

УДК 616.718.4-001.5-089.844:615.461]:616-092.9

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872023233-42>

Зміни маркерів ремоделювання кісткової тканини та запального процесу в сироватці крові білих щурів у разі заповнення дефектів стегнової кістки імплантатами на основі полілактиду та трикальційфосфату із мезенхімальними стовбуровими клітинами

Н. М. Гонтар

Навчально-науковий інститут післядипломної освіти Харківського національного медичного університету. Україна

Objective. Based on the analysis of markers of inflammation and metabolism of bone tissue in the blood serum of laboratory rats, to evaluate the course of bone remodeling after filling the defect in the distal metaphysis of the femur with 3D-printed implants based on polylactide and tricalcium phosphate (3D-I) alone or in combination with mesenchymal stromal cells (MSCs). *Methods.* 53 white rats were used, which were divided into groups: intact (5 animals) — the operation was not performed; Control (15) — 3D-I; Experiment I (15) — 3D-I + cultured alloMSCs; Experiment II (15) — 3D-I + introduction of alloMSCs into the area of surgical intervention 7 days after implantation. The following were studied: the content of glycoproteins (GP), interleukin-6 (IL-6), osteocalcin, chondroitin sulfates (CS), total protein, calcium, alkaline (ALP) and acid phosphatase (AP) activity, and their ratio, mineralization indices were calculated. *Results.* Compared with intact animals, higher indicators were determined in the rats of the Control group: the content of GP by 39.73; 32.88; 23.29 %; CS — 250.00; 222.09 and 196.51 %, ALP activity — 81.67, 51.03, 39.36 %, on the 15th, 30th, and 90th days of the experiment; IL-6 — 44.89; 60.06 % on the 15th and 30th days. In the rats of the Experiment I group: the content of GP — by 82.19; 65.75, 57.53 %, IL-6 — 72.14; 96.59; 79.88 %, CS — 306.98; 276.74; 253.49 %; ALP activity — 63.73; 129.70; 51.28 %, on the 15th, 30th and 90th days of the experiment. In the Experiment II group: on the 15th, 30th and 90th days, the content of GP was higher by 27.40; 26.03; 129.18 %; CS — by 175.58; 137.21 and 115.12 %; ALP activity — 192.99; 178.02, 76.31 %; on the 15th and 30th days: IL-6 — by 37.46; 20.74 %. *Conclusions.* In the case of filling the defect with 3D-printed implants, biochemical signs of moderate inflammation were determined; 3D-printed implants together with MSCs — pronounced inflammation, slowing of bone formation, formation of connective tissue; 3D-printed implants with post-operative injection of MSCs — moderate inflammation and optimal conditions for healing the defect with bone tissue. *Key words.* Defect, modeling, regeneration, xenoinplant, polylactide, tricalcium phosphate, mesenchymal stem cell, biochemistry, connective tissue.

Мета. На підставі аналізу маркерів запалення та метаболізму кісткової тканини в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг ремоделювання кістки після заповнення дефекту в дистальному метафізі стегнової кістки 3D-друкованими імплантатами на основі полілактиду та трикальційфосфату (3D-I) самостійно або в комбінації з мезенхімальними стромальними клітинами (МСК). *Методи.* Використано 53 білих щурів, яких розподілили на групи: інтактна (5 тварин) — операцію не виконували; Контроль (15) — 3D-I; Дослід I (15) — 3D-I + культивовані алоМСК; Дослід II (15) — 3D-I + введення алоМСК у ділянку хірургічного втручання через 7 днів після імплантації. *Досліджено:* вміст глікопротеїнів (ГП), інтерлейкіну-6 (ІЛ-6), остеокальцину, хондроїтинсульфатів (ХС), загального білка, кальцію, активності лужної (ЛФ) та кислотної фосфатази і розраховано їхнє співвідношення, індекси мінералізації. *Результати.* Порівняно з інтактними тваринами визначено більші показники у щурів групи Контроль: вмісту ГП на 39,73; 32,88; 23,29 %; ХС — 250,00; 222,09 і 196,51 %, активності ЛФ — 81,67, 51,03, 39,36 %, на 15-ту, 30-ту та 90-ту доби досліді; ІЛ-6 — 44,89; 60,06 % на 15 та 30-ту доби. У щурів групи Дослід I: вміст ГП — на 82,19; 65,75, 57,53 %, ІЛ-6 — 72,14; 96,59; 79,88 %, ХС — 306,98; 276,74; 253,49 %; активність ЛФ — 63,73; 129,70; 51,28 %, на 15-ту, 30-ту та 90-ту доби досліді. У групі Дослід II: на 15-ту, 30-ту та 90-ту доби був більшим вміст ГП на 27,40; 26,03; 129,18 %; ХС — на 175,58; 137,21 та 115,12 %; активність ЛФ — 192,99; 178,02, 76,31 %; на 15-ту та 30-ту доби: ІЛ-6 — на 37,46; 20,74 %. *Висновки.* У разі заповнення дефекту 3D-друкованими імплантатами визначено біохімічні ознаки помірного запалення; 3D-друкованими імплантатами разом із МСК — вираженого запалення, уповільнення кісткоутворення, формування сполучної тканини; 3D-друкованими імплантатами з післяопераційним введенням МСК — помірного запалення і оптимальних умов для загоєння дефекту кістковою тканиною.

Ключові слова. Дефект, моделювання, регенерація, ксеноімплантат, полілактид, трикальційфосфат, мезенхімальна стовбурова клітина, біохімія, сполучна тканина

Вступ

Кісткова тканина має природну здатність до загоєння, якої здебільшого вистачає для відновлення переломів, проте іноді її виявляється недостатньо [1]. Відомо, що частота незрошень за переломів діяфіза плечової кістки становить 32 % у пацієнтів віком від 55 років [2]. У дослідженні зі залученням 147 пацієнтів із неоперованими переломами діяфіза плечової кістки зафіксовано їхнє зрощення в 126 осіб [3].

Дисбаланс протилежних дій остеобластів та остеокластів є однією з причин порушення консолидації переломів [4]. При цьому функціонально зістарені стовбурові клітини мають знижений потенціал кістко- та хрящеутворення, але продукують більше клонів, які експресують високі рівні прозапальних і прорезорбтивних цитокінів [5].

Кісткові трансплантати є другою найпоширенішою тканиною, яку пересаджують в Сполучених Штатах. Вони необхідні в галузі невідкладної та реконструктивної ортопедичної хірургії. Болючість донорської ділянки й обмежена кількість матеріалу роблять автотрансплантат не ідеальним варіантом. Серед заміників кісткових трансплантатів синтетичні матеріали на основі фосфату та сульфату кальцію є привабливими завдяки спорідненості до кісткової тканини, остеокондуктивним та остеоіндуктивним якостям [6, 7].

