca, a decrease in AcP was observed, with two stimulations there was a 1.11 times smaller GP, 1.13 times larger TP and 1.43 times Ca compared to those in rats without stimulation. During three stimulations, the GP was 1.24 times lower than that in animals without stimulation. In the 12-month rats in comparison with the data of rats without stimulation, 1.15 times higher GP, Ca, ALP activity, and 1.44 times more AcP were noted. 28 days of the 3-month rats for one injection exceeded the data of animals without stimulation by 1.34 times for GP, and were inferior to them by 1.31 times for AcP. In the 12-month rats, compared to these animals without stimulation, with three injections, a 1.19 times greater TP was noted. 90 d. In the 3-month rats for one injection showed 1.24 times less CST with 1.28 times lower ALP compared to data from rats without stimulation. 12-month rats exceeded the data of the group without stimulation by 1.43 times for ALP. Conclusions. In rats with an alloimplant (especially at 12 months), an increase in connective tissue formation markers and a decrease in LF activity were observed. Filling the defect with an alloimplant led to an increase in inflammation indicators and an increase in markers of bone tissue formation. Keywords. Bone tissue, defect, allograft, regeneration, biochemistry.

Перспективним методом регенеративної медицини є насичення алотрансплантатів плазмою, збагаченою тромбоцитами (PRP). Мета. Оцінити перебіг метаболічних процесів після заповнення дірчастого дефекту в дистальному метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами в умовах додаткового локального введення алогенної PRP. Методи. На моделі дірчастого дефекту в тварин із його заповненням алоімплантатом, а також із додатковою локальною стимуляцією PRP на 7-му; 3-тю та 7-му; 1-шу, 3-тю та 7-му добу в сироватці крові досліджено вміст глікопротеїнів (ГП), хондроїтинсульфатів (ХСТ), загального білка (ЗБ), кальцію (Са), активність лужної фосфатази (ЛФ) та кислій фосфатази (КФ). Результати. На 14-ту добу після відтворення дефекту в 3-міс. щурів виявили, що в разі однієї стимуляції відбулося збільшення ЗБ та Са, зниження КФ, за двох — зменшення в 1,11 разу ГП, зростання в 1,13 разу ЗБ та в 1,43 разу Са у порівнянні зі щурами без стимуляції. За умов трьох стимуляцій вміст ГП зафіксовано в 1,24 разу менше ніж у тварин без неї. У 12-міс. щурів відзначено більший у 1,15 разу вміст ГП, Са, активність ЛФ, та в 1,44 разу КФ. На 28-му добу в 3-міс. щурів за умови однієї ін'єкції маркери ГП перевищували показники тварин без стимулювання у 1,34 разу, та поступались у 1,31 разу за КФ. Дані 12-міс. щурів із трьома ін'єкціями порівняно зі значеннями тварин без стимуляції показали збільшення ЗБ у 1,19 разу. На 90-ту добу в 3-міс. щурів із однією ін'єкцією виявлено зменшення в 1,24 разу ХСТ за нижчої в 1,28 разу ЛФ порівняно з показниками щурів без стимуляції, у 12-міс. щурів перевищення складо 1,43 разу за ЛФ на відміну від інтактних тварин. Висновки. У щурів із алоімплантатом (особливо у 12-міс.) спостерігалось збільшення маркерів формування сполучної тканини та зменшення активності ЛФ. Заповнення дефекту алоімплантатом призводило до підвищення показників запалення та збільшення маркерів формування кісткової тканини.

Ключові слова. Кісткова тканина, дефект, алоімплантат, терапія плазмою, збагаченою тромбоцитами, регенерація, біохімія

Вступ

Терапія плазмою, збагаченою тромбоцитами (PRP) — це метод регенеративної медицини, який лише нещодавно зацікавив лікарів і науковців через свій потенціал — покращення загоєння та регенерації тканин [1]. PRP отримують із крові пацієнта, вона містить значну кількість тромбоцитів, факторів росту та біологічно активних білків. Перші відіграють важливу роль у фізіологічних процесах загоєння, і PRP-терапія сприяє прискоренню та відновленню ушкоджених тканин [2]. Цей метод є потенційно здатним стимулювати регенерацію кісток [3]. Продемонстровано статистично значущу ефективність PRP, зокрема, під час використання для лікування переломів нижніх кінцівок [4]. Рандомізоване клінічне дослідження з подвійним контролем виявило значне прискорення повного загоєння довгих кісток під час лікування PRP із показником 81,1 % порівняно з 55,3 % у групі плацебо [5]. Швидке зрощення переломів має вирішальне значення для мінімізації термінів лікування, зменшення негативних проявів, включаючи хронічний біль, порушення рухливості та розвиток вторинних ускладнень, що важливо для оптимізації результатів [6].

Окрім впливу на загоєння кісток, PRP демонструє значну ефективність у покращенні відновлення м'яких тканин, що є ключовим аспектом у лікуванні складних переломів [7]. У дослідженні V. Seshan та співавт. (2021) визначено, що PRP сприяла повному закриттю або загоєнню ран із діабетичними виразками нижніх кінцівок, скоротила час повного закриття ран і зменшила ділянку та глибину рани [8].

PRP — це цінний терапевтичний інструмент загоєння, якому властиві протизапальні якості. Модулюючи імунну відповідь, ефективно пом'якшується запальний каскад, зазвичай пов'язаний із ушкодженням тканин зі складними переломами [9].

Ця терапія може бути інтегрована з традиційними методиками для прискорення загоєння. Її перевагами є безпечність і природність лікування, а також можливість використання окремо або в поєднанні з іншими методами [1].

Наразі потрібні подальші дослідження для всебічного розуміння ефективності та безпеки PRP у більш широкому спектрі лікування переломів [10, 11].

Мета: на основі аналізу біохімічних показників сполучної тканини в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг метабо-

лічних процесів після заповнення дірчастого дефекту критичного розміру в дистальному метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами в умовах додаткового локального введення алогенної плазми крові, збагаченої тромбоцитами.

Матеріал і методи

Дослідження проведено в атестованому відділенні трансплантології, лабораторії експериментального моделювання з експериментально-біологічною клінікою, відділі лабораторної діагностики та імунології.

Роботи виконано з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин [12–14] після ухвалення плану комітетом із біоетики при ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (протокол № 191 від 22.04.2019).

В експерименті здійснено порівняльне дослідження метаболічних особливостей регенерації дірчастого дефекту критичного розміру в дистальному метафізі стегнової кістки лабораторних щурів під час заповнення алогенним кістковим імплантатом в умовах додаткової стимуляції загоєння локальним введенням PRP та без неї. Одночасно було задіяно 160 білих щурів-самців, із них 80 — 3-місячного віку масою (195 ± 21) г і 80 — 12-місячного віку (385 ± 31) г, яких рандомно розподілили на 10 груп:

I — 15 особин 3-місячного віку, дефект у метафізі стегнової кістки заповнений кістковим алоімплантатом без додаткової локальної стимуляції;

II — 15 тварин 12-місячного віку, дефект у метафізі стегнової кістки заповнений кістковим алоімплантатом без додаткової локальної стимуляції;

III — 15 щурів 3-місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки та заповнення його кістковим алоімплантатом, додаткова стимуляція одноразовим локальним введенням PRP на 7-му добу експерименту;

IV — 15 особин 12-місячного віку, дефект у метафізі стегнової кістки заповнений кістковим алоімплантатом, додаткова стимуляція одноразовим локальним введенням PRP на 7-му добу експерименту;

V — 15 щурів 3-місячного віку, дефект у метафізі стегнової кістки заповнений кістковим алоімплантатом, додаткова стимуляція дворазовим локальним введенням PRP на 3-тю та 7-му добу експерименту;

VI — 15 тварин 12-місячного віку, дефект у метафізі стегнової кістки заповнений кістковим

алоімплантатом, додаткова стимуляція дворазовим локальним введенням PRP на 3-тю та 7-му добу експерименту;

VII — 15 особин 3-місячного віку, дефект у метафізі стегнової кістки заповнений кістковим алоімплантатом, додаткова стимуляція триразовим локальним введенням PRP на 1-шу, 3-тю та 7-му добу експерименту;

VIII — 15 щурів 12-місячного віку, дефект у метафізі стегнової кістки заповнений кістковим алоімплантатом, додаткова стимуляція триразовим локальним введенням PRP на 1-шу, 3-тю та 7-му добу експерименту;

IX — 20 тварин 3-місячного віку, отримання плазми крові, збагаченої тромбоцитами й алоімплантатів;

X — 20 особин 12-місячного віку, отримання плазми крові, збагаченої тромбоцитами й алоімплантатів.

Через 14, 28 і 90 діб після операції відповідно виводили з експерименту по 5 тварин з груп I–VIII. Щурів груп IX та X виводили з досліду в день створення дефекту, на 3-тю та 7-му добу експерименту для екстемпорального отримання PRP безпосередньо перед введенням її як локальну стимуляцію.

Хірургічні втручання виконані в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після депіляції на лівому коліні й оброблення антисептиком Бетадин® передньолатеральним доступом відкривали ділянку дистального метафізу стегнової кістки та стоматологічним бором діаметром 3 мм моделювали дірчастий дефект глибиною 3 мм (критичним розміром вважається мінімальна величина дефекту, що не загоюється самостійно протягом життя тварини чи впродовж експерименту). Для дистального метафізу стегнової кістки щурів мінімальний розмір критичного дефекту — діаметр і глибина 2,5 мм [15]. Циліндричні алоімплантати діаметром 3 мм, довжиною 3 мм розміщували в ділянці дефекту щурів груп I — VIII. Після місцевої обробки антибіотиком пошарово зашивали м'язи та шкірну рану, площину хірургічного втручання обробляли антисептиком.