Перспективним підходом до лікування переломів кісток є клітинна терапія на основі мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) [8]. Дії МСК можуть включати пряме диференціювання в кісткові клітини, залучення та рекрутування інших клітин або створення регенеративного середовища за рахунок продукції факторів росту [1].

Процес загоєння кісткових дефектів, заповнених трансплантатами, можуть прискорити інші чинники, зокрема, цитокіновий фон [6].

Мета: на підставі аналізу маркерів запалення та метаболізму кісткової тканини в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг ремоделювання кістки після заповнення дефекту в дистальному метафізі стегнової кістки друкованими імплантатами на основі полілактиду та трикальційфосфату в умовах безпосереднього або відтермінованого доповнення їх мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Матеріал і методи

Експериментальні дослідження проведено з виконанням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, встановлених у Законі України «Про захист тварин від жорстокого поводження»

(№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) та Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986) [9–11]. План експериментальних досліджень обговорено й ухвалено на засіданні комітету з біоетики при ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (протокол № 217 від 14.06.2021).

Тварини

Дослідження проведено на 53 білих щурах популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (на початок експерименту вік тварин становив 5–6 міс., маса тіла 200–260 г).

Щурів випадковим чином розподілили на групи залежно від використаного імплантата:

- інтактна (5 тварин) — операцію не виконували;
- Контроль (15) — 3D-друкований імплантат;
- Дослід I (15) — 3D-друкований імплантат у поєднанні з культивованими алогенними МСК;
- Дослід II (15) — 3D-друкований імплантат з ін'єкційним введенням 0,1–0,2 мл середовища з культивованими алогенними МСК у ділянку хірургічного втручання через 7 діб після імплантації.

Для отримання алогенних МСК за описаною методикою [12] використано 3 щурів.

Хірургічні втручання

Хірургічні втручання виконано в умовах асептики й антисептики під загальною анестезією (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Застосовуючи передньолатеральний доступ стоматологічним бором здійснювали транскортикальний дефект стегнової кістки критичного розміру (діаметр 2,6 мм, глибина 3 мм). Дефектом критичного розміру вважають мінімальний отвір, який не загоюється самостійно протягом життя тварини чи впродовж експерименту [13]. Мінімальним розміром критичного дефекту для зони дистального метафіза стегнової кістки лабораторних щурів вважають ушкодження діаметром і глибиною не менше ніж 2,5 мм [14]. Дефекти заповнювали 3D-друкованими імплантатами. Перед імплантацією в кістку щурів групи Дослід I 3D-друкований імплантат просочували впродовж 20 хв у 0,5 мл культурального середовища з 106 клітин, залишок клітин вводили в порожнину дефекту. Щурам групи Дослід II через 7 діб після імплантації в ділянку хірургічного втручання вводили 0,1–0,2 мл середовища з культивованими алогенними МСК.

Після оперативного втручання рану пошарово зашивали й обробляли антисептичним засобом

Бетадин®. По 5 тварин виводили з експерименту на 15, 30, 90-ту доби після операції шляхом декапітації під відкритим інгаляційним наркозом діетиловим ефіром (метод обумовлений необхідністю забору крові для досліджень).

Імплантати

Імплантати були виготовлені з композитної нитки товщиною 1,75 мм із полілактиду (PLA) та трикальційфосфату (ТКФ), виготовленої шляхом змішування 60 % гранул PLA та 40 % мінерального компаунду (20 % PLA + 80 % ТКФ), нагрівання та екструзії на 3D-принтері «Easy3DPrint» з екструдером (технологія друку методом наплавлення композитної нитки). Під час створення композитної нитки використовували гранули PLA (L-полілактид, виробництво Китай), гранули компаунду (ТКФ медичний, діаметр 10 мкм, виробництво Китай). Структура імплантатів: внутрішня — каркас із переплетінь композитної нитки, що утворюють вертикальні та горизонтальні канали (розмір пор 300 мкм, пористість 45 %); зовнішня — циліндри діаметром 2,5 мм, довжиною 30 мм, які механічно розділяли на фрагменти довжиною 3 мм.

Біохімічні дослідження

Після отримання крові з неї відокремлювали сироватку центрифугуванням за 1500 об/хв протягом 30 хв і в ній визначали: вміст глікопротеїнів за модифікованим методом О. П. Штенберга та Я. Н. Доценко [15], хондроїтинсульфатів (ХС) за методом Nemeth–Csoka у модифікації Л. І. Слущького [16], кальцію потенціометричним методом з використанням аналізатора електролітів АЭК-01; 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» з використанням електрофотокolorиметра «КФК-3» та аналізатора біохімічного «GBG STAT FAX 1904 Plus».

Проведено розрахунок інтегральних показників відношення активності лужної фосфатази до активності кислої фосфатази, а також ступеня мінералізації (відношення вмісту кальцію (для цього перераховано одиниці вимірювання ммоль/л у г/л) до вмісту білка в сироватці крові).

Методом твердофазного імуноферментного аналізу в сироватці крові щурів визначали вміст неколагенового білка остеокальцину (ОК) та інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) відповідно до інструкцій виробників наборів ОК (набір остеокальцин (набір «N-MID® Osteocalcin ELISA», Immunodiagnostic Systems Limited, Великобританія), ІЛ-6 (набір

«Интерлейкін-6-ІФА-БЕСТ», АО «ВЕКТОР-БЕСТ», А-8768).

Для вимірювання результатів імуноферментних досліджень використано аналізатор імуноферментний «LisaScan» (Erba® Diagnostics Mannheim GmbH, Німеччина).

Статистичні методи

Аналіз даних виконаний із використанням програм «IBM SPSS Statistics 20» та «Microsoft Office Excel 2007». Результати вимірювань подані як середнє ± стандартне відхилення у випадку нормального розподілу. Нормальність розподілу перевіряли з використанням методу аналізу Колмогорова–Смірнова. Порівняння результатів різних груп із нормальним розподілом виконували за методом Стьюдента–Фішера. Різницю вважали статистично значущою за умови якщо $p < 0,05$ [17].

Результати та їх обговорення

Група Контроль (3D-друкований імплантат) 15-та доба спостереження

У сироватці крові тварин спостерігали підвищення вмісту загального білка на 14,89 %, глікопротеїнів — на 39,73 %, ІЛ-6 — на 44,89 % (табл. 1), що є ознакою розвитку запального процесу із продукуванням надлишку білків гострої фази. Водночас відмічено підвищення вмісту ХС на 250,00 %, що свідчить про активацію формування в організмі сполучної тканини, імовірно, за рахунок її утворення в дефекті, що є небажаним. При цьому зафіксовано більшу активність лужної фосфатази, яка перевищила показник у інтактних тварин на 81,67 %, що в умовах майже незмінної активності кислої фосфатази призвело до збільшення їхнього співвідношення на 66,10 % (табл. 2). Указане характеризує імовірну активацію мінералізації новоутвореної кісткової тканини з переважанням процесів кісткоутворення над лізісом ураженої тканини.

30-та доба

Порівняно з показниками інтактної групи в сироватці крові встановлено вищий на 15,20 % рівень загального білка, а також активацію запальних процесів із відповідною маніфестацією маркерів запалення — більший на 32,88 % вміст глікопротеїнів та на 60,06 % — ІЛ-6 (табл. 1). У цієї групи тварин, як і на попередній термін спостереження, виявлено підвищення вмісту в сироватці крові ХС на 222,09 %, що відображає формування в зоні дефекту сполучної тканини. Водночас, збільшилася активність лужної фосфатази в сироватці крові на

51,03 %, кислої — на 24,25 %, а також величина їхнього співвідношення, яка відображує початкові стадії ремоделювання кісткової тканини, на 21,74 % (табл. 2).

Порівняно з величинами досліджуваних маркерів групи Контроль на 14-ту добу після операції визначено підвищення в сироватці крові рівня остеокальцину на 21,28 %, який стимулює загоєння кісткового дефекту. Навпаки, виходячи з показників активності в сироватці крові лужної

(менша на 15,63 %) та кислої (більша на 14,01 %) фосфатаз разом зі зменшенням на 26,21 % їхнього співвідношення (табл. 2), можна припустити затирання регенеративних і процесів ремоделювання у кістковій тканині із одночасним прискоренням її лізису.

90-та доба

Виявлено нормалізацію вмісту загально-го білка та ІЛ-6 у сироватці крові щурів групи Контроль.

Таблиця 1

Зміни маркерів запалення та загальносоматичних показників сироватці крові лабораторних щурів із транскортикальним дефектом стегнової кістки критичного розміру з різними видами заповнення дефекту в динаміці (M ± m)

Група	Показник				
	загальний білок, г/л	кальцій загальний, ммоль/л	ступінь мінералізації, 10^{-3}	глікопротеїни, од.	інтерлейкін-6, пг/мл
Інтакт, n = 5	68,5 ± 2,3	2,33 ± 0,04	1,36 ± 0,03	0,73 ± 0,02	0,323 ± 0,027
<i>Контроль:</i>					
15 діб, n = 5	78,7 ± 3,3 +14,89 % ¹⁽⁶⁾	2,03 ± 0,02 -12,88 % ¹⁽⁵⁾	1,40 ± 0,07 +0,80 % ¹⁽⁵⁾	1,02 ± 0,03 +39,73 % ¹⁽⁸⁾	0,468 ± 0,009 +44,89 % ¹⁽⁸⁾
30 діб, n = 5	78,9 ± 2,5 +15,20 % ¹⁽⁶⁾ +0,30 % ⁴⁽⁵⁾	2,19 ± 0,03 -6,00 % ¹⁽⁵⁾ +7,90 % ⁴⁽⁵⁾	1,39 ± 0,03 +2,2 % ¹⁽⁵⁾ +2,21 % ⁴⁽⁵⁾	0,97 ± 0,04 +32,88 % ¹⁽⁸⁾ -4,90 % ⁴⁽⁵⁾	0,517 ± 0,039 +60,06 % ¹⁽⁸⁾ +10,47 % ⁴⁽⁵⁾
90 діб, n = 5	76,3 ± 1,5 +11,20 % ¹⁽⁵⁾ -3,30 % ⁴⁽⁵⁾	2,41 ± 0,03 +3,43 % ¹⁽⁵⁾ +10,00 % ⁴⁽⁵⁾	1,27 ± 0,04 -6,60 % ¹⁽⁵⁾ -8,63 % ⁴⁽⁵⁾	0,90 ± 0,02 +23,29 % ¹⁽⁷⁾ -7,22 % ⁴⁽⁵⁾	0,298 ± 0,027 -7,74 % ¹⁽⁵⁾ -42,36 % ⁴⁽⁸⁾
<i>Дослід I:</i>					
15 діб, n = 5	97,5 ± 1,9 +42,34 % ¹⁽⁸⁾ +23,89 % ²⁽⁷⁾	2,34 ± 0,03 +0,42 % ¹⁽⁵⁾ +15,27 % ²⁽⁶⁾	1,39 ± 0,03 +2,20 % ¹⁽⁵⁾ -0,71 % ²⁽⁵⁾	1,33 ± 0,04 +82,19 % ¹⁽⁸⁾ +30,39 % ²⁽⁸⁾	0,556 ± 0,030 +72,14 % ¹⁽⁸⁾ +18,80 % ²⁽⁶⁾
30 діб, n = 5	95,1 ± 1,4 +38,83 % ¹⁽⁸⁾ +20,53 % ²⁽⁶⁾ -2,50 % ⁴⁽⁵⁾	2,30 ± 0,04 -1,29 % ¹⁽⁵⁾ +5,02 % ²⁽⁵⁾ -1,71 % ⁴⁽⁵⁾	1,42 ± 0,02 +4,41 % ¹⁽⁵⁾ +2,16 % ²⁽⁵⁾ +2,20 % ⁴⁽⁵⁾	1,21 ± 0,03 +65,75 % ¹⁽⁸⁾ +24,74 % ²⁽⁶⁾ -9,02 % ⁴⁽⁵⁾	0,635 ± 0,032 +96,59 % ¹⁽⁸⁾ +22,82 % ²⁽⁷⁾ +14,21 % ⁴⁽⁶⁾
90 діб, n = 5	88,4 ± 3,5 +29,06 % ¹⁽⁷⁾ +15,86 % ²⁽⁶⁾ -7,05 % ⁴⁽⁵⁾	2,45 ± 0,02 +5,15 % ¹⁽⁵⁾ +1,65 % ²⁽⁵⁾ +6,50 % ⁴⁽⁵⁾	1,11 ± 0,04 -18,40 % ¹⁽⁸⁾ -12,60 % ²⁽⁵⁾ -13,40 % ⁴⁽⁶⁾	1,15 ± 0,04 +57,53 % ¹⁽⁸⁾ +27,78 % ²⁽⁶⁾ -4,96 % ⁴⁽⁵⁾	0,581 ± 0,024 +79,88 % ¹⁽⁸⁾ +94,97 % ²⁽⁸⁾ -8,50 % ⁴⁽⁵⁾
<i>Дослід II:</i>					
15 діб, n = 5	62,1 ± 2,5 -9,34 % ¹⁽⁵⁾ +14,99 % ²⁽⁶⁾ -36,30 % ³⁽⁸⁾	2,22 ± 0,05 -4,72 % ¹⁽⁵⁾ +9,36 % ²⁽⁵⁾ -5,13 % ³⁽⁵⁾	1,43 ± 0,04 +5,15 % ¹⁽⁵⁾ +2,10 % ²⁽⁵⁾ +2,87 % ³⁽⁵⁾	0,93 ± 0,02 +27,40 % ¹⁽⁷⁾ -8,84 % ²⁽⁵⁾ -30,07 % ³⁽⁸⁾	0,444 ± 0,031 +37,46 % ¹⁽⁸⁾ -5,13 % ²⁽⁵⁾ -20,14 % ³⁽⁷⁾
30 діб, n = 5	66,3 ± 1,5 -3,21 % ¹⁽⁵⁾ -15,97 % ²⁽⁶⁾ -30,28 % ³⁽⁸⁾ +6,80 % ⁴⁽⁵⁾	2,27 ± 0,04 -2,57 % ¹⁽⁵⁾ +3,65 % ²⁽⁵⁾ -1,30 % ³⁽⁵⁾ +2,30 % ⁴⁽⁵⁾	1,41 ± 0,04 +3,68 % ¹⁽⁵⁾ +1,44 % ²⁽⁵⁾ -0,70 % ³⁽⁵⁾ -1,40 % ⁴⁽⁵⁾	0,92 ± 0,02 +26,03 % ¹⁽⁷⁾ -4,12 % ²⁽⁵⁾ -23,97 % ³⁽⁶⁾ -1,08 % ⁴⁽⁵⁾	0,390 ± 0,030 +20,74 % ¹⁽⁷⁾ -24,56 % ²⁽⁷⁾ -38,58 % ³⁽⁸⁾ -12,16 % ⁴⁽⁵⁾
90 діб, n = 5	73,3 ± 2,8 +7,00 % ¹⁽⁵⁾ -3,90 % ²⁽⁵⁾ -17,08 % ³⁽⁶⁾ +10,60 % ⁴⁽⁵⁾	2,53 ± 0,04 +8,58 % ¹⁽⁵⁾ +4,98 % ²⁽⁵⁾ +3,26 % ³⁽⁵⁾ +11,45 % ⁴⁽⁵⁾	1,38 ± 0,04 +1,47 % ¹⁽⁵⁾ +8,66 % ²⁽⁵⁾ +2,20 % ³⁽⁵⁾ -2,13 % ⁴⁽⁵⁾	0,87 ± 0,02 +19,18 % ¹⁽⁶⁾ 0,00 % ²⁽⁵⁾ -8,42 % ³⁽⁵⁾ -5,44 % ⁴⁽⁵⁾	0,364 ± 0,029 +12,69 % ¹⁽⁵⁾ +22,15 % ²⁽⁷⁾ -37,35 % ³⁽⁸⁾ -6,67 % ⁴⁽⁵⁾