У щурів груп X–IX порожнистим свердлом із внутрішнім діаметром 3 мм виділяли алоімплантати довжиною 3,0 мм, пакували в поліетиленову упаковку, стерилізували радіацією на апараті «Прискорювач ЛУ–10» (НДК «Прискорювач» ННЦ ХФТІ).

Отримання плазми крові, збагаченої тромбоцитами. Для виконання методики виконали забір крові у щурів 3-х та 12-місячного віку по 20 особин у кожній групі. За цих обставин тварин виводили з експерименту, виконували забір 8 мл венозної крові у вакуумну пробірку на 8,5 мл із антикоагулянтом. Пробірку центрифугували у лабораторній клінічній центрифугі ОПн-3.02 1500 об/хв протягом 10 хв (перший етап), потім з неї стерильною піпеткою відбирали плазму (надосадову фракцію), яка складала приблизно $\frac{1}{2}$ первинного обсягу, переміщували до градуйованої стерильної пробірки, відбирали проби для аналізу факторів росту після першого центрифугування та потім знов центрифугували 3000 об/хв протягом 10 хв (другий етап). Далі піпеткою відбирали PRP (поверхневу фракцію), яка становила приблизно $\frac{1}{2}$ обсягу первинної плазми, в якій проводили визначення факторів росту, а залишену на дні пробірки бідну тромбоцитами плазму утилізували.

Під час виведення з експерименту тварин груп I–VI у них забирали кров, яку після природного зсідання звільнювали від формених елементів центрифугуванням 15 хв за 3000 об/хв. Надосадову рідину відокремлювали і в ній вимірювали наведені показники.

Біохімічні дослідження. Відбір параметрів біохімічного аналізу проводили таким чином, щоб вивчити дані запалення та метаболізму кісткової та сполучної тканин, а також загального соматичного стану експериментальних тварин:

– вміст глікопротеїнів (ГП) за модифікованим методом О. П. Штенберга та Я. Н. Доценка [16];

– вміст хондроїтинсульфатів (ХСТ) за методом Nemeth–Csoka у модифікації Л. І. Слуцького [17];

– активність лужної фосфатази (ЛФ) та кислій фосфатази (КФ) кінетичними методами згідно з інструкцією «Лужна фосфатаза — кін. Сп. Л» та «Кисла фосфатаза — кін. Сп. К»;

– вміст загального кальцію (Ca) потенціометричним методом із використанням аналізатора електролітів АСК-01;

– вміст загального білка (ЗБ) біуретовим методом [16].

Вимірювання колориметричних показників виконано на електрофотоколориметрі «КФК-3» та біохімічним аналізаторі «GBG STAT FAX 1904 Plus».

Статистична обробка результатів. Аналіз даних виконано з використанням програм «IBM SPSS Statistics 20» та «Microsoft Office Excel 2007». Результати вимірювань наведені як медіана та квартилі (Me; 25 %; 75 %). Порівняння двох груп здійснювали

за допомогою аналізу Манна-Уїтні. Різницю вважали статистично значущою за умови якщо $p < 0,05$ [18].

Результати

14-та доба після відтворення дефекту

У щурів 3-місячного віку в умовах однієї локальної ін'єкції PRP спостерігали активацію метаболічних процесів. Водночас вміст ГП наближався до рівня у тварин із імплантацією алокістки без стимуляції (табл.). Вміст ЗБ та Са перевищував значення показників групи порівняння в 1,30 разу ($p < 0,01$) та 1,15 разу ($p < 0,01$) відповідно. Зафіксовано зниження активності КФ удвічі в порівнянні з даними тварин без додаткового стимулювання.

Після дворазового введення PRP у 3-місячних щурів також був меншим в 1,11 разу рівень ГП ($p < 0,01$) ніж у тварин без стимуляції. Спостерігалися більші значення за рівнем ЗБ в 1,13 разу ($p < 0,01$) та Са у 1,43 разу ($p < 0,01$). За триразового локального введення PRP спостерігався вміст ГП, у 1,24 разу менший за такий у групи тварин без стимуляції ($p < 0,01$) (табл.).

У 12-місячних щурів за одноразового стимулювання в порівнянні з даними більш молодих тварин відзначено менший в 1,22 разу рівень ГП ($p < 0,01$), у 1,21 разу активності ЛФ ($p < 0,01$) та в 1,20 разу КФ ($p < 0,01$), а також у 1,34 більший вміст ХСТ ($p < 0,01$).

Після дворазової стимуляції зафіксовано в 1,10 разу менший вміст ГП ($p < 0,01$), у 1,14 разу ЗБ ($p < 0,01$) та у 1,22 разу — активності ЛФ ($p < 0,01$), ніж у 3-місячних тварин. У порівнянні з показниками щурів із алоімплантатом без стимуляції, відзначено більший у 1,15 разу вміст ГП ($p < 0,01$), Са ($p < 0,01$), активності ЛФ ($p < 0,01$), та в 1,44 разу — КФ ($p < 0,01$). Після триразової стимуляції 12-місячні щури поступалися 3-місячним за рівнем ХСТ у 1,27 разу ($p < 0,008$), активності ЛФ в 1,47 разу ($p < 0,01$).