Примітки: порівняння щодо параметрів: ¹⁾ — інтактної групи щурів, ²⁾ — щурів групи Контроль на однаковий термін спостереження, ³⁾ — групи Дослід I на однаковий термін спостереження, ⁴⁾ — у межах однієї групи на попередній термін експерименту, ⁵⁾ — $p > 0,05$; ⁶⁾ — $p < 0,05$; ⁷⁾ — $p < 0,01$; ⁸⁾ — $p < 0,001$

Порівняно з групою інтактних щурів спостерігали перевищення за вмістом глікопротеїнів на 23,29 %, ХС — на 196,51 %, що свідчить про інтенсивний метаболізм сполучної тканини (табл. 1).

На високому рівні залишалася активність у сироватці крові лужної фосфатази, яка перевищувала показник інтактних тварин на 39,36 %, натомість значення кислої фосфатази практично не відрізнялися в усіх групах. Зазначене призвело

до збільшення співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз на 26,09 % відносно величини в інтактних щурів, що вказує на прискорення ремоделювання кісткової тканини на ранніх етапах мінералізації.

Спостерігалось зменшення на 18,40 % величини показника мінералізації, яке вказує на затримку останньої фази мінералізації кісткової тканини (табл. 2).

Таблиця 2

Зміни маркерів метаболізму кісткової та сполучної тканини сироватці крові лабораторних щурів із транскортикальним дефектом стегнової кістки критичного розміру із різними видами заповнення дефекту в динаміці (M ± m)

Група	Показник				
	ХС	остеокальцин, нг/мл	фосфатаза лужна, од./л	фосфатаза кисла, од./л	відношення активності лужної та кислої фосфатаз
Інтакт, n = 5	0,086 ± 0,005	228,3 ± 11,4	199,7 ± 8,7	33,4 ± 1,2	5,98 ± 0,09
<i>Контроль:</i>					
15 діб, n = 5	0,301 ± 0,026 +250,00 % ¹⁾⁸⁾	196,9 ± 14,9 -13,75 % ¹⁾⁵⁾	362,8 ± 24,0 +81,67 % ¹⁾⁸⁾	36,4 ± 1,3 +8,98 % ¹⁾⁵⁾	9,93 ± 0,30 +66,10 % ¹⁾⁸⁾
30 діб, n = 5	0,277 ± 0,015 +222,09 % ¹⁾⁸⁾ -7,97 % ⁴⁾⁵⁾	238,8 ± 14,3 +4,60 % ¹⁾⁵⁾ +21,28 % ⁴⁾⁶⁾	301,6 ± 19,5 +51,03 % ¹⁾⁸⁾ -15,63 % ⁴⁾⁶⁾	41,5 ± 1,3 +24,25 % ¹⁾⁶⁾ +14,01 % ⁴⁾⁶⁾	7,28 ± 0,48 +21,74 % ¹⁾⁶⁾ -26,69 % ⁴⁾⁶⁾
90 діб, n = 5	0,255 ± 0,016 +196,51 % ¹⁾⁸⁾ -7,94 % ⁴⁾⁵⁾	239,1 ± 10,5 4,73 % ¹⁾⁵⁾ +0,13 % ⁴⁾⁵⁾	278,3 ± 23,8 +39,36 % ¹⁾⁸⁾ -7,73 % ⁴⁾⁵⁾	36,7 ± 1,5 +9,88 % ¹⁾⁵⁾ -11,57 % ⁴⁾⁵⁾	7,54 ± 0,39 +26,09 % ¹⁾⁶⁾ +3,57 % ⁴⁾⁵⁾
<i>Дослід I:</i>					
15 діб, n = 5	0,350 ± 0,013 +306,98 % ¹⁾⁸⁾ +16,28 % ²⁾⁶⁾	205,0 ± 12,7 -10,21 % ¹⁾⁵⁾ +4,11 % ¹⁾⁵⁾	307,0 ± 16,7 +53,73 % ¹⁾⁸⁾ -15,38 % ²⁾⁶⁾	48,7 ± 1,4 +45,81 % ¹⁾⁸⁾ +33,79 % ²⁾⁸⁾	6,29 ± 0,23 +5,18 % ¹⁾⁵⁾ -36,66 % ²⁾⁸⁾
30 діб, n = 5	0,324 ± 0,019 +276,74 % ¹⁾⁸⁾ +17,00 % ²⁾⁶⁾ -7,43 % ⁴⁾⁵⁾	243,4 ± 13,6 +6,61 % ¹⁾⁵⁾ +1,80 % ²⁾⁵⁾ +18,73 % ⁴⁾⁶⁾	458,7 ± 21,4 +129,70 % ¹⁾⁸⁾ +52,09 % ²⁾⁸⁾ +49,41 % ⁴⁾⁸⁾	50,4 ± 1,8 +50,90 % ¹⁾⁸⁾ +60,00 % ²⁾⁸⁾ +3,49 % ⁴⁾⁵⁾	9,10 ± 0,18 +52,20 % ¹⁾⁸⁾ +15,20 % ²⁾⁶⁾ +44,67 % ⁴⁾⁸⁾
90 діб, n = 5	0,304 ± 0,021 +253,49 % ¹⁾⁸⁾ +19,22 % ²⁾⁶⁾ -6,17 % ⁴⁾⁵⁾	204,0 ± 10,9 -10,64 % ¹⁾⁵⁾ -14,68 % ²⁾⁶⁾ -16,19 % ⁴⁾⁶⁾	302,1 ± 18,3 +51,28 % ¹⁾⁸⁾ +8,55 % ²⁾⁵⁾ -34,14 % ⁴⁾⁸⁾	45,1 ± 1,9 +35,03 % ¹⁾⁸⁾ +68,91 % ²⁾⁸⁾ -10,52 % ⁴⁾⁵⁾	6,67 ± 0,15 +11,50 % ¹⁾⁵⁾ -35,74 % ²⁾⁶⁾ -26,70 % ⁴⁾⁶⁾
<i>Дослід II:</i>					
15 діб, n = 5	0,237 ± 0,019 +175,58 % ¹⁾⁸⁾ -21,26 % ²⁾⁷⁾ -32,30 % ³⁾⁷⁾	372,7 ± 14,5 +61,25 % ¹⁾⁸⁾ +89,28 % ²⁾⁸⁾ +81,80 % ³⁾⁸⁾	585,1 ± 18,6 +192,99 % ¹⁾⁸⁾ +88,83 % ²⁾⁸⁾ +90,59 % ³⁾⁸⁾	31,5 ± 1,7 -5,69 % ¹⁾⁵⁾ -13,46 % ²⁾⁵⁾ -18,60 % ³⁾⁶⁾	18,38 ± 0,46 +207,40 % ¹⁾⁸⁾ +85,10 % ²⁾⁸⁾ +132,36 % ³⁾⁸⁾
30 діб, n = 5	0,204 ± 0,026 +137,21 % ¹⁾⁸⁾ -26,35 % ²⁾⁷⁾ -37,00 % ³⁾⁸⁾ -13,92 % ⁴⁾⁵⁾	478,3 ± 14,9 +109,51 % ¹⁾⁸⁾ +100,29 % ²⁾⁸⁾ +96,50 % ³⁾⁸⁾ +28,33 % ⁴⁾⁶⁾	555,2 ± 18,6 +178,02 % ¹⁾⁸⁾ +84,08 % ²⁾⁸⁾ +21,04 % ³⁾⁷⁾ -5,11 % ⁴⁾⁵⁾	28,2 ± 1,7 -15,57 % ¹⁾⁶⁾ -32,00 % ²⁾⁸⁾ -44,05 % ³⁾⁸⁾ -10,48 % ⁴⁾⁵⁾	19,80 ± 0,55 +231,10 % ¹⁾⁸⁾ +150,60 % ²⁾⁸⁾ +117,58 % ³⁾⁸⁾ +7,73 % ⁴⁾⁵⁾
90 діб, n = 5	0,185 ± 0,020 +115,12 % ¹⁾⁸⁾ -47,10 % ²⁾⁸⁾ -39,15 % ³⁾⁸⁾ -9,31 % ⁴⁾⁵⁾	409,3 ± 22,9 +79,28 % ¹⁾⁸⁾ +71,18 % ²⁾⁸⁾ +100,64 % ³⁾⁸⁾ -14,43 % ⁴⁾⁶⁾	352,1 ± 26,1 +76,31 % ¹⁾⁸⁾ +26,52 % ²⁾⁷⁾ +16,55 % ³⁾⁶⁾ -36,58 % ⁴⁾⁸⁾	22,4 ± 3,3 -32,34 % ¹⁾⁸⁾ -16,10 % ²⁾⁶⁾ -50,33 % ³⁾⁸⁾ -20,57 % ⁴⁾⁶⁾	15,77 ± 0,36 +163,70 % ¹⁾⁸⁾ +51,90 % ²⁾⁸⁾ +136,43 % ³⁾⁸⁾ -20,40 % ⁴⁾⁶⁾

Примітки: порівняння щодо параметрів: ¹⁾ — інтактної групи щурів, ²⁾ — щурів групи Контроль на однаковий термін спостереження, ³⁾ — групи Дослід I на однаковий термін спостереження, ⁴⁾ — у межах групи на попередній термін експерименту, ⁵⁾ — p > 0,05; ⁶⁾ — p < 0,05; ⁷⁾ — p < 0,01; ⁸⁾ — p < 0,001.

Порівняно з показниками тієї самої групи на попередній термін дослідження визначено різке зниження вмісту ІЛ-6 в сироватці крові (на 42,36 %, табл. 1), що є відображенням зменшення активності запальних процесів.