28-ма доба після відтворення дефекту

3-місячні щури після одноразової стимуляції перевищували тварин без стимулювання за рівнем ГП у 1,34 разу ($p < 0,05$), та поступались останнім у 1,31 разу за активністю КФ ($p < 0,01$) (табл.). У порівнянні до даних на 14-ту добу виявлено підвищення в 1,74 разу активності КФ ($p < 0,01$) (табл.).

У 12-місячних щурів із одноразовою стимуляцією мала місце менша в 1,50 разу активність ЛФ ($p < 0,01$) відносно 3-місячних тварин і у 1,21 разу, ніж така на 14-ту добу ($p < 0,01$) (табл.).

За дворазової локальної стимуляції PRP 12-місячні щури з алоімплантатом без насичення стимуляторами показали відсутність статис-

тичної значущості розбіжностей із даними груп порівняння.

За умов триразової стимуляції зафіксовано перевищення у 1,27 разу ($p < 0,01$) за рівнем ГП у щурів 3-місячного віку (табл.). У порівнянні до показників тварин без стимуляції відзначено в 1,19 разу більший рівень ЗБ ($p < 0,01$), на 14-ту добу виявлено перевищення рівня ГП у 1,54 разу ($p < 0,01$), ЗБ — у 1,14 разу ($p < 0,01$), Са — у 1,19 разу ($p < 0,01$), ХСТ — у 1,37 разу ($p < 0,01$) (табл.).

90-та доба після відтворення дефекту

У 3-місячних щурів за одноразової стимуляції зафіксовано в 1,24 разу менше ХСТ за в 1,28 разу нижчої активності ЛФ ($p < 0,01$) у порівнянні із даними тварин без додаткового стимулювання (табл.). Зпівставлення з показниками щурів на 28-му добу показало в 1,26 разу меншу активність ЛФ ($p < 0,01$), і в 1,56 разу — КФ ($p < 0,01$).

Під час дворазової стимуляції виявлено менший у 1,31 разу вміст ХСТ ($p < 0,01$), та в 1,46 разу нижчу активність ЛФ ($p < 0,01$) ніж на 14-ту добу. Порівняння із даними на 28-му добу дослідю показало зниження в 1,26 разу активності ЛФ та в 1,56 разу КФ ($p < 0,01$) (табл.).

За умов триразової стимуляції відносно показників на 14-ту добу спостерігалася більша у 1,15 разу концентрація ГП ($p < 0,01$), в 1,16 разу — ЗБ ($p < 0,01$), в 1,07 разу — Са ($p < 0,01$), в 1,76 разу — активності ЛФ ($p < 0,01$) за в 1,55 разу нижчої КФ ($p < 0,01$). У порівнянні із даними на 28 добу зафіксовано зменшення в 1,47 разу за активністю КФ ($p < 0,01$).

12-місячні щури. В умовах одноразової стимуляції спостерігалася менша у 1,23 разу концентрація ГП ($p < 0,01$) та нижча в 1,65 разу активність ЛФ ($p < 0,01$) відносно даних у 3-місячних щурів. На 14-ту добу показано збільшення в 1,13 разу концентрації ЗБ ($p < 0,01$), в 1,08 разу Са ($p < 0,01$) на фоні зменшення в 1,37 разу активності ЛФ ($p < 0,01$). В умовах одноразової стимуляції у порівнянні із показниками на 28-му добу виявлено збільшення у 1,15 разу ГП ($p < 0,01$), в 1,16 разу — ЗБ ($p < 0,01$), в 1,07 разу — Са ($p < 0,01$) та у 1,33 разу активності ЛФ ($p < 0,01$).

За дворазової стимуляції визначено більший у 1,29 разу рівень ХСТ у порівнянні із таким у 3-місячних щурів ($p < 0,01$). Аналіз даних групи без стимуляції виявив зростання у 1,43 разу активності ЛФ ($p < 0,01$). На 14-ту добу визначено перевищення в 1,15 разу рівня ЗБ ($p < 0,01$), за зниження концентрації ХСТ у 1,24 разу ($p < 0,01$), активності ЛФ у 1,62 разу ($p < 0,01$).

Таблиця

Біохімічні показники сироватки крові білих щурів різного віку після заповнення дефекту критичного розміру в метафізі стегнової кістки алогенним кістковим імплантатом, зокрема в умовах локального стимулювання загоєння дефекту введенням плазми крові, збагаченої тромбоцитами (Me, 25 %; 75 %)

Показник, одиниця вимірювання	Без додаткової стимуляції		1 ін'єкція плазми крові, збагаченої тромбоцитами		2 ін'єкції плазми крові, збагаченої тромбоцитами		3 ін'єкції плазми крові, збагаченої тромбоцитами	
	3-місячні щури, n = 5	12-місячні щури, n = 5	3-місячні щури, n = 5	12-місячні щури, n = 5	3-місячні щури, n = 5	12-місячні щури, n = 5	3-місячні щури, n = 5	12-місячні щури, n = 5
1	2	3	4	5	6	7	8	9
14-та доба								
глікопротеїни, г/л	0,92; 0,88; 0,97	0,81; 0,78; 0,84 p ₁ < 0,01	0,92; 0,83; 0,96 p ₂ > 0,05	0,73; 0,70; 0,78 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05	0,82; 0,72; 0,89 p ₂ < 0,01	0,76; 0,62; 0,86 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	0,74; 0,63; 0,89 p ₂ > 0,05	0,65; 0,56; 0,79 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05
загальний білок, г/л	56,7; 54,9; 63,4	65,7; 60,4; 67,3 p ₁ > 0,05	73,8; 69,2; 79,7 p ₂ < 0,01	71,2; 63,9; 76,8 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	77,1; 71,6; 80,0 p ₂ < 0,01	62,1; 56,7; 69,6 p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05	65,7; 60,4; 69,4 p ₂ > 0,05	65,5; 61,0; 73,0 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05
Са, ммоль/л	2,02; 2,01; 2,23	2,30; 2,15; 2,35 p ₁ > 0,05	2,38; 2,23; 2,60 p ₂ < 0,05	2,25; 2,14; 2,42 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	2,44; 2,30; 2,56 p ₂ < 0,01	2,31; 2,16; 2,48 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	2,29; 2,12; 2,44 p ₂ > 0,05	2,14; 2,02; 2,25 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05
хондроїтин-сульфати, г/л	0,300; 0,286; 0,350	0,384; 0,374; 0,399 p ₁ < 0,01	0,259; 0,227; 0,288 p ₂ > 0,05	0,347; 0,328; 0,361 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05	0,287; 0,254; 0,315 p ₂ > 0,05	0,353; 0,331; 0,386 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05	0,285; 0,222; 0,326 p ₂ > 0,05	0,362; 0,331; 0,388 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05
активність лужної фосфатази, Од/л	343,0; 296,0; 408,0	295,0; 276,0; 416,0 p ₁ < 0,05	429,0; 389,0; 443,5 p ₂ < 0,01	366,5; 345,0; 385,0 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05	485,0; 435,5; 520,0 p ₂ > 0,05	356,8; 331,0; 378,9 p ₁ < 0,01 p ₂ < 0,01	449,0; 390,0; 529,0 p ₂ > 0,05	301,6; 268,4; 362,0 p ₁ < 0,01 p ₂ < 0,01
активність кислої фосфатази, Од/л	35,5; 32,1; 37,2	28,5; 23,9; 33,0 p ₁ > 0,05	18,8; 15,8; 22,9 p ₂ < 0,01	19,2; 16,0; 25,1 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	28,4; 24,8; 33,4 p ₂ > 0,05	26,5; 22,8; 31,3 p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,05	33,3; 30,5; 35,7 p ₂ > 0,05	28,6; 23,6; 33,0 p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,01
28-ма доба								
глікопротеїни, г/л	0,67; 0,64; 0,71 p ₃ < 0,01	0,95; 0,87; 1,07 p ₁ < 0,01 p ₃ < 0,018	0,75; 0,68; 0,82 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,01	0,83; 0,75; 0,90 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	0,73; 0,65; 0,79 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	0,81; 0,72; 0,91 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	0,77; 0,71; 0,83 p ₂ < 0,01 p ₃ > 0,05	0,98; 0,91; 1,08 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05 p ₃ < 0,01
загальний білок, г/л	64,1; 61,0; 70,1 p ₃ > 0,05	68,4; 60,8; 70,4 p ₁ > 0,05 p ₃ > 0,05	71,4; 65,5; 76,4 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	67,6; 61,2; 73,0 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	63,2; 56,9; 68,8 p ₂ > 0,05 p ₃ < 0,01	68,4; 61,3; 75,0 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	73,4; 68,2; 79,1 p ₂ < 0,01 p ₃ < 0,01	74,6; 71,2; 81,2 p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,01 p ₃ < 0,01
Са, ммоль/л	2,27; 2,18; 2,36 p ₃ < 0,05	2,37; 2,16; 2,38 p ₁ > 0,05 p ₃ < 0,05	2,37; 2,37; 2,38 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	2,29; 2,14; 2,35 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	2,25; 2,21; 2,31 p ₂ > 0,05 p ₃ < 0,01	2,31; 2,30; 2,37 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	2,39; 2,38; 2,41 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,01	2,40; 2,36; 2,41 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ < 0,01
хондроїтин-сульфати, г/л	0,253; 0,218; 0,304 p ₃ < 0,01	0,274; 0,241; 0,305 p ₁ > 0,05 p ₃ < 0,01	0,274; 0,254; 0,290 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	0,315; 0,296; 0,331 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	0,265; 0,230; 0,290 p ₂ > 0,05 p ₃ < 0,05	0,325; 0,285; 0,344 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	0,272; 0,250; 0,290 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	0,350; 0,335; 0,373 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ < 0,01
активність лужної фосфатази, Од/л	348,0; 339,5; 426,0 p ₃ > 0,05	302,0; 269,0; 344,5 p ₁ < 0,05 p ₃ > 0,05	438,0; 391,0; 467,5 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	301,6; 255,9; 331,8 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05 p ₃ < 0,01	418,0; 341,0; 460,5 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	314,6; 286,4; 350,0 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	416,0; 394,5; 471,0 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	325,0; 291,6; 343,5 p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9
активність кислої фосфатази, Од/л	26,8; 23,9; 30,7 $p_3 < 0,05$	22,8; 19,1; 25,4 $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	32,7; 29,2; 36,0 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	26,4; 22,1; 31,2 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$	34,9; 28,5; 39,9 $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	25,0; 20,2; 29,3 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	31,5; 27,3; 35,9 $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	24,6; 20,3; 29,6 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,690$
90-та доба								
глікопротеїни, г/л	0,80; 0,77; 0,85 $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	0,93; 0,86; 1,14 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	1,02; 0,96; 1,11 $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	0,83; 0,76; 0,89 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,79 0,77; 0,85 $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,91; 0,84; 0,96 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,85; 0,81; 0,90 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	0,83; 0,76; 0,89 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$
загальний білок, г/л	76,7; 69,9; 93,0 $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,05$	75,6; 68,8; 96,4 $p_1 > 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	87,7; 82,4; 93,9 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	81,0; 74,3; 86,8 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	67,8; 62,1; 75,2 $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	71,2; 66,5; 79,2 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	76,0; 71,6; 81,1 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	78,3; 72,6; 82,3 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$
Са, ммоль/л	2,41; 2,38; 2,55 $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	2,38; 2,33; 2,42 $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	2,58; 2,50; 2,64 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	2,44; 2,36; 2,50 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	2,35; 2,29; 2,40 $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	2,41; 2,35; 2,47 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	2,42; 2,33; 2,48 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	2,36; 2,28; 2,47 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$
хондроїтин- сульфати, г/л	0,255; 0,241; 0,288 $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,273; 0,267; 0,296 $p_1 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	0,330; 0,300; 0,360 $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	0,364; 0,331; 0,401 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,220; 0,180; 0,245 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	0,285; 0,250; 0,319 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	0,244; 0,223; 0,272 $p_2 < 0,01$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,305; 0,271; 0,332 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,05$
активність лужної фосфатази, Од/л	278,0; 244,5; 308,5 $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	245,0; 210,5; 292,5 $p_1 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	373,0; 324,0; 406,0 $p_2 < 0,01$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,01$	226,8; 202,0; 251,3 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	332,0; 291,5; 374,5 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	220,4; 194,3; 248,6 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	255,5; 219,2; 307,5 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	195,6; 176,0; 226,5 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$
активність кислої фосфатази, Од/л	26,5; 19,9; 35,6 $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	28,2; 21,8; 34,3 $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,85; 0,78; 0,92 $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,05$	1,03; 0,92; 1,20 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,70; 0,64; 0,77 $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,87; 0,81; 0,95 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$	0,85; 0,80; 0,92 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	0,96; 0,85; 1,04 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 > 0,05$