Група Дослід І (3D-друкований імплантат у поєднанні з культивованими алогенними МСК)
15-та доба

Порівняно з інтактною групою виявлено більший на 72,14 % вміст ІЛ-6 глікопротеїнів — на 82,19 %. При цьому, ймовірно за рахунок білків гострої фази, зріс вміст загального білка в сироватці крові на 42,34 % (табл. 1). Дуже висока кваліфікована швидкість метаболізму сполучної тканини свідчить про збільшення концентрації ХС у сироватці крові на 306,98 %. Маркери формування та лізису кісткової тканини — активність лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові досить синхронно підвищувалися відносно рівня показників у інтактних тварин (на 53,73 та 45,81 % відповідно), а їхнє співвідношення — суттєво не відрізнялося (табл. 2).

Порівняно з показниками тварин групи Контроль на цей термін дослідження виявлено значуще більший на 30,39 % вміст глікопротеїнів у сироватці крові, на 18,80 % — ІЛ-6, на 23,89 % — загального білка (табл. 1), яке вказує на активніший процес запалення в щурів групи Дослід І, що може бути пояснено реакцією на введення МСК безпосередньо після формування дефекту.

Крім того, у тварин групи Дослід І спостерігали перевищення рівня контрольної групи за вмістом ХС у сироватці крові на 16,28 % (табл. 2), що вказує на вищий темп розвитку сполучної тканини. Визначено нижчу на 15,38 % активність лужної фосфатази, вищу на 33,79 % — кислої, ніж в групі Контроль. Унаслідок цього величина співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові виявилася меншою на 36,66 % (табл. 2). Тобто, за умов додаткового введення МСК одночасно з імплантатом на основі PLA та ТКФ, пригнічено формування кісткової тканини та прискорено її лізис, можливо, за рахунок надмірної активації запальних процесів (табл. 1). Ремодельовання новоутвореної кісткової тканини було пригнічено вже на початку процесів мінералізації.

30-та доба

У щурів групи Дослід І продовжувався розвиток запальних процесів, що відображалось підвищенням у сироватці крові маніфестації специфічних маркерів запалення (вмісту ІЛ-6 на 96,59 %,

глікопротеїнів — на 65,75 %) і непрямих маркерів (вмісту загального білка на 38,83 %) (табл. 1).

Імовірно, тривав активний розвиток сполучної тканини в зоні дефекту із підвищеним рівнем у сироватці крові ХС на 276,74 % (табл. 2).

Крім того, встановлено підвищення активності в сироватці крові лужної фосфатази на 129,70 %, кислої — на 50,90 %. Величина співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз також була підвищена на 52,20 % у порівнянні з показником у тварин групи Контроль на цей самий термін експерименту (табл. 2).

У межах групи Дослід І порівняно з показниками, отриманими на 15-ту добу експерименту, зафіксовано збільшення вмісту ІЛ-6 у сироватці крові на 14,21 % (табл. 1), що свідчить про подальшу інтенсифікацію запальних процесів. Щодо маркерів формування кісткової тканини, можна зазначити деяке покращення ситуації. Зокрема, вміст остеокальцину в сироватці крові виявився вищим на 18,73 %, активність лужної фосфатази — на 49,41 %, співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз — на 44,67 % (табл. 2). Тобто процес ремодельовання та мінералізації кісткової тканини виходив із паузи, яка була характерна для 15-ї доби експерименту.

90-та доба

Визначено активний перебіг запального процесу, що проявлявся у значущому підвищенні вмісту в сироватці крові глікопротеїнів на 57,53 %, ІЛ-6 — на 79,88 %, загального білка — на 29,06 % (табл. 1). Досить вираженими були показники маркерів формування сполучної тканини: вміст ХС у сироватці крові був вищим за такий у інтактних тварин на 253,49 % (табл. 2). При цьому в кістковій тканині були активовані як анаболічні процеси (активність лужної фосфатази перевищувала показник інтактних тварин на 51,28 %), так і катаболічні (активність кислої фосфатази була вищою, ніж у групи інтактних тварин, на 35,03 %) (табл. 2).

Порівняно з результатами, отриманими в щурів групи Контроль, визначено суттєво більший вміст глікопротеїнів у сироватці на 27,78 %, ІЛ-6 — на 94,97 %, загального білка — на 15,86 % (табл. 1), що вказує на різку активацію запалення також і на 90-ту добу експерименту. Вміст ХС у сироватці крові щурів групи Дослід І був вищим на 19,22 %, ніж у контрольних тварин, остеокальцину — на 14,68 % нижчим (табл. 2), що вказує на утворення в зоні дефекту сполучної тканини. Активність лужної фосфатази в сироватці крові була порівнянною з показником групи Контроль,

а кислоти — підвищеною на 68,91 %. Відповідно, зменшено співвідношення активності лужної та кислоти фосфатази на 21,83 %, що вказує на активацію руйнування кісткової тканини поблизу зони дефекту (табл. 2).

Порівняно з попереднім терміном дослідження визначено нижчу на 13,40 % величину показника мінералізації (табл. 1). Водночас рівень остеокальцину в сироватці крові був меншим на 16,19 %, активність лужної фосфатази — на 34,14 %, співвідношення активності лужної та кислоти фосфатази — на 26,70 % (табл. 2).

Група Дослід II (3D-друкований імплантат з ін'єкційним введенням культивованих аlogenних МСК на 7-му добу після операції)

15-та доба

Вміст глікопротеїнів у сироватці крові був підвищений на 27,40 %, а ІЛ-6 — на 37,46 %, що є значно меншим, ніж у групі Дослід I відповідно на 30,07 і 20,14 %. Вміст загального білка та ХС у сироватці крові тварин розглянутої групи, хоча і був вищим, ніж у інтактних щурів, на 14,99 і 175,58 % відповідно, але ці величини були меншими, ніж у тварин групи Дослід I (на 36,30 % і 32,30 % відповідно) (табл. 1). Зазначене свідчить про менший рівень запалення й обмежену активацію обміну сполучної тканини, ніж у груп порівняння.

Стосовно маркерів метаболізму кісткової тканини в лабораторних щурів групи Дослід II виявлено в сироватці крові: остеокальцину на 61,25 % більше, ніж у інтактних тварин, на 89,28 % — ніж у групі Контроль, на 81,80 % — ніж у групі Дослід I; вищу активність лужної фосфатази на 192,99, 88,83 і 90,59 % відповідно; порівнянну з інтактною групою активність кислоти фосфатази, але нижчу за показник групи Контроль на 18,60 % (табл. 2). Співвідношення активності лужної та кислоти фосфатази сироватки крові виявилось більшим за показник інтактних тварин на 207,40 %, групи Контроль — на 85,10 %, групи Дослід I — на 132,36 % (табл. 2). Тобто в групі Дослід II зафіксовано активацію ремоделювання кісткової тканини з переважанням кісткоутворення над руйнуванням.

30-та доба

На цей термін експерименту визначено подальше пригнічення запального процесу, що відображено зниженням концентрації маркерів запалення у сироватці крові дослідних тварин: вміст глікопротеїнів і ІЛ-6 хоча і був вищим на 26,03 і 20,74 % відповідно, ніж у інтактних тварин, але виявився нижчим на 23,97 і 38,56 % відповідно за показники групи Дослід I. Вміст загального

білка був порівняним із величиною в інтактних тварин, але на 15,97 і 30,28 % меншим, ніж на цей самий термін спостереження в групах Контроль і Дослід I відповідно (табл. 1). Тобто у тварин групи Дослід II запальний процес був суттєво менш виражений, ніж у групах Контроль і Дослід I.

За вмістом кальцію та ступенем мінералізації показники лабораторних щурів групи Дослід II значуще не відрізнялися від груп порівняння. Також у них зафіксовано порівняно невисокі значення вмісту ХС у сироватці крові: більші на 137,21 %, ніж у інтактних тварин, але менші на 26,35 і 37,00 %, ніж у групах Контроль і Дослід I відповідно (табл. 2), що відображує менший вміст сполучної тканини в ділянці дефекту.

Підвищення рівня остеокальцину в сироватці крові порівняно з 15-ю добою спостереження на 28,33 %, порівняно з показниками щурів груп Дослід I і Контроль на 30-ту добу — на 96,50 % і 109,51 % (табл. 2) можна трактувати як утворення більшої кількості кісткової тканини в зоні дефекту щурів групи Дослід II. На користь цього твердження свідчить також вища активність в їхній сироватці крові лужної фосфатази на 178,0; 84,08 і 21,04 %, а також нижча активність кислоти фосфатази (маркеру лізису кісткової тканини) на 15,57; 32,00 і 44,05 % порівняно з групами інтакт, Контроль і Дослід I відповідно (табл. 2). Співвідношення активності лужної та кислоти фосфатази сироватки крові у щурів групи Дослід II виявилось більшим на 231,10; 150,60 і 117,58 %, ніж у групах інтакт, Контроль і Дослід I відповідно (табл. 2). Зазначене свідчить, що саме в групі Дослід II склалися найбільш сприятливі умови для формування кісткової тканини та її ремоделювання.

90-та доба

На цей термін експерименту визначено помірне маніфестування маркерів запального процесу, а саме: більший вміст глікопротеїнів у сироватці крові на 19,18 % порівняно з інтактними щурами; ІЛ-6 — більший на 22,15 % порівняно з групою Контроль, але менший на 37,35 % порівняно з групою Дослід I; загального білка — менший на 17,08 % порівняно з групою Дослід I (табл. 1). Зазначене свідчить про меншу активність запального процесу у тварин групи Дослід II порівняно з групою Дослід I. За вмістом у сироватці крові кальцію та величиною ступеня мінералізації у щурів групи Дослід II статистично достовірних розбіжностей із групами порівняння не знайдено.

Концентрація ХС у сироватці крові зафіксована більша на 115,12 % за показник інтактних

тварин, але менша за величини, виявлені в групах Контроль і Дослід I на 90-ту добу, на 47,10 і 39,15 % відповідно (табл. 2).

Як і на попередній термін дослідження, вміст остеокальцину в сироватці крові був на достатньо високому рівні: більшим на 79,28; 71,18 і 100,64 % за показники груп інтакт, Контроль і Дослід I відповідно. Установлено, що на цей термін спостерігалось зниження на 36,58 % активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів групи Дослід II порівняно з 30-ю добою, але показник залишався вищим на 76,31; 26,52 і 16,55 % за значення на 90-ту добу в групах інтакт, Контроль і Дослід I відповідно. Активність кислої фосфатази порівняно з цими самими групами виявилася меншою на 32,34; 16,10 і 50,33 % відповідно. Розрахунковий показник співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз був більшим, ніж у групах інтакт, Контроль і Дослід I на 163,70; 51,90 та 136,43 % відповідно. Відносно показника групи Дослід II на попередній термін дослідження зазначений параметр достовірно поступався на 20,40 % (табл. 2).

Обговорення

У поданій роботі проведено порівняльне дослідження дії (за маркерами метаболізму) на кісткову тканину нового біоматеріалу — 3D-друкованих імплантатів на основі PLA та ТКФ, використаних самостійно або в комбінації з МСК, якими або насичували імплантат перед встановленням, або вводили їх ін'єкційно в ділянку дефекту на 7-му добу після операції. За модель обрано дірчастий дефект у дистальному метафізі стегнової кістки щурів критичного розміру (діаметр 2,6 мм, глибина 3 мм).

За результатами біохімічного аналізу сироватки крові визначено, що в умовах заповнення дефекту 3D-друкованими імплантатами самостійно регенеративні потенції кісткової тканини залишалися обмеженими і на фоні помірного маніфестування маркерів запального процесу відбувалося помірне підвищення маркерів формування кісткової тканини та її мінералізації. Достатньо активною була перебудова сполучної тканини, про що свідчило перевищення вмісту ХС у сироватці крові.

Як зазначили у T. Rolvien і співавт. [18], у кращому випадку за умов використання МСК сумісно із біокаркасом перебігає репаративний остеогенез і перебудова матеріалу трансплантата. Водночас експериментально показано, що насичення МСК кісткових алотрансплантатів призводило у ви-

падках свіжих травматичних ушкоджень кісток до уповільнення кісткоутворення з формуванням на 14-ту та 28-му доби після імплантації значних територій сполучної тканини незалежно від віку щурів [12]. Можна припустити, що саме використання аллогенних МСК на ранньому етапі загоєння дефекту стало причиною надмірної активації запалення за імунним механізмом, унаслідок чого утворилася сполучна тканина. Визначено, що МСК можуть стимулювати вивільнення різноманітних активних чинників: фактори росту, інгібітори, активатори запалення з імуномодельючими ефектами [19]. Цим працям не протирічають результати нашого дослідження: у групі щурів, яким встановлювали 3D-друкований імплантат, насичений культивованими алогенними МСК, зафіксовано найбільші показники вмісту ХС у сироватці крові, що є ознакою активації перебудови сполучної тканини, імовірно, за рахунок надлишкового її утворення в зоні дефекту.