Примітки: p_1 — порівняння показників у щурів різного віку з однаковим типом заповнення дефекту на однаковий термін після втручання; p_2 — порівняння показників щурів одного віку на однаковий термін після втручання з групою з алоімплантатом без ін'єкцій плазми крові, збагаченої тромбоцитами; p_3 — порівняння показників груп лабораторних щурів на 90-ту добу з показниками груп тварин тих же умов лікування на 14-ту добу; p_4 — порівняння показників груп лабораторних щурів на 90-ту добу з показниками груп тварин тих же умов лікування на 28-му добу.

Порівняння показників 12-міс. щурів із триразовою стимуляцією з такими у 3-міс. тварин показало зростання в 1,25 разу вмісту ХСТ у ($p < 0,01$). Відносно даних на 14-ту добу зафіксовано більший вміст глікопротеїнів у 1,28 разу ($p < 0,01$) зі зниженням активності ЛФ у 1,54 разу ($p < 0,01$). На 28-му добу виявили менше ГП у 1,18 разу ($p < 0,01$), хондроїтинсульфатів — у 1,15 разу ($p < 0,01$), активності ЛФ — у 1,66 разу ($p < 0,01$).

Обговорення

Під час експерименту вивчали особливості перебігу репаративного процесу в лабораторних щурів із дірчастими дефектами метафіза стгенової кістки, які заповнювали алоімплантатами, супроводжуючи їхнє використання локальними ін'єкціями PRP на 7-му добу (одноразове введення); 3-тю і 7-му доби (дворазове введення); та 1-шу, 3-тю і 7-му доби (триразове введення).

Результати біохімічного дослідження сироватки крові білих щурів із заповненням транскоркових кісткових дефектів стегнової кістки критичного розміру алоімплантатом в умовах локального введення PRP, показали ефективність додаткової стимуляції, що відобразилося в збільшенні маркерів анаболізму та зменшенні показників катаболізму кісткової тканини. У той же час спостерігалися біохімічні ознаки помірного запалення, яке могло уповільнювати регенерацію кісткової тканини. Зазначене відповідає даним Y. Zhang та співавт. (2021), за якими загальний ефект PRP на лікування переломів кісток залишається дискусійним і обговорюється в наукових колах [3]. Зокрема, вважається, що введення PRP демонструє ефективність, особливо для лікування переломів кісток нижніх кінцівок [19]. Інші автори вказують, що використання PRP істотно не прискорювало загоєння закритих переломів довгих кісток [20].

У 3-міс. щурів за однієї ін'єкції PRP спостерігали активацію метаболічних процесів.

Кращу реакцію біохімічних показників на локальну стимуляцію PRP виявили в 3-місячних тварин, порівняно з 12-місячними. Введення PRP на 1-шу добу було малоефективним і викликало активацію запалення з уповільненням регенерації. На 3-тю добу не зафіксовано значних змін показників. За даними біохімічних досліджень можна припустити, що стимулюючий ефект здебільшого здійснювало введення PRP саме на 7-му добу.

Додаткова стимуляція локальним введенням PRP приводила до помірної активації загоєння кістки з формуванням кісткової тканини. Зазначене свідчить про прояви обмежених репаративних можливостей кісткової тканини в досліджених умовах, можливо унаслідок активного запалення.

У щурів із алоімплантатом виявили біохімічні ознаки помірної активності регенерації кісткової тканини лише на ранніх термінах експерименту, вони зменшувалися на 28-му добу і ще більше на 90-ту добу. Оскільки за умов додаткового локального введення PRP тваринам із алоімплантатом виразність біохімічних ознак регенерації кісткової тканини була лише трохи більше, ніж у тварин із імплантатом без додаткової локальної стимуляції, визначено, що доцільним було інтенсифікувати стимулювання ремоделювання алоімплантата у власну кісткову тканину шляхом насичення стимуляторами, наприклад, МСК або PRP. Зазначене узгоджується з результатами опублікованого нещодавно метааналізу (з участю 420 пацієнтів), у якому не підтверджено вищу швидкість віднов-

лення кістки за рентгенологічними дослідженнями в осіб, яким у дефект кісткової тканини одночасно з аутоімплантатом вводили PRP, порівняно з таким у групи, де було використано лише аутологічну кісткову пластику, проте, зафіксовано коротший в середньому на 1,35 міс. час загоєння перелому кістки [21].

Також необхідними є додаткові дослідження для всебічного розуміння ефективності PRP для лікування переломів [3, 22].

Висновки

На підставі результатів біохімічного дослідження сироватки крові експериментальних щурів 3-х і 12-місячного віку із дефектом критичного розміру в метафізі стегнової кістки зі заповненням його кістковими алоімплантатами за умов додаткового стимулювання загоєння локальним введенням плазми крові, збагаченої тромбоцитами, та без стимулювання, визначено: у тварин із алоімплантатом без додаткового стимулювання вже на ранні терміни експерименту збільшувалися маркери формування сполучної тканини (особливо в 12-міс. щурів), за умов зменшення активності в сироватці крові лужної фосфатази. Це може свідчити про уповільнення утворення кісткової тканини. Заповнення дефекту алоімплантатом без додаткової стимуляції призводило до підвищення біохімічних показників запалення, що може бути пов'язано з реакцією на імплантат, як на чужорідне тіло, та з процесом його перебудови. У тварин обох вікових груп спостерігалось збільшення значень маркерів формування кісткової тканини, зокрема активності лужної фосфатази, максимум якої зафіксовано на 28-му добу експерименту із подальшим зменшенням, що є ознакою виснаження репаративних потенцій кісткової тканини.

За локального введення PRP у щурів спостерігалася помірна ефективність локальної стимуляції, яка відобразилася в незначному збільшенні маркерів анаболізму, зокрема активності лужної фосфатази, та зменшенні величини показників катаболізму кісткової тканини, і навіть активності кислої фосфатази.

Результати біохімічного дослідження сироватки крові білих щурів 3-х і 12-місячного віку із дефектом критичного розміру в метафізі стегнової кістки із заповненням дефекту кістковим алоімплантатом показали, що додаткове стимулювання загоєння дефекту локальним введенням плазми крові, збагаченої тромбоцитами, є вірним напрямом дій, але за виразністю — недостатнім для

практичного використання для лікування уражень кісткової тканини та потребує посилення.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Список літератури