Особливий інтерес становлять зміни біохімічних маркерів запалення та формування кісткової тканини в умовах післяопераційного (на 7-му добу) введення МСК у зону дефекту, де встановлений 3D-друкований імплантат на основі PLA та ТКФ. За цих умов виявлено значно спокійнішу, ніж у групах Контроль (3D-друкований імплантат) і Дослід I (3D-друкований імплантат, насичений МСК), ситуацію щодо розвитку запалення, яке реєстрували за проявами маркерів запального процесу — вмістом глікопротеїнів, ІЛ-6, загального білка, який міг змінюватися, головним чином, за рахунок біосинтезу в організмі запальних білків гострої фази. Зазначену особливість спостерігали на всіх етапах експерименту. При цьому зафіксовано більшу, за показниками маркерів формування кісткової тканини (вмісту остеокальцину, активності лужної фосфатази, співвідношення активності лужної та кислої фосфатаз) швидкість утворення та ремоделювання кістки, імовірно, в зоні дефекту та навколо неї, оскільки інша кісткова тканина залишалася інтактною. Механізмом пришвидшення ремоделювання кісткової тканини в умовах відтермінованого використання МСК може бути їхнє сприяння неоваскуляризації, зокрема за рахунок паракринної дії [20]. Також у щурів, яким на 7-му добу після встановлення 3D-друкованого імплантата вводили МСК у зону дефекту, зафіксовано помірне активування метаболізму сполучної тканини з незначним підвищенням вмісту ХС у сироватці крові, котрий із початку дослідження був нижчим, ніж в інших групах.

Висновки

На підставі аналізу результатів біохімічного дослідження показників сироватки крові лабораторних щурів за умов заповнення дефекту 3D-друкованими імплантатами на основі PLA та ТКФ виявлено ознаки помірного запалення з підвищенням вмісту глікопротеїнів, ІЛ-6, загального білка. Уповільнення кістковотворення констатовано за незначним підвищенням активності лужної фосфатази, високим рівнем активності кислої фосфатази, а надмірне формування сполучної тканини — за значним рівнем хондроїтинсульфатів.

У випадку використання для заповнення дефекту кістки 3D-друкованими імплантатами, насиченими культивованими алогенними МСК, зафіксовано біохімічні ознаки вираженого запалення зі значущим збільшенням вмісту у сироватці крові щурів глікопротеїнів, ІЛ-6 та загального білка. Це створює несприятливі умови і сповільнює загоєння дефекту кістковою тканиною, про що свідчить зниження вмісту остеокальцину, активності лужної фосфатази, відношення активності лужної та кислої фосфатаз.

За умов встановлення в метафізарному дефекті стегнової кістки щурів 3D-друкованих імплантатів і післяопераційного (7-ма доба) введення культивованих алогенних МСК виникли умови для загоєння дефекту саме кістковою тканиною, про що свідчить істотне підвищення активності лужної фосфатази на фоні малої змінності активності кислої фосфатази, менший вміст ХС у сироватці крові, що характеризує незначну кількість сполучної тканини в зоні дефекту.

Конфлікт інтересів. Автор декларує відсутність конфлікту інтересів.

Список літератури

- 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>
- Pollock, F. H., Maurer, J. P., Sop, A., Callegai, J., Broce, M., Kali, M., & Spindel, J. F. (2020). Humeral Shaft Fracture Healing Rates in Older Patients. *Orthopedics*, 43(3), 168–172. <https://doi.org/10.3928/01477447-20200213-03>
- Dedhia, N., Ranson, R. A., Rettig, S. A., Konda, S. R., & Egol, K. A. (2023). Nonunion of conservatively treated humeral shaft fractures is not associated with anatomic location and fracture pattern. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 143(4), 1849–1853. <https://doi.org/10.1007/s00402-022-04388-3>
- Korzh, M., Vorontsov, P., Ashukina, N., & Maltseva, V. (2021). Age-related features of bone regeneration (literature review). *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics*, (3), 92–100. <https://doi.org/10.15674/0030-59872021392-100>
- Ambrosi, T. H., Marecic, O., McArdle, A., Sinha, R., Gulati, G. S., Tong, X., Wang, Y., Steininger, H. M., Hoover, M. Y., Koepke, L. S., Murphy, M. P., Sokol, J., Seo, E. Y., Tevlin, R., Lopez, M., Brewer, R. E., Mascharak, S., Lu, L., Ajanaku, O., Conley, S. D., ... Chan, C. K. F. (2021). Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche. *Nature*, 597(7875), 256–262. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03795-7>
- 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>
- Brunello, G., Panda, S., Schiavon, L., Sivoilella, S., Bassetto, 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>
- Yishan Chen, Junxin Lin, Yeke Yu, & Xiaotian Du (2020). Role of mesenchymal stem cells in bone fracture repair and regeneration. 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>
- 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>
- 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
- 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, 276/33 – 276/79. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>
- 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>
- Poser, L., Matthys, R., Schawalder, 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>
- Tao, Z. S., Wu, X. J., Zhou, W. S., Wu, X. J., Liao, W., Yang, M., Xu, H. G., & Yang, L. (2019). Local administration of aspirin with β -tricalcium phosphate/poly-lactic-co-glycolic acid (β -TCP/PLGA) could enhance osteoporotic bone regeneration. *Journal of bone and mineral metabolism*, 37(6), 1026–1035. <https://doi.org/10.1007/s00774-019-01008-w>
- Kamyshnikov, V. S. (2003). *Clinical and biochemical laboratory diagnostics: reference book*: in 2 volumes [Kliniko-biokhimičeskaya laboratornaya diagnostika: spravocnik: v 2 t.] (2nd ed.). Minsk : Interpressservice. (in russian).
- Morozenko, D. V., Leontieva, F. S. (2016). Research methods markers of connective tissue metabolism in modern clinical and experimental medicine [Metody doslidzhennya markeriv metabolizmu spoluchnoyi tkanyny u klinichnyy ta eksperymental'nyy medytsyni]. *Molodyy vchenyy*, 2 (29), 168–172. (in Ukrainian)
- Lang, T. A., Sesik, M. M. (2011). How to describe statistics in medicine. A guide for authors, editors and reviewers [Kak

- opisyvat' statistiku v meditsine. Rukovodstvo dlya avtorov, redaktorov i retsenzentov]. Moscow : Practical Medicine. (in russian)
18. Rolvien, T., Barbeck, M., Wenisch, S., Amling, M., & Krause, M. (2018). Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 2893. <https://doi.org/10.3390/ijms19102893>
19. Lee, T. D., Zhang, H., Wang, H., & Chang, L.-F. (2018). Cellular factors derived from mesenchymal stem and progenitor cells with regeneration effects. *Asia-Pacific Journal of Blood Types and Genes*. <https://doi.org/10.46701/apjbg.2018012017062>
20. 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 25.04.2023

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

N. M. Gontar

Educational and Scientific Institute of Postgraduate Education of Kharkiv National Medical University. Ukraine

✉ Nazar Gontar, MD: gontarnazar@ukr.net