- Kale, P., Shrivastava, S., Pundkar, A., & Balusani, P. (2024). Harnessing healing power: A comprehensive review on platelet-rich plasma in compound fracture care. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.52722>.
- Everts, P., Onishi, K., Jayaram, P., Lana, J. F., & Mautner, K. (2020). Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7794. <https://doi.org/10.3390/ijms21207794>
- Zhang, Y., Xing, F., Luo, R., & Duan, X. (2021). Platelet-rich plasma for bone fracture treatment: A systematic review of current evidence in preclinical and clinical studies. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.676033>
- Bezuglov, E., Zholinsky, A., Chernov, G., Khaitin, V., Goncharov, E., Waskiewicz, Z., Barskova, E., & Lazarev, A. (2021). Conservative treatment of the fifth metatarsal bone fractures in professional football players using platelet-rich plasma. *Foot & Ankle Specialist*, 15(1), 62–66. <https://doi.org/10.1177/19386400211017368>
- Ghaffarpasand, F., Shahrezaei, M., & Dehghankhalili, M., (2016). Effects of platelet rich plasma on healing rate of long bone non-union fractures: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Bulletin of Emergency And Trauma*, 4, 134–140.
- Coles, C. P. (2020). Open fractures with soft-tissue loss. *OTA International: The Open Access Journal of Orthopaedic Trauma*, 3(1), e053. <https://doi.org/10.1097/oi9.0000000000000053>
- Ganji, E., & Killian, M. L. (2018). Tendon healing in the context of complex fractures. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 16(4), 131–141. <https://doi.org/10.1007/s12018-018-9254-z>
- Seshan, V., Matua, G. A., Raghavan, D., Arulappan, J., Al Hashmi, I., Roach, E. J., Sunderraj, S. E., & Prince, E. J. (2021). Case study analysis as an effective teaching strategy: Perceptions of undergraduate nursing students from a Middle Eastern country. *SAGE Open Nursing*, 7, 237796082110592. <https://doi.org/10.1177/23779608211059265>
- Ehnert, S., Relja, B., Schmidt-Bleek, K., Fischer, V., Ignatius, A., Linnemann, C., Rinderknecht, H., Huber-Lang, M., Kalbitz, M., Histing, T., & Nussler, A. K. (2021). Effects of immune cells on mesenchymal stem cells during fracture healing. *World Journal of Stem Cells*, 13(11), 1667–1695. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i11.1667>
- Li, S., Xing, F., Luo, R., & Liu, M. (2022). Clinical effectiveness of platelet-rich plasma for long-bone delayed union and Nonunion: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.771252>
- Jamal, M., Hurley, E., Asad, H., Asad, A., & Taneja, T. (2022). The role of platelet rich plasma and other orthobiologics in bone healing and fracture management: A systematic review. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 25, 101759. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2021.101759>
- Law of Ukraine No. 3447-IV, article 26. On the protection of animals from cruel treatment. Kyiv, 21 February, 2006. (In Ukrainian).
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: Strasbourg, 18 March 1986. (2000)
- 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). (2010). *Official Journal of the European Union*
- Tao, Z., Wu, X., Zhou, W., Wu, X., Liao, W., Yang, M., Xu, H., & 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>.
- VH, T. (2013). Practical Textbook laboratory medicine: Practical textbook of laboratory medicine.
- Morozenko, D. V., & Leontjeva, F. S., (2016). Methods of researching markers of connective tissue metabolism in clinical and experimental medicine. *Molodyi vcheniy*, 2(29), 168–172. (In Ukrainian)
- Medical statistics: A textbook for the health sciences, 4th edition by Campbell, M. J., Machin, D., & Walters, S. J. (2008). *Biometrics*, 64(4), 1309-1310. https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2008.01138_14.x
- SK, S. (2019). Fracture non-union: A review of clinical challenges and future research needs. *Malaysian Orthopaedic Journal*, 13(2), 1–10. <https://doi.org/10.5704/moj.1907.001>
- Xu, Z., Hu, H., Wu, B., Huang, C., Liu, Q., & Chen, B. (2022). Efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of fractures: A meta-analysis. *computational and mathematical methods in medicine*, 2022, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2022/5105725>
- An, W., Ye, P., Zhu, T., Li, Z., & Sun, J. (2021). Platelet-rich plasma combined with autologous grafting in the treatment of long bone delayed union or non-union: A meta-analysis. *frontiers in surgery*, 8. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2021.621559>
- Yaman, R., & Kinard, T. N. (2022). Platelet rich plasma: Hope or hype? *Annals of blood*, 7, 6-6. <https://doi.org/10.21037/aob-21-57>

Стаття надійшла до редакції 02.08.2024

BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE BLOOD OF RATS OF DIFFERENT AGES AFTER FILLING THE METAPHYSEAL DEFECT OF THE FEMUR WITH ALLOGENEIC BONE IMPLANTS WITH LOCAL ADMINISTRATION OF BLOOD PLASMA ENRICHED WITH PLATELETS

P. M. Vorontsov, F. S. Leontjeva, V. O. Tuljakov

Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

✉ Petro Vorontsov, MD, PhD in Traumatology and Orthopaedics: vorontsov64@ukr.net

✉ Frieda Leontjeva, PhD in Biol. Sci: alwisia@i.ua

✉ Vladyslav Tuliakov, DSci in Pharmacy: tulakov1967v@gmail.